






# TECHNOZYM<sup>®</sup> ADAMTS-13



REF	5450501	TECHNOZYM <sup>®</sup> ADAMTS-13	$\Sigma_{2 \times 48}$
REF	5450551	TECHNOZYM <sup>®</sup> ADAMTS-13	$\Sigma_{48}$
REF	5450561	TECHNOZYM <sup>®</sup> ADAMTS-13 Calibrator Set	5 x 0.5 mL
REF	5450563	TECHNOZYM <sup>®</sup> ADAMTS-13 Control Set	2 x 0.5 mL

## Symbols key / Symbolschlüssel

	manufactured by / Hergestellt von / fabriqué par	<b>DIL</b>	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / à diluer ou à dissoudre
	expiry date / Verfallsdatum / date d'expiration	<b>IVD</b>	in vitro diagnostic use / in vitro Diagnostikum / diagnostique in vitro
	storage temperature / Lagertemperatur / température de conservation	<b>LOT</b>	Lot / Charge / lot
	consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consulter la notice d'utilisation	<b>MTP</b>	microtiter plate / mikrotiterplatte / Microplaques sensibilisées
<b>CE</b>	CE-mark / CE-Zeichen / marquage CE	<b>REF</b>	catalogue number / Katalognummer / référence
	Determinations / Bestimmungen / déterminations	<b>RTU</b>	ready to use / gebrauchsfertig / Prêt à l'emploi
<b>AQUA</b>	distilled Water / destilliertes Wasser / eau distillée	<b>SUB</b>	Substrate / Substrat / substrat
<b>CONJ</b>	Conjugate / Konjugat / Conjugate	<b>STOP</b>	stop solution / Stopplösung / Solution d'arrêt
<b>CONT</b>	manufactured by / Hergestellt von / fabriqué par	<b>WASH</b>	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado
<b>CAL</b>	Kalibrator / Calibrator	<b>STAB</b>	Stable peroxide solution / Stabile Peroxidlösung / Solution stable de peroxyde



**PRODUCT DESCRIPTION**

**INTENDED USE**

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

**COMPOSITION**

1. ELISA test strips (1x6 for 48T. and 2x6 for 2x48T.), with 8 wells each, coated with a monoclonal anti ADAMTS13, directed against the CUB domain; the drying agent is supplied in an aluminium bag.
2. Washing buffer concentrate (PBS; pH 7.3); containing detergent; 0.01% merthiolate; 1 vial, 100 mL.
3. Incubation buffer (PBS; pH 7.3); contains stabiliser protein; 0.01% merthiolate; and dye, 1 vial, 100 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 or the batch table.
5. High and low control plasma; lyophilised; 1 vial each; 0.5 mL. Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial or the batch table.
6. Activity substrate; 1 vial for 48T., 2 vials for 2x48T.; 3 mL each, lyophilised;
7. Conjugate: anti-ADAMTS-13 POX; dyed blue; 1 vial, 0.3 mL.
8. Antigen substrate: 1 vial, 6 mL,
9. Stable peroxyde solution; 1 vial, 0.7 mL
10. Stop solution for antigen substrate: 1 vial; 6 mL; ready to use.
11. Adhesive film: for ELISA test strips; 2 pieces.

**MATERIAL REQUIRED** (not supplied with the kit)

1. Distilled water
2. Measuring cylinder (1000 mL)
3. Precision pipettes (50, 100 and 1000 µL)
4. Variable pipette (100 and 1000 µL)
5. Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
6. ELISA washer
7. Fluorescence reader, with suitable wavelength ranges, see references 11, 12. Please note that monochromators and some fluorescence reader brands are not recommended for this assay. The list of available applications can be found under [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

**WARNING AND PRECAUTIONS**

- IVD for *in vitro* diagnostic use
- 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 for Antigen Substrate may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents (merthiolate). Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes!

**STABILITY AND STORAGE**

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

Stability after reconstitution/opening:

Material/Reagent	State	Storage	Stability
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	-20 °C	6 months
ELISA test strip	after opening	2 ... 8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	expiry date
Washing buffer conc.	after opening	2 ... 8°C	6 months
Washing buffer	1+9 dilution of concentrate	2 ... 8 °C	3 weeks
Incubation buffer	after opening	2 ... 8 °C	2 months
<b>Activity substrate</b>	After reconstitution	-20 °C	2 months
Conjugate	after opening	2 ... 8 °C	6 months
	working solution	room temperature	60 minutes
<b>Antigen substrate</b>	After opening	2 ... 8 °C	2 years
Stable peroxyde solution	After opening	2 ... 8 °C	2 years
Antigen substrate working solution	9+1 mixture of substrate and stable peroxyde solution	room temperature	24 hours
Antigen substrate stop solution	After opening	2 ... 8 °C	2 years

**TEST PROCEDURE**

**PREPARATION OF THE SAMPLES**

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

**PREPARATION OF REAGENT**

1. Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
2. Please note: maximum 6 strips (48T.) can be measured per assay.
3. Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 9 parts by volume distilled water (1+9). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at 37°C within 10 minutes.
4. 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 reconstituted calibrators and controls.

Reconstituted components are clear to slightly turbid.

5. Samples are used undiluted
6. Reconstituting **activity substrate**: activity substrate is reconstituted with **3 mL** distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes stored in the dark (vortex mixer)

No dilution is necessary for reconstituted activity substrate.

The activity substrate has to be used immediately after end of reconstitution time.

7. 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 10 µL conjugate with 500 µL incubation buffer

8. Prepare **antigen substrate** working solution (9+1): mix 9 parts antigen substrate with 1 part stable peroxyde solution

For 8 test wells: Mix 450 µL antigen substrate with 50 µL stable peroxyde solution

**PERFORMANCE OF THE TEST**

<b>SAMPLE INCUBATION</b> (reference 1,2,3,5, 10,13)	Pipette <b>calibrators, control plasmas, samples</b> into test wells; cover test strips with film	<b>50 µL</b>
	Incubate at <b>room temperature</b>	<b>120 minutes (2 hours)</b>
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	<b>Washing buffer</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>ACTIVITY MEASUREMENT</b> (reference 1,2,6,9,11)	<b>Activity substrate</b>	<b>50µl</b>
	Measure kinetic at <b>30°C ; 340/450 nm;</b>	<b>15 minutes (1 measurement per minute)</b>
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	<b>Washing buffer</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>CONJUGATE REACTION</b> (reference 1,2)	Pipette <b>conjugate working solution</b> into wells, cover test strip with film	<b>50 µL</b>
	Incubate at <b>room temperature</b>	<b>60 minutes</b>
<b>WASHING</b> (reference 1,3,4)	<b>Washing buffer</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>ANTIGEN-SUBSTRATE REACTION</b> (reference 1,2,8)	Pipette <b>antigen substrate working solution</b> into test wells, cover test strip with film	<b>50 µL</b>
	Incubate at <b>30°C or 37°C</b>	<b>15 minutes</b>
<b>STOPPING</b> (reference 1,2)	Pipette <b>stopping solution</b> into wells	<b>50 µL</b>
<b>ANTIGEN MEASUREMENT</b> (reference 7,12)	Read end point, <b>325/410 nm;</b>	shake 10 sec., measure within 5 min.

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 reactions 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 pipettes.

- Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
- After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
- Maximum 6 strips can be measured in one assay.
- For BioTek FLx800 sensitivity for Activity measurement has to be set to 130-150 so that measured value of Calibrator 1 is in a range of ~300-700 RFU/min.
- For BioTek FLx800 sensitivity for Antigen measurement has to be set to 40-60 so that measured value of Calibrator 1 is in a range of ~300-700 RFU.
- For antigen determination substrate incubation is possible at 30°C or 37°C.
- The kinetic reading has to be started immediately after pipetting the activity substrate to the plate**
- For using the TECHNOZYM ADAMTS-13 evaluation software the plate layout has to be chosen as indicated:  
Standards have to be measured in duplicate, the duplicates placed in columns, one below the other. Controls and samples can be measured as single values but it is recommended to do them in duplicate as well. If done as duplicate, they also have to be placed one below the other. Plate layout has to be followed strictly as evaluation program can't work properly otherwise.
- Activity measurement: suitable wavelength range for excitation 320-360nm and for emission 440-460nm.  
For BioTek reader FLx800 TBI: 360/460nm for excitation/emission.
- Antigen measurement: suitable wavelength range for excitation 315-340nm and for emission 370-470nm.  
For BioTek reader FLx800 TBI: 360/460nm for excitation/emission.
- A calibration curve has to be created for every assay

## LIMITATION OF THE TEST

- It can not be excluded that certain forms of ADAMTS-13 (with mutations in the CUB domains) are not equivalently measured due to reduced binding to the capture antibody on the plate.
- As ADAMTS13 is a metalloprotease, EDTA plasma exhibits a significant loss of activity.
- Thrombin is reported to degrade ADAMTS13. Therefore serum samples should be avoided.
- Please note that monochromators and some fluorescence reader brands are not recommended for this assay. The list of available applications can be found under [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

## ANALYSES RESULTS

### CALCULATION OF THE RESULTS

#### Activity Determination

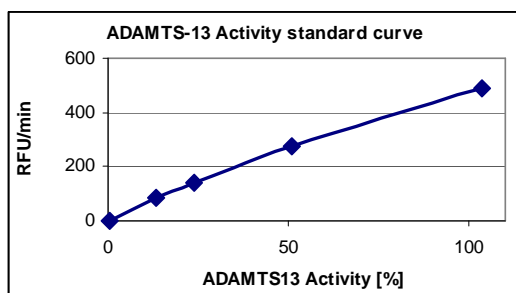
Setting up a reference curve: X axis: ADAMTS13 Activity [%]  
Y axis: RFU/min (slope of kinetic curve)

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

#### Assessment of reference curve:

- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated values for high and low control.
- Coefficients of variation of duplicates shouldn't exceed 15%

#### Example of standard curve



\* Y-axis scaling can be different dependent on the fluorescence reader used. This calibration curve was generated using a BioTek FLx800 TBI.

#### Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve
- If there are samples with RFU/min higher than that of the highest point of 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.

## Antigen Determination

#### Setting up a reference curve:

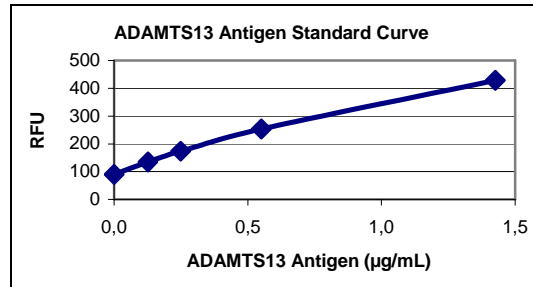
- X axis: concentration ADAMTS-13 antigen [µg/mL]
- Y axis: relative fluorescence units (RFU)

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

#### Assessment of reference curve

- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated values for high and low control.
- Coefficients of variation of duplicates shouldn't exceed 15%

#### Example of standard curve



\* Y-axis scaling can be different dependent on the fluorescence reader used. This calibration curve was generated using a BioTek FLx800 TBI reader.

#### Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve.
- If there are samples with relative fluorescence units (RFU) 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.

#### Evaluation software

The software "TECHNOZYM® ADAMTS-13 evaluation software" for both, Activity and Antigen determination will be provided on request ([sales@technoclone.com](mailto:sales@technoclone.com)) or as download under [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

It is recommended to use this evaluation software in combination with the BioTek reader FLx800 TBI (equipped with KC4 or Gen 5 software).

## REFERENCE RANGE

Normal range for ADAMTS-13 Activity: 50-150% (n=142)

Normal range for ADAMTS-13 Antigen concentration: 0.60 – 1.60 µg/mL (n=159)

Normal range can vary depending on local population. It is recommended that individual laboratories establish their own normal. When interpreting the serological results the history of the patient has to be taken into account.

## STANDARDISATION

For ADAMTS13 activity, calibrators and controls are calibrated against a pool of at least 300 normal donors defined as having 100% ADAMTS13 activity.

For ADAMTS13 Antigen concentration, calibrators and controls are calibrated against purified recombinant ADAMTS13 protein diluted in ADAMTS13 depleted plasma.

## LITERATURE

- Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 2005 Sep;12(5):384-9.
- Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hematol.* 2004;407-423.
- Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y et al. FRETs-vWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J Haematol.* 2005 Apr; 129(1):93-100.
- Kokame K, Matsumoto M, Fumimura Y et al. vWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):607-12.
- Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):21773-8.
- Sadler JE. A new name in thrombosis. ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99: 11552-11554.
- Dong JF, Moake JL, Molasco L et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002 Dec 1, 100(12):4033-9.
- Fontana S, Hovinga JA, Stundt JD, Alberio L, Lammler B 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 Jan, 41(1):48-59.

## PRODUKTBESCHREIBUNG

### ANWENDUNG

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

### ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (1x6 für 48T. oder 2x6 für 2x48T.): mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit monoklonalem anti-ADAMTS13, der gegen die CUB-Domänen gerichtet ist; mit Trocknungsmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- Waschpufferkonzentrat: (PBS; pH 7,3); detergentshaltig; 0,01% Merthiolat; 1 Fl.; 100 ml.
- Inkubationspuffer: (PBS; pH 7,3); enthält Stabilisatorprotein; 0,01% Merthiolat; und Farbstoff; 1 Fl.; 100 ml; gebrauchsfertig
- Kalibratoren (Standards): nummeriert von 1 bis 5; lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5 ml. Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten oder der beigelegten Wertetabelle.
- Hohe und niedrige Kontrollplasmen, lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5 ml. Die chargenabhängigen Konzentrationen entnehmen Sie bitte den Flaschenetiketten oder der beigelegten Wertetabelle
- Aktivitätssubstrat: 1 Fl (48 T.) oder 2 Fl (2x48 T.); je 3 ml; lyophilisiert
- Konjugat: anti-ADAMTS-13 POX; blaugefärbt; 1 Fl.; 0,3 ml
- Antigensubstrat: 1 Fl., 6 ml,
- Stabile Peroxidlösung: 1 Fl.; 0,7 ml
- Stopplösung für Antigensubstrat: 1 Fl.; 6 ml, gebrauchsfertig
- Abklebefolien: für ELISA-Teststreifen; 2 Stk.

### BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest.
- Messzylinder (1000 ml)
- Präzisionspipetten (50, 100 und 1000 µl)
- Variable Pipette (100 und 1000 µl)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µl)
- ELISA-Waschgerät
- Fluoreszenz-Reader, mit geeigneten Filterpaaren siehe Hinweise 11, 12 Bitte beachten Sie, dass Monochromatoren und bestimmte Fluoreszenz Reader Marken für diesen Test nicht geeignet sind. Eine Liste der erhältlichen Readerapplikationen finden Sie unter [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

### WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur Anwendung als *in vitro* Diagnostikum
- 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 für Antigensubstrat kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel (Merthiolat). Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

### LAGERUNG UND STABILITÄT

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

Stabilität nach Rekonstitution/nach Öffnen:

Material/Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
Kalibratoren, Kontrollplasmen	nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
ELISA-Teststreifen	nach Öffnen	2 ... 8 °C mit Abklebefolie in Alubeutel mit Trockenmittel	Verfallsdatum
Waschpufferkonzentrat	nach Öffnen	2 ... 8°C	6 Monate
Waschpuffer	1+9 Verdünnung des Konzentrats	2 ... 8 °C	3 Wochen
Inkubationspuffer	nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Monate
Aktivitätssubstrat	Nach Rekonstitution	-20 °C	2 Monate
Konjugat	nach Öffnen	2 ... 8 °C	6 Monate
	Gebrauchslösung	Raumtemperatur	60 Minuten
Antigensubstrat	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Jahre
Stabile Peroxidlösung	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Jahre
Antigensubstrat Arbeitslösung	9+1 Mischung von Antigensubstrat und Stabile Peroxidlösung	Raumtemperatur	24 Stunden
Antigensubstrat Stopplösung	nach Öffnen	2 ... 8 °C	2 Jahre

## TESTDURCHFÜHRUNG

### VORBEREITUNG DER PROBEN

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

### VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Bitte beachten: in einem Testdurchgang können maximal sechs Streifen (48T) getestet werden.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 9 Volumenteilen Aqua dest. Verdünnen (1+9). 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 sind gebrauchsfertig und müssen nicht weiter verdünnt werden!

- Proben werden nicht verdünnt!
- Rekonstitution des **Aktivitätssubstrats**: Aktivitätssubstrat wird mit 3 mL Aqua dest rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 min, 10 Sekunden gemischt (Probenmischer).

Aktivitätssubstrat ist gebrauchsfertig, keine weitere Verdünnung notwendig!

Das Aktivitätssubstrat muss unmittelbar nach Ende der Rekonstitutionszeit verwendet werden.

- Herstellen der Konjugatgebrauchslösung (1+50): 1 Volumenteil Konjugat mit 50 Volumenteilen Inkubationspuffer verdünnen.

Für 8 Testvertiefungen : 10 µL Konjugat mit 500 µL Inkubationspuffer mischen.

- Herstellen der **Antigensubstrat Arbeitslösung** (9+1): 9 Volumenteile Antigensubstrat mit 1 Volumenteile stabiler Peroxidlösung mischen

Für 8 Testvertiefungen: 450 µL Antigen Substrat mit 50 µL stabiler Peroxidlösung mischen

### TESTVERFAHREN

PROBEN-INKUBATION (Hinweise 1,2,3,5,10,13)	Kalibratoren, Kontrollplasmen, Proben in Testvertiefungen pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	50 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	120 Minuten (2 Stunden)
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
AKTIVITÄTSMESSUNG (Hinweise 1,2,6,9,11)	Aktivitätssubstrat	50µl
	Kinetische Messung bei 30°C; 340/450 nm	15 Minuten (1 Messung pro Minute)
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
KONJUGAT-REAKTION (Hinweise 1,2)	Konjugatgebrauchslösung in Testvertiefungen pipettieren. Teststreifen mit Folie abdecken	50 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	60 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 200 µL
ANTIGEN-SUBSTRAT-REAKTION (Hinweis 1,2,8)	Antigen Substrat Arbeitslösung in Testvertiefungen pipettieren; Teststreifen mit frischer Folie abdecken	50 µL
	Bei 30°C oder 37°C inkubieren	15 Minuten
STOPPEN (Hinweise 1,2)	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	50 µL
ANTIGEN-MESSUNG (Hinweis 7,12)	Endpunktmessung, 325/410 nm	10 Sek. schütteln, Messung innerhalb von 10 Min.

### HINWEISE

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
  - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probenmischer
  - Durchführung von Doppelbestimmungen
  - Inkubation bei der korrekten Temperatur (RT: Raumtemperatur; 20 - 25°C)
  - Genaue 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% variiert werden.
  - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der Kalibratoren/Kontrollplasmen/Proben bzw. Konjugatlösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.

- Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
3. Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
  4. Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden.
  5. Es können maximal 6 Streifen pro Assay gemessen werden.
  6. Für den BioTek Reader FLx800 die Sensitivität bei der Aktivitätsmessung auf 130-150 festlegen, so dass der Wert des Standards 1 in einem Bereich von ~300-700 RFU/min liegt.
  7. Für den BioTek Reader FLx800 die Sensitivität bei der Antigenmessung auf 40-60 festlegen, so dass der Wert des Standards 1 in einem Bereich von ~300-700 RFU liegt.
  8. Die Inkubation des Antigensubstrates ist sowohl bei 30°C als auch bei 37°C möglich.
  9. **Die kinetische Messung muss sofort nach dem Pipettieren des Aktivitätssubstrats auf die Platte gestartet werden.**
  10. Um die TECHNOZYM ADAMTS-13 Auswertesoftware zu verwenden muss das Plattenlayout wie folgt gewählt werden:  
Standards müssen in Doppelbestimmung gemessen werden, wobei die 2 Werte der Doppelbestimmung in einer Reihe untereinander platziert werden müssen. Kontrollen und Proben können in Einzelbestimmung gemessen werden. Es wird jedoch empfohlen, auch diese in Doppelbestimmung zu messen. Falls sie in Doppelbestimmung gemessen werden, müssen sie wie die Standards auch, in einer Reihe untereinander platziert werden.  
Eine strikte Einhaltung des Plattenlayouts ist absolut notwendig, da das Auswerteprogramm andernfalls nicht ordnungsgemäß arbeiten kann.
  11. Aktivitätsmessung: geeignete Wellenlängen für Anregung 320-360nm und für Emission 440-460.  
Für den BioTek Reader FLx800 TBI: 360/460nm für Anregung/Emission
  12. Antigenmessung: geeignete Wellenlängen für Anregung 315-340nm und für Emission 370-470nm.  
Für den BioTek Reader FLx800 TBI: 360/460nm für Anregung/Emission.
  13. Für jeden Test muss eine neue Standardkurve erstellt werden.

## TESTEINSCHRÄNKUNGEN

- Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche Formen von ADAMTS-13 (mit Mutationen in den CUB-Domänen) eine geringere Affinität zu dem Bindungsantikörper auf der Platte besitzen und daher deren Konzentration nicht absolut vollständig bestimmt werden kann.
- Da ADAMTS13 eine Metalloprotease ist, kann EDTA Plasma zu einem signifikanten Verlust an ADAMTS-13 Aktivität führen.
- ADAMTS13 kann durch Thrombin gespalten werden, daher sollten Serumproben vermieden werden.
- Bitte beachten Sie, dass Monochromatoren und bestimmte Fluoreszenz Reader Marken für diesen Test nicht geeignet sind. Eine Liste der erhältlichen Readerapplikationen finden Sie unter [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

## ANALYSENERGEBNISSE

### BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

#### Aktivitätsbestimmung:

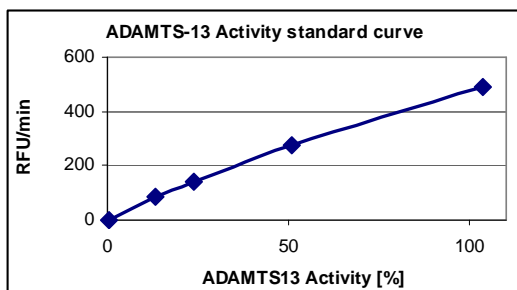
Erstellung der Bezugskurve: x-Achse: ADAMTS-13 Aktivität [%]  
y-Achse: RFU/min (Steigung der Kinetikkurve)

Bezugskurve ist linear-linear. Werte mittels „cubic spline“ oder Punkt zu Punkt verbinden.

#### Beurteilung der Bezugskurve:

- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden
- Variationskoeffizienten bei Doppelwerten sollten einen Wert von 15% nicht überschreiten

#### Beispiel einer Standardkurve:



\* Die Skalierung der Y-Achse kann in Abhängigkeit vom verwendeten Fluoreszenzreader anders als die hier gezeigte sein. Diese Kalibrationskurve wurde mittels BioTek FLx800 TBI generiert.

#### 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.

## Antigenbestimmung:

#### Erstellung der Bezugskurve:

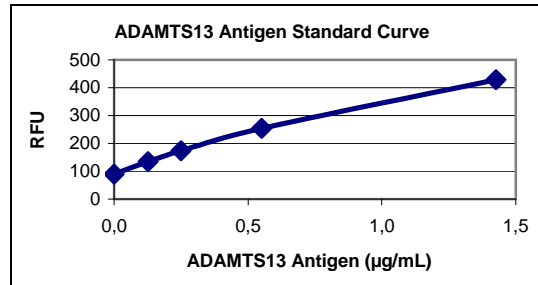
- x-Achse: ADAMTS-13 Antigenkonzentration (µg/mL)
- y-Achse: relative fluorescence units (RFU)

Bezugskurve ist linear-linear. Werte mittels „cubic spline“, linear oder Punkt zu Punkt verbinden.

#### Beurteilung der Bezugskurve:

- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden
- Variationskoeffizienten bei Doppelwerten sollten einen Wert von 15% nicht überschreiten.

#### Beispiel einer Standardkurve:



\* Die Skalierung der Y-Achse kann in Abhängigkeit vom verwendeten Fluoreszenzreader von der hier gezeigte abweichen. Diese Kalibrationskurve wurde mittels BioTek FLx800 TBI generiert.

#### 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.

#### Auswertungssoftware:

Die „TECHNOZYM® ADAMTS-13 Auswertungssoftware“ für beides, Aktivitäts- und Antigenbestimmung wird auf Anfrage bereitgestellt ([sales@technoclone.com](mailto:sales@technoclone.com)) oder kann von der Webseite [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com) direkt heruntergeladen werden.

Es wird empfohlen diese Auswertungssoftware in Kombination mit dem BioTek Reader FLx800 TBI (ausgestattet mit KC4 oder Gen5 Software) zu verwenden.

## REFERENZBEREICH

Normalbereich für ADAMTS-13 Aktivität: 50-150% (n=142)

Normalbereich für ADAMTS-13 Antigen Konzentration: 0,60 - 1,60µg/mL (n=159)

Der Normalbereich kann in Abhängigkeit von der lokalen Bevölkerung variieren. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich bestimmt. Die Beurteilung und Interpretation der serologischen Ergebnisse darf nur durch entsprechendes Fachpersonal erfolgen. Dabei muss die Patientenanamnese berücksichtigt werden.

## STANDARDISIERUNG

Für die ADAMTS13 Aktivitätsbestimmung sind die Kalibratoren und Kontrollen gegen einen Pool von mindestens 300 Normalspendern kalibriert, welcher mit einer Konzentration von 100% ADAMTS13 Aktivität definiert ist.

Für die ADAMTS13 Antigenkonzentration werden die Kalibratoren und Kontrollen gegen gereinigtes rekombinantes ADAMTS13 Protein, verdünnt in ADAMTS13 depletiertem Plasma, kalibriert.

## LITERATUR

- Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 2005 Sep;12(5):384-9.
- Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hematol.* 2004 407-423
- Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y et al. FRETS-vWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J Haematol.* 2005 Apr; 129(1):93-100.
- Kokame K, Matsumoto M, Fumimura Y et al. vWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):607-12
- Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):21773-8.
- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11552-11554.
- Dong JF, Moake JL, Molasco L et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002 Dec 1, 100(12):4033-9
- Fontana S, Hovinga JA, Stundt JD, Alberio L, Lammler B 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 Jan, 41(1):48-59

## DESCRIPTION DU PRODUIT

### UTILISATION PRÉVUE

Le test ELISA TECHNOZYM® ADAMTS-13 est un test pour la détermination de l'activité et du niveau antigénique d'ADAMTS-13. ADAMTS-13 est l'enzyme responsable du clivage du facteur de von Willebrand (vWF) sous des conditions de flux sanguin. Un défaut fonctionnel d'activité de cette enzyme conduit à la présence d'isoformes de haut poids moléculaires de vWF, et ainsi à une aggrégation accrue des plaquettes principalement dans les zones de microvasculature. Ceci est la cause majeure connue du purpura thrombotique thrombocytopenique (PTT)

### CONTENU

1. Barrettes ELISA (1x6 pour 48T. et 2x6 pour 2x48T.), avec 8 micropuits chacune, coatées avec un anticorps monoclonal anti-ADAMTS13, dirigé contre le domaine CUB; l'agent dessiccant est fourni dans un sachet d'aluminium.
2. Tampon de lavage concentré (PBS; pH 7.3); contenant du détergent; 0.01% merthiolate; 1 flacon, 100 mL.
3. Tampon d'incubation (PBS; pH 7.3); contenant un stabilisateur de protéine; 0.01% merthiolate; et colorant, 1 flacon, 100 mL, prêt à l'emploi.
4. Calibreurs (Standards) numérotés de 1 à 5; lyophilisés; 1 flacon chacun; 0.5 mL. Les concentrations sont lot-spécifiques; consulter l'étiquette sur le flacon ou sur la table incluse dans le paquet.
5. Contrôles plasmatiques haut et bas; lyophilisés; 1 flacon chacun; 0.5 mL. Les concentrations sont lot-spécifiques; consulter l'étiquette sur le flacon
6. Substrat d'activité; 1 flacon pour 48T., 2 flacons pour 2x48T.; 3 mL chacun, lyophilisés;
7. Conjugué: anti-ADAMTS-13 POX; colorant bleu; 1 flacon, 0.3 mL.
8. Substrat antigène: 1 flacon, 6 mL,
9. Solution stable de peroxyde; 1 flacon, 0.7 mL
10. Solution d'arrêt de la réaction de l'antigène: 1 flacon; 6 mL; prêt à l'emploi.
11. Film adhésif: Pour les bandelettes de test ELISA; 2 pièces.

### MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

1. Eau distillée
2. Éprouvette graduée (1000 mL)
3. Pipettes de précision (50, 100 and 1000 µL)
4. Pipettes (100 and 1000 µL)
5. Pipettes multicanaux (100 and 200 µL)
6. Laveur de plaque ELISA ou pipette multicanaux
7. Lecteur à Fluorescence, muni des filtres adéquats, voir références 11, 12. Il est à noter que les lecteurs monochromatiques, ainsi que certains lecteurs ne sont pas recommandés. La liste des applications disponibles peut être trouvée sur le [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com)

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Diagnostique in vitro.
- 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 appliquées 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 ½ 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.

### STABILITÉ ET STOCKAGE

La date d'expiration des réactifs sur les flacons concernent uniquement le stockage des flacons non ouverts à +2 ... 8°C.

Stabilité après reconstitution/après ouverture:

Matériel/réactif	état	Stockage	Stabilité
Calibreurs et contrôles	après reconstitution	-20 °C	6 mois
Barrettes de tests ELISA	après ouverture	2... 8 °C sous film adhésif avec agent détissant dans un	date de péremption
Tampon de lavage concentré	après ouverture	2 ... 8°C	6 mois
tampon de lavage	diluer le concentré 1+9	2 ... 8 °C	3 semaines
tampon d'incubation	après ouverture	2 ... 8 °C	2 mois
<b>Substrat d'activité</b>	après reconstitution	-20 °C	2 mois
Conjugué	après ouverture	2 ... 8 °C	6 mois
	Tampon d'incubation	Température ambiante	60 minutes
<b>Substrat antigène</b>	après ouverture	2 ... 8 °C	2 ans
Solution stable de peroxyde	après ouverture	2 ... 8 °C	2 ans
Substrat antigène Solution de travail	9+1 mélange du substrat et solution stable peroxyde	temperature ambiante	24 heures
solution arrêt du substrat antigène	après ouverture	2 ... 8 °C	2 ans

## PROCEDURE DU TEST

### PREPARATION DES ECHANTILLONS

Echantillons: Plasma humain citraté. Les échantillons peuvent être stockés pendant 3 heures à température ambiante. À -20°C ils peuvent être stockés pendant plusieurs mois. Les échantillons ne doivent pas être congelés et réchauffés un trop grand nombre de fois.

### PREPARATION DES RÉACTIFS

1. Avant de commencer le test amener tous les composants du test à température ambiante.
2. Notez qu'un maximum de 6 barrettes (48T) peut être mesuré par série.
3. Préparer le tampon de lavage: Diluer 1 volume de tampon de lavage concentré avec 9 volumes d'eau distillée (1+9). Bien mélanger! (le tampon de lavage dilué est le tampon de lavage utilisé durant le test). Il peut y avoir un précipité de cristaux qui se dissolvent à 37°C en 10 minutes.
4. Reconstituer les calibreurs et contrôles plasmatiques: Calibreurs et contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée et vortexés pendant 10 secondes après un temps de reconstitution de 15 minutes.  
Calibreurs et contrôles sont prêts à l'emploi. aucune dilution n'est nécessaire.  
Les composants reconstitués peuvent être clairs ou légèrement turbides.  
Les échantillons sont utilisés non dilués.
5. Reconstituer le **substrat d'activité**: Le substrat d'activité est reconstitué avec 3 mL d'eau distillée et vortexer pendant 10 secondes après un temps de reconstitution de 15 minutes à l'obscurité.  
Le substrat d'activité est prêt à l'emploi. aucune dilution n'est nécessaire.  
Le substrat d'activité doit être utilisé immédiatement après la fin du temps de reconstitution.
7. Diluer le conjugué (1+50): Diluer 1 volume de conjugué avec 50 volumes de tampon d'incubation.

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

8. Diluer le **substrat antigène** (9+1): diluer 9 volumes de substrat antigène avec 1 volume de solution stable de peroxyde.

**Pour 8 puits : Mélanger 450 µL de substrat d'antigène avec 50 µL de solution stable de peroxyde**

### PERFORMANCE DU TEST

<b>INCUBATION DES ECHANTILLONS</b> (Points 1,2,3,5, 10,13)	Pipeter les <b>calibreurs, contrôles plasmas, échantillons</b> dans les puits de test; couvrir les barrettes de test avec du film adhésif	<b>50 µL</b>
	Incuber à <b>température ambiante</b>	<b>120 minutes (2 heures)</b>
<b>LAVAGE</b> (références 1,3,4)	<b>Tampon de lavage</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>MESURE DE L'ACTIVITÉ</b> (références 1,2,6,9,11)	<b>Substrat d'activité</b>	<b>50µl</b>
	Lecture cinétique à <b>30°C ; 360/460 nm;</b>	<b>15 minutes (1 mesure/min)</b>
<b>LAVAGE</b> (références 1,3,4)	<b>Tampon de lavage</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>REACTION DU CONJUGUE</b> (référence 1,2)	Pipeter la <b>solution de conjugué dilué</b> dans les puits, couvrir les barrettes avec du film adhésif	<b>50 µL</b>
	Incuber à <b>température ambiante</b>	<b>60 minutes</b>
<b>LAVAGE</b> (références 1,3,4)	<b>Tampon de lavage</b>	<b>3 x 200 µL</b>
<b>REACTION DU SUBSTRAT DE L'ANTIGÈNE</b> (références 1,2,8)	Pipeter la solution diluée de <b>substrat de l'antigène</b> dans les puits, couvrir les barrettes avec du film adhésif	<b>50 µL</b>
	Incuber à <b>30°C ou 37°C</b>	<b>15 minutes</b>
<b>ARRÊT</b> (références 1,2)	Pipeter la <b>solution d'arrêt</b> dans les puits	<b>50 µL</b>
<b>MESURE</b> (références 7,12)	Lecture en point final, <b>325/410 nm;</b>	Remuer 10 sec., mesurer pendant 5 min.

### References

1. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être utilisés ensemble
2. La précision et la performance parmi d'autres dépendent essentiellement des facteurs suivants:
  - Vortexer toutes les produits utilisés pour la dilution, 10 sec.
  - Tester les calibreurs, les contrôles et les échantillons en double.
  - Incuber à la température indiquée (température ambiante, 20...25°C)
  - Stricte observation de l'ordre du pipetage et des temps comme indiqué
  - Les temps pour l'incubation de l'échantillon, les réactions du conjugué et du substrat comme indiqué commencent après avoir pipeté le dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas excéder ± 5%.
  - Durant l'incubation de l'échantillon et la réaction du conjugué, le temps nécessaire pour pipeter les calibreurs, contrôles et plasma ne doit pas excéder 60 secondes.
  - Durant la réaction du substrat, et durant son arrêt, le temps requis pour pipeter le substrat et la solution d'arrêt ne doit pas excéder 10 secondes par barrette. Pour cela utiliser une pipette multicanaux.
3. Marquer les barrettes avec un stylo résistant à l'eau au cas où celles-ci tombent accidentellement du cadre durant le test.

- Après le dernier lavage, les puits doivent être vidés. Pour cela retourner la plaque et la tapoter sur du papier absorbant de façon à enlever les traces de tampon de lavage restant.
- 6 barrettes au maximum peuvent être mesurées lors d'une série de tests.
- Sur le lecteur BioTek FLx800, pour la mesure de l'Activité, régler la sensibilité sur 130-150, de façon à ce que la valeur obtenue pour le calibrateur 1 soit comprise entre 300-700 RFU.
- Sur le lecteur BioTek FLx800, pour la mesure de l'Antigène, régler la sensibilité sur 40-60, de façon à ce que la valeur obtenue pour le calibrateur 1 soit comprise entre 300-700 RFU.
- Pour la détermination de l'antigène, l'incubation du substrat peut être réalisée à 30°C ou 37°C.
- La lecture cinétique doit commencer immédiatement après le pipetage du substrat d'activité.**
- L'utilisation du logiciel d'évaluation TECHNOZYM ADAMTS-13 nécessite le positionnement des échantillons, standards et contrôles dans les puits de la plaque comme suit:  
Les standards doivent être placés en double, en colonne, l'un en dessous de l'autre. Les contrôles et échantillons peuvent être déterminés en simple mais il est recommandé de les tester aussi en double. S'ils sont testés en double, ils doivent aussi être placés l'un en dessous de l'autre. L'ordre de dépôt sur la plaque doit être strictement respecté pour le bon fonctionnement du programme.
- Pour la mesure de l'activité: la longueur d'onde adaptée pour l'excitation se situe entre 320 et 360nm et pour l'émission entre 440 et 460nm.  
(Sur le lecteur BioTek FLx800 TBI: 360/460nm pour l'excitation / émission)
- Pour la mesure de l'antigène: la longueur d'onde adaptée pour l'excitation se situe entre 315 et 340nm et pour l'émission entre 370 et 470nm.  
(Sur le lecteur BioTek FLx800 TBI: 360/460nm pour l'excitation / émission)
- Une courbe de calibration doit être réalisée à chaque série.

## LIMITES DU TEST

- Il n'est pas exclu que certaines formes d'ADAMTS-13 (présentant des mutations au niveau des domaines CUB) ne soient pas mesurées de manière équivalente dû à la liaison réduite de l'anticorps de capture coaté sur la plaque.
- Comme l'ADAMTS 13 est une métalloprotéase, les plasmas sur EDTA présentent une perte significative d'activité.
- Il a été montré que la thrombine dégradait l'ADAMTS 13. Ainsi les échantillons de sérum doivent être évités.
- Il est à noter que les lecteurs monochromatiques, ainsi que certains lecteurs ne sont pas recommandés. La liste des applications disponibles peut être trouvée sur le [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com)

## RESULTATS D'ANALYSES

### CALCUL DES RESULTATS

#### Détermination de l'activité

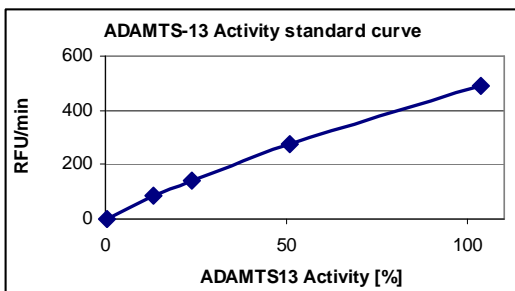
Établir une courbe de référence: axe X: Activité ADAMTS13 [%]  
axe Y: RFU/min  
(pente de la courbe cinétique)

Le graphe est linéaire-linéaire avec cubic spline ou point to point fit.

#### Evaluation de la courbe de référence:

- La validité du test doit être établi sur la base des valeurs calculée pour les contrôles haut et bas.
- Les coefficients de variation des dupliqués de doivent pas excéder 15%.

#### Exemple de courbe de calibration



\* L'échelle de l'axe des Y peut être différent en fonction du lecteur fluorescent utilisé. Cette courbe de calibration a été obtenue sur un lecteur BioTek FLx800 TBI.

#### Mesurer la concentration des échantillons

- Établir la concentration à partir de la courbe de référence.
- Dans le cas où des échantillons présenteraient une activité en RFU/min plus importante que celle du calibrateur le plus élevé, ils doivent être pré-dilués avec le tampon d'incubation (1+1 ou 1+3). La concentration mesurée doit alors être multipliée avec les facteurs de dilution 2 ou 4 respectivement.

## Détermination de l'antigène

#### Établir une courbe de référence:

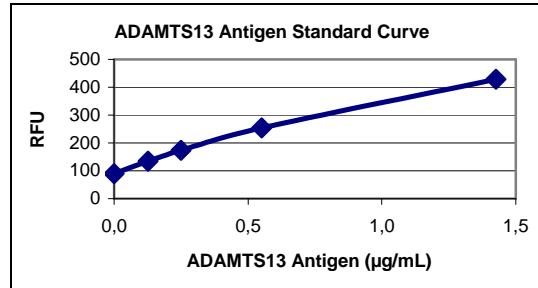
- axe X: concentration antigénique (µg/ml) d'ADAMTS-13
- axe Y: Unités de fluorescence relatives (RFU)

Le graphe est linéaire-linéaire avec cubic spline ou point to point fit.

#### Evaluation de la courbe de référence:

- La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées pour les contrôles haut et bas.
- Les coefficients de variation ne doivent pas excéder 15%

#### Exemple de courbe de référence



\* L'échelle de l'axe des Y peut être différent en fonction du lecteur fluorescent utilisé. Cette courbe de calibration a été obtenue sur un lecteur BioTek FLx800 TBI.

#### Mesurer la concentration des échantillons

- Établir les concentrations à partir de la courbe de référence.
- Au cas où des échantillons présenteraient une valeur en RFU supérieure à la valeur du plus haut standard, ils doivent être pré-dilués avec le tampon d'incubation (1+1, ou 1+3). La concentration mesurée alors doit être multipliée par le facteur de dilution 2 or 4, respectivement.

#### Programme d'évaluation

Le programme d'évaluation "TECHNOZYM® ADAMTS-13 évaluation software" pour le test d'activité et la détermination antigénique sera fourni sur demande ([sales@technoclone.com](mailto:sales@technoclone.com)) ou [www.technoclone.com](http://www.technoclone.com).

Il est recommandé d'utiliser ce programme d'évaluation avec le Biotek Reader FLx800 TBI qui est équipé avec le programme GEN 5 ou KC4.

## VALEUR DE REFERENCE

Gamme normale d'activité d'ADAMTS-13: 50-150% (n=142)

Gamme normale de concentration antigénique d'ADAMTS-13: 0,60 - 1,60 µg/mL (n=159)

Les valeurs normales peuvent varier en fonction de la population étudiée.

Il est recommandé pour chaque laboratoire d'établir sa propre gamme. Lors de l'interprétation des résultats il est recommandé de tenir compte de l'historique du patient.

## STANDARDISATION

Concernant l'activité ADAMTS 13, les calibrateurs et les contrôles sont étalonnés à partir d'un pool d'au moins 300 donneurs normaux ayant 100% d'activité ADAMTS 13. Concernant la concentration en antigènes ADAMTS 13, les calibrateurs et les contrôles sont étalonnés à partir d'une protéine recombinante ADAMTS 13, diluée en plasma dépleté en ADAMTS 13.

## LITTÉRATURE

- Miyata T, Kokame K, Banno F. Measurement of ADAMTS13 activity and inhibitors. *Curr Opin Hematol.* 2005 Sep;12(5):384-9.
- Sadler JE, Moake JL, Miyata T, George JN. Recent advances in Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. *Hematol.* 2004 407-423
- Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y et al. FRETs-vWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J Haematol.* 2005 Apr; 129(1):93-100.
- Kokame K, Matsumoto M, Fumimura Y et al. vWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):607-12
- Majerus EM, Anderson PJ, Sadler JE. Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor. *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):21773-8.
- Sadler JE. A new name in thrombosis, ADAMTS13. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11552-11554.
- Dong JF, Moake JL, Molasco L et al. ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood.* 2002 Dec 1, 100(12):4033-9
- Fontana S, Hovinga JA, Stundt JD, Alberio L, Lammler B 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 Jan, 41(1):48-59