

IMUBIND® ADAMTS13 ELISA

REF

 813

EC

REP

Obelis s.a
Bd. Général Wahis 53, 1030 Brussels, BELGIUM

INTENDED USE

The IMUBIND® ADAMTS13 ELISA is intended for the measurement of ADAMTS13 protein in human plasma. The assay is intended for *in vitro* diagnostic use.

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 disorder caused by the development of autoantibodies to ADAMTS13 that inhibit its activity or 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 MAb Anti-Human ADAMTS13 Coated Microwells**, 96, with acetate cover sheet
- R2 Assay Buffer**, 15 mL, 3 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)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

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.

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. Avoid splashing or aerosol formation.

Assay Buffer	Danger		CONT Ethylenediaminetetraacetic acid trisodium salt, Polyethylene glycol octylphenol ether H318, H412, P280, P273, P305 + P351 + P338, P310
Detection Antibody	Warning		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Enzyme Conjugate	Warning		CONT 2-methyl-4-isothiazol-3-one H317, P261, P272, P280, P302 + P352, P333 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	Warning		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

Hazard Statements: H317 May cause an allergic skin reaction.

H318 Causes serious eye damage.

H319 Causes serious eye irritation.

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary Statements: P261 Avoid breathing mist or vapor.

P264 Wash thoroughly after handling.

P272 Contaminated work clothing must not be allowed out of the workplace.

P273 Avoid release to the environment.

P280 Wear eye protection/face protection. Wear protective gloves.

P302 + P352 If on skin: Wash with plenty of water.

P305 + P351 + P338 If in eyes: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P310 Immediately call a poison center/doctor.

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P337 + P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

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

R1 MAb Anti-Human ADAMTS13 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 Detection Antibody to 10 mL in Assay Buffer. If all 96 microwells are not to be used, dilute 20 µL of Detection Antibody 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 and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008. 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 sulfuric 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 using one of the following methods (Step 3a or 3b below). The concentrations of the serially diluted standard will be 100, 50, 25, 12.5, 6.25 or 3.12 ng/mL, respectively.
- 3a. Well Dilution Method:** Add 200 µL of 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. Add 100 µL of Assay Buffer to wells G1/G2 which serves as the 0 ng/mL standard.

3b. Microcentrifuge Tube Dilution Method. Pipette 225 µL Assay Buffer into 5 appropriate sized tubes, which are labeled 50, 25, 12.5, 6.25 or 3.12 ng/mL. Add 225 µL of Standard into the tube labeled 50 ng/mL and mix. Remove 225 µL of the diluted Standard from the 50 ng/mL tube and add this to 25 ng/mL tube and mix. Continue this process until all the tubes have diluted Standard. Transfer 100 µL of undiluted Standard to wells A1 and A2. Transfer 100 µL of the diluted Standard from the 50 ng/mL tube to wells B1 and B2. Similarly, transfer the remainder of the tubes with diluted Standard to the successive wells of the plate. Add 100 µL of Assay Buffer to wells G1 and G2, which serves as the 0 ng/mL standard.

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.

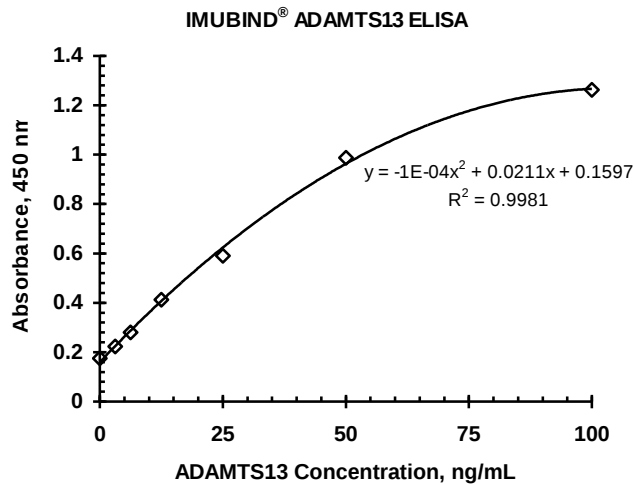
QUALITY CONTROL

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 BioMedica Diagnostics.
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 ist für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

ADAMTS13, auch als Willebrand Factor (vWF) spaltende Protease bekannt, ist eine Zink Metalloproteinase die ultragroße vWF Multimer (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 Multimeren binden an Thrombozyten-Rezeptoren und führen so zu einer Thrombozytenaggregation und intravaskulären Thrombosen.

Die familiäre TTP ist eine seltene vererbte 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 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 monoklonalen 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.

REAGENZIEEN

- R1 Antikörper-beschichtete Mikrotiterstreifen**, 96 Vertiefungen, mit Acetat-Abdeckfolie
- R2 Testpuffer**, 15 mL, 3 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 zugelassenen 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.

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.

Assay Buffer	Gefahr		CONT Ethylenediaminetetraacetic acid trisodium salt, Polyethylene glycol octylphenol ether H318, H412, P280, P273, P305 + P351 + P338, P310
Detection Antibody	Achtung		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Enzyme Conjugate	Achtung		CONT 2-methyl-4-isothiazol-3-one H317, P261, P272, P280, P302 + P352, P333 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	Achtung		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

Gefahren H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Aussagen: H318 Verursacht schwere Augenschäden.

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Sicherheitshinweise: P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

P264 Nach Gebrauch gründlich waschen.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352 BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P305 + P351 + P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P333 + P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

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 Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008. 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. Fünf serielle Verdünnungen des ADAMTS13 Standards ansetzen wie unter 3a oder 3b angegeben. Die Konzentration der seriell verdünnten Standards ist 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml
- 3a. **Verdünnung in der Mikrotiterplatte:** 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. Je 100 µL Testpuffer in die Vertiefungen G1/G2 pipettieren (Nullwert, 0 ng/mL).

3b. Verdünnung in Mikrozentrifugenröhrchen: 225 µL Testpuffer in 5 Röhrchen pipettieren und die Röhrchen kennzeichnen mit 50, 25, 12.5, 6.25 oder 3.12 ng/ml. 225 µl des Standards in das Röhrchen, das mit 50 ng/ml gekennzeichnet ist pipettieren und mischen. 225 µl des verdünnten 50 ng/ml Röhrchen in das mit 25 ng/ml gekennzeichnete Röhrchen pipettieren und mischen. Diesen Vorgang wiederholen bis zum Röhrchen 3.12 ng/ml. Je 100 µl aus dem unverdünnten Standardfläschchen in die Vertiefungen A1/A2 pipettieren. Je 100 µL aus dem 50 ng/ml Röhrchen in die Vertiefung B1/B2 pipettieren, dann je 100µl aus dem 25 ng/ml Röhrchen in die Vertiefungen C1/C2 pipettieren usw. bis alle Standards in die Mikrotiterplatte übertragen sind. Je 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.

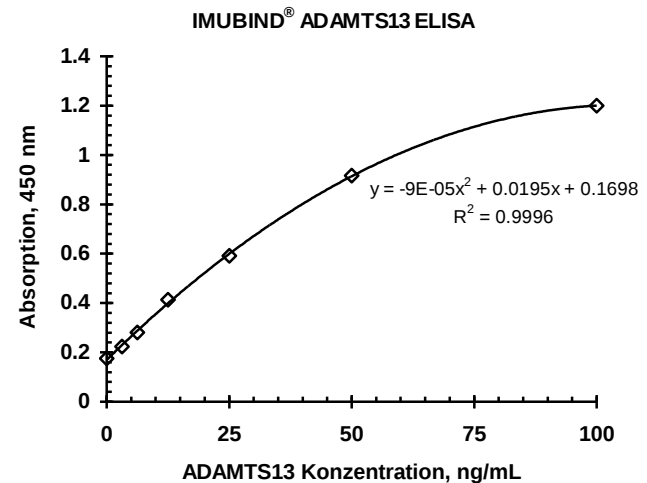
QUALITÄTSKONTROLLE

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 Normalspendern (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. Unpublierte Daten von BioMedica Diagnostics.
9. Peyvandi, F., et al. *Brit J Haematol* 2004, **127**: 433-439.
10. Starke, R., et al. *Brit J Haematol* 2006, **136**: 649-655.

FRANÇAIS

UTILISATION

Le coffret IMUBIND® ADAMTS13 ELISA est destiné à la mesure de la protéine ADAMTS13 dans le plasma humain.

RESUME

L'ADAMTS13, également connu sous le nom de protéase de clivage du facteur von Willebrand (VWF), est une métalloprotéinase zinc dépendante, qui clive les très grands multimères vWF (vWF-UL (Ultra large)) au niveau Tyr (1605)-Met (1606) situé dans la région A2 du vWF.¹ Des études ont montré qu'une faible activité de l'ADAMTS13 est associée à un purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT), une complication hématologique potentiellement mortelle caractérisée par une numération plaquettaire très abaissée, une thrombose microvasculaire, la fragmentation des globules rouges, des complications du système nerveux central et rénales.^{2,3} Un déficit ou une faible activité de l'ADAMTS13 (<5%) peut conduire à une accumulation de multimères UL-vWF.⁴ Les multimères UL-vWF se lient à des récepteurs plaquettaires induisant l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombose intravasculaire.

Le PTT congénital est une maladie héréditaire rare résultant de mutations du gène de l'ADAMTS13. Des altérations génétiques ont été identifiées dans de nombreux sites du gène de l'ADAMTS13 et aboutissent à la production d'une protéine non-fonctionnelle de l'ADAMTS13.^{5,6} La forme acquise du PTT est une maladie de type auto-immune causée par le développement des auto-anticorps dirigés contre l'ADAMTS13, qui inhibent son activité, ce qui peut entraîner une diminution du taux d'antigène.⁷⁻⁹

PRINCIPE DE LA METHODE

Les échantillons de plasma dilués sont ajoutés aux puits de la plaque ELISA «coatés» avec un anticorps monoclonal qui se lie à ADAMTS13. Au cours de l'incubation, l'ADAMTS13 de l'échantillon se lie à l'anticorps. Après une étape de lavage, un anticorps de lapin polyclonal biotinylé anti-ADAMTS13 est ajouté dans les puits et se lie à la protéine ADAMTS13 immobilisée sur la plaque. Un conjugué streptavidine-peroxydase (SA-HRP) est ajouté dans les puits pour compléter la formation du complexe de détection anticorps-enzyme. Après à une autre étape de lavage, l'ajout d'un perborate-3, 3'-5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) qui va réagir avec la peroxydase génère une solution de couleur bleue. La réaction est arrêtée par addition d'acide sulfurique, qui transforme la coloration en jaune. L'absorbance à 450 nm est mesurée et le taux est déterminé par rapport à la courbe d'étalonnage générée.

REACTIFS

- R1** Plaque ELISA de 96 puits coatés avec l'anticorps et recouverte d'une feuille d'acétate
- R2** Tampon de dilution, 15 ml, 3 flacons (lyophilisés)
- R3** Standard ADAMTS13, 100 ng/ml, 0,6 ml, 2 flacons (lyophilisés)
- R4** Contrôle positif, 0,25 ml, 2 flacons (lyophilisés)
- R5** IgG de lapin pour la détection, biotinylé, et spécifique de l'ADAMTS13 humain, 120 µl
- R6** Conjugué peroxydase, SA-HRP, 120 µl
- R7** Substrat, TMB, 11 mL
- R8** Solution de lavage, PBS avec 0,05% Tween 20, pH 7,4, 1 L (lyophilisé)

ATTENTION

Les matériaux utilisés pour certains réactifs de cette trousse sont d'origine humaine. Ils ont été testés comme non réactifs pour l'hépatite B (HBsAg), l'hépatite C (VHC) et le virus d'immunodéficience humaine de type 1 et type 2 (VIH-1, VIH-2) à l'aide de méthodes approuvées par la FDA.

Comme aucune méthode connue ne peut donner l'assurance absolue que les produits dérivés du sang humain ne transmettront pas l'HBsAg, le VHC, le VIH-1, le VIH-2 ou d'autres agents pathogènes véhiculés par le sang, ces réactifs doivent être manipulés comme recommandé pour tout spécimen humain potentiellement infectieux. Jeter tous les déchets associés et réactifs d'origine humaine dans un conteneur pour déchets biologiques dangereux.

Pour usage de diagnostique in vitro. Ne convient pas à l'usage interne chez les humains ou les animaux. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de la date de péremption indiquée. Ne pas mélanger les réactifs provenant de kits différents. Éviter toute contamination microbienne des réactifs. Ne pas fumer, manger ou boire dans les zones où des échantillons ou des réactifs du coffret sont manipulés. Ne pas pipeter les réactifs à la bouche. Porter une blouse et des gants jetables durant toute la procédure d'essai et se laver les mains après. Éviter toute élaboussure ou la formation d'aérosols.

Assay Buffer	danger		CONT Ethylenediaminetetraacetic acid trisodium salt, Polyethylene glycol octylphenol ether H318, H412, P280, P273, P305 + P351 + P338, P310
Detection Antibody	attention		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Enzyme Conjugate	attention		CONT 2-methyl-4-isothiazol-3-one H317, P261, P272, P280, P302 + P352, P333 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	attention		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

- Mentions de danger:**
- H317 Peut provoquer une allergie cutanée.
 - H318 Provoque des lésions oculaires graves.
 - H319 Provoque une sévère irritation des yeux.
 - H412 Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
- Les conseils de prudence:**
- P261 Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/ aérosols.
 - P264 Se laver soigneusement après manipulation.
 - P272 Les vêtements de travail contaminés ne devraient pas sortir du lieu de travail.
 - P273 Éviter le rejet dans l'environnement.
 - P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/ du visage.
 - P302 + P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 - P305 + P351 + P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
 - P310 Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
 - P333 + P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
 - P337 + P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.

PREPARATION DES REACTIFS ET CONSERVATION

Les réactifs non ouverts et lyophilisés, conservés conformément aux instructions, sont stables jusqu'à la date de péremption imprimée sur la boîte.

- R1 Puits coatés avec l'anticorps:** Une fois retirées de la pochette, les barrettes doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées entre 2-8°C pendant 4 semaines, lorsqu'elles sont scellées dans leur sachet d'origine avec un déshydratant, à l'abri de toute humidité.
- R2 Tampon de dilution:** Reconstituer avec 15 ml d'eau déminéralisée filtrée ou d'eau stérile. Mélanger délicatement le contenu du flacon. Le tampon peut être utilisé pendant un maximum de 4 semaines s'il est conservé entre 2-8°C.
- R3 Standard ADAMTS13:** Reconstitué avec 0,6 ml de tampon. Le plasma standard peut être aliquoté et conservé à -20°C pendant un maximum de 6 mois. Les standards sont préparés avec du plasma normal calibré avec un ADAMTS13 recombinant.
- R4 Contrôle positif:** Reconstituer avec 0,25 ml de tampon. Une fois reconstitué, le contrôle peut être conservé jusqu'à 4 semaines à -20°C.
- R5 Anticorps de détection:** Fourni concentré, il est à diluer au 1/100 avec du tampon juste avant l'utilisation. Pour utiliser l'ensemble des 96 puits en même temps, diluer 100 µl d'anticorps de détection dans 10 ml de tampon. Si les 96 puits ne sont pas utilisés, diluer 20 µL d'anticorps de détection dans 2 ml de tampon pour chaque barrette de 16 puits à utiliser. La solution de travail est stable 4 heures à 2-8°C. Jeter le réactif non utilisé.
- R6 Conjugué peroxydase, SA-HRP:** Fourni concentré il est à diluer au 1/100 avec le tampon juste avant utilisation. Pour utiliser l'ensemble des 96 puits en même temps, diluer 100 µl de conjugué dans 10 ml de tampon. Si les 96 puits ne sont pas utilisés, diluer 20 µL de conjugué dans 2 ml de tampon pour chaque barrette de 16 puits à utiliser. La solution de travail est stable 2 heures à 2-8°C. Jeter le réactif non utilisé.
- R7 Substrat TMB :** Prêt à l'emploi. Peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon lorsqu'il est conservé dans l'obscurité entre 2 -8°C.
- R8 Solution de lavage :** Dissoudre le contenu du sachet dans 1 litre d'eau déminéralisée filtrée/eau distillée. Après reconstitution, le tampon de lavage peut être utilisé durant 4 semaines si conservé entre 2-8°C.

RECUEIL DES ECHANTILLONS ET PREPARATION

Seuls les plasmas pauvres en plaquettes prélevés sur citrate peuvent être utilisés pour ce test. Ne pas utiliser d'EDTA. Voir "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008. La collecte des plasmas doit être effectuée comme suit:

1. Prélever 9 volumes de sang dans 1 volume de solution anticoagulante de citrate trisodique à 3,2% (0,109 M).
2. Centrifuger l'échantillon 15 mn à 10,000 g.
3. Le plasma doit être conservé entre 2-8°C et utilisé dans les 4 heures. Alternativement, le plasma peut être conservé à -20°C pendant un maximum de 6 mois.
4. Les Plasmas congelés doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis conservés entre 2-8°C et analysés dans les 4 heures.

PROCEDURE

Matériel fourni – Voir Réactifs

Matériel nécessaire mais Non Fourni

Eau déminéralisée filtrée ou eau distillée

Pipette multi canaux de 50 à 300µl

Pipettes réglables 0-20µl, 20-200µL, 200-1000µl

Un lecteur de microplaques (longueur d'onde 450 nm)

Agitateur et laveur de microplaques (en option)

H₂SO₄ 0.5M **Attention:** Utiliser l'acide sulfurique avec précaution. Eviter tout contact avec la peau et les yeux. Porter des lunettes de protection et des gants lors de la manipulation.

Préparation du standard ADAMTS13

1. Ouvrir le sachet et retirer les barrettes avec le cadre. Remettre les barrettes qui ne seront pas utilisées dans la pochette et la refermer hermétiquement avec le déshydratant à l'intérieur. Conserver à 2-8°C.
2. Réconstituer le standard ADAMTS13 comme décrit dans la section "Préparation des réactifs". Préparer cinq dilutions du standard ADAMTS13 en série comme indiqué sous 3a ou 3b. Les concentrations des dilutions en série seront respectivement de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 ng/ml.

3a. Dilution par microplaque:

Pipeter 200 µl de standard dans les puits A1 et A2. Ajouter 100 µl de tampon aux puits B1/B2 – F1/F2. Diluer le standard en série en pipettant 100 µl de standard des puits A1/A2 vers les puits B1/B2. Homogénéiser et pipeter 100 µl des puits B1/B2 vers les puits C1/C2. Répéter l'opération jusqu'aux puits F1/F2. Retirer et jeter 100 µl des puits F1/F2. Ajouter 100 µl de tampon aux puits G1/G2 pour obtenir un standard à 0 ng/ml.

3b. Dilution par des microtubes centrifuges:

Pipeter 225 µl de tampon dans cinq tubes centrifuges et marquer les de 50, 25, 12.5, 6.25 ou 3.12 ng/ml. Ajouter 225 µl de standard au tube marqué de 50 ng/ml et homogénéiser. Ensuite pipeter 225 µl du contenu dilué du tube marqué de 50 ng/ml vers le tube marqué de 25 ng/ml et homogénéiser. Répéter la procédure jusqu'au tube marqué de 3.12 ng/ml. Ajouter 100 µl du standard non-dilué aux puits A1/A2. Pipeter 100 µl du contenu du tube marqué de 50 ng/ml vers les puits B1/B2, ensuite 100 µl du tube marqué de 25 ng/ml vers les puits C1/C2 etc. jusqu'à ce que tous les standards seront transférés à la microplaque. Ajouter 100 µl de tampon aux puits G1/G2 pour obtenir un standard à 0 ng/ml.

Procédure

4. Diluer chaque échantillon de plasma au 1/20 (1 volume de plasma + 19 volumes de tampon). Ajouter 100 µl de contrôle positif ou d'échantillon dilué dans les puits, couvrir avec la feuille d'acétate et incubé pendant 1 heure à 37°C.
5. Vider le contenu des puits et laver 4 fois avec le tampon de lavage. Le lavage peut être effectué soit en utilisant un laveur de microplaques ou manuellement. Pour un lavage manuel, remplir les puits de tampon de lavage avec une pipette, puis vider et éliminer les gouttelettes en frappant la plaque 4-5 fois, face vers le bas, contre un papier absorbant.
6. Ajouter 100 µl d'anticorps de détection à chaque puits, recouvrir avec la feuille d'acétate et incubé les puits pendant 30 minutes à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur de microplaques orbital avec agitation (à 250 tr/min).
7. Laver les puits en répétant l'étape n° 5.
8. Ajouter 100 µl de conjugué dilué dans chaque puits, couvrir la plaque et incubé 30 minutes à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur de microplaques orbital avec agitation (à 250 tr/min).
9. Laver les puits en répétant l'étape n° 5.
10. Ajouter 100 µl de substrat dans chaque puits immédiatement après l'étape de lavage, couvrir les puits avec la feuille d'acétate et incubé pendant 5 minutes à température ambiante (18-25°C). Une couleur bleue se développe.

11. Arrêter la réaction enzymatique par addition de 50 µl d'H₂SO₄ 0,5 M dans chaque puits. Ajouter l'acide à la même vitesse et dans le même ordre que pour le substrat. Tapoter les côtés de la microplaque pour assurer une bonne répartition de l'H₂SO₄. La couleur de la solution devient jaune. Lire les absorbances sur un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 450 nm dans les 10 minutes.

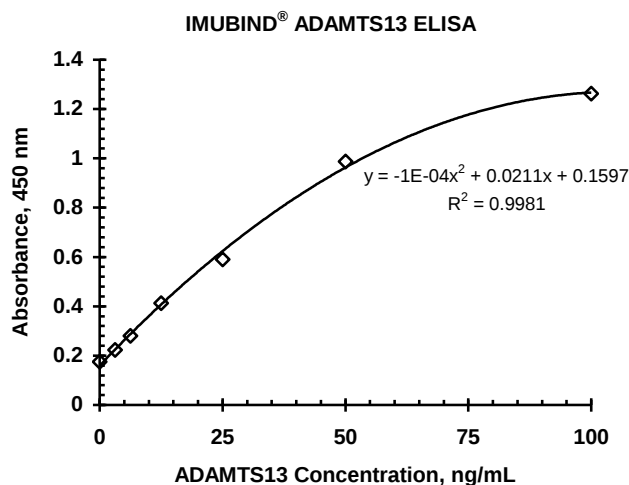
CONTROLE DE QUALITE

Le plasma de contrôle positif doit être inclus à chaque fois que le dosage est réalisé.

RESULTATS

Tracer la courbe d'étalonnage en reportant la valeur d'absorbance moyenne pour chaque standard en fonction de sa concentration correspondante d'ADAMTS13. Tracer une courbe d'étalonnage chaque fois que le dosage est réalisé. La courbe d'étalonnage ci-dessous est fournie à titre d'exemple uniquement.

Courbe standard



CALCULS

Déterminer le taux d'ADAMTS13 dans l'échantillon de plasma dilué par interpolation directement à partir de la courbe standard. Comme l'échantillon a été dilué au 1/20 lors de sa préparation, multiplier les résultats par 20 pour obtenir la concentration d'ADAMTS13 dans l'échantillon de plasma pur.

$$[\text{ADAMTS13}]_{\text{plasma échantillon}} = [\text{ADAMTS13}]_{\text{échantillon dilué}} \times 20$$

LIMITES DE LA PROCEDURE

La contamination des échantillons de plasma par les plaquettes peut interférer sur les résultats du test. Les échantillons de plasma doivent être exempts de plaquettes afin d'avoir un résultat valide. Prélever avec précaution le plasma lors de la récupération du plasma pauvre en plaquettes. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés plus de deux fois.

Les échantillons ne doivent pas être prélevés sur anticoagulant EDTA. Les plasmas ictériques, lipémiques et hémolysés peuvent interférer avec le dosage.

VALEURS ATTENDUES

Le taux moyen d'ADAMTS13 dans le plasma citraté de donneurs sains (n = 49) a été déterminé à 740±110 ng/ml.⁸ Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs normales en utilisant la population locale.

Dans le plasma de patients atteints de PTT acquis, le taux moyen d'ADAMTS13 a été établi à 244±121 ng/ml (n = 16), sensiblement inférieur au niveau normal. Certains patients atteints de PTT congénital avaient des niveaux d'ADAMTS13 en-dessous de la limite de détection de la technique ELISA.^{9,10}

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCES

Précision

Les coefficients de variation intra-et inter-essai (CV) pour cette technique ELISA ont été trouvés respectivement à 4,0% et 7,3%.

Spécificité

Les anticorps de capture et de détection sont très spécifiques de l'ADAMTS13 humain.

BIBLIOGRAPHIE

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 BioMedica Diagnostics.
9. Peyvandi, F., et al. *Brit J Haematol* 2004, **127**: 433-439.
10. Starke, R., et al. *Brit J Haematol* 2006, **136**: 649-655.

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El ensayo IMUBIND® ADAMTS13 ELISA está concebido para medir la proteína ADAMTS13 en el plasma humano. El ensayo ha sido previsto para el diagnóstico *in vitro*.

EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

La ADAMTS13, también conocida como la proteasa disociadora del factor de von Willebrand (vWF), es una metaloproteína de zinc que descompone los multímeros ultra grandes vWF (UL-vWF) en el enlace Tyr(1605)-Met(1606) localizado en la región A2 del vWF.¹ Estudios de investigación han evidenciado que bajos niveles de actividad de la ADAMTS13 están asociados a la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), una afección hemorrágica grave caracterizada por un reducido recuento plaquetario, trombosis microvascular, fragmentación de los glóbulos rojos así como complicaciones renales y del sistema nervioso central.^{2,3} Una deficiencia de la actividad de la ADAMTS13 (<5%) puede conducir a una acumulación de multímeros ultra grandes vWF.⁴ Los multímeros ultra grandes vWF se ligan a los receptores de las plaquetas induciendo la agregación plaquetaria y la formación de trombosis intravasculares.

La TTP congénita es un trastorno hereditario muy poco frecuente resultado de mutaciones en el gen de la ADAMTS13. Las alteraciones genéticas han sido identificadas en muchos sitios dentro del gen de la ADAMTS13, lo que puede conducir a la producción de una proteína ADAMTS13 que no es funcional.^{5,6} La forma adquirida de TTP es un trastorno autoinmunitario causado por el desarrollo de autoanticuerpos contra la ADAMTS13 que inhiben su actividad o que pueden causar una reducción de los niveles de antígenos.⁷⁻⁹

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las muestras diluidas de plasma se añaden a los micropocillos recubiertos de un anticuerpo monoclonal que se une a la ADAMTS13. Durante un periodo de incubación, la ADAMTS13 de la muestra se une al anticuerpo con el que se encuentran revestidos los pocillos. Tras un paso de lavado, se añade a los micropocillos un anticuerpo policlonal biotilado de conejo contra la ADAMTS13, el mismo que se une a la proteína ADAMTS13 capturada en la placa durante un breve periodo de incubación. A fin de concluir la formación del complejo de detección de la enzima anticuerpo, se añade a los micropocillos un conjugado de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP). Tras un paso adicional de lavado, la adición de un sustrato de perborato-3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y su reacción subsecuente con la HRP presente genera una solución de color azul. La reacción se detiene agregando ácido sulfúrico lo que hace que la solución se torne amarilla. Midiendo la absorbancia a 450 nm y extrapolando el valor con los de una curva estándar se determina el valor de la ADAMTS13 en la muestra diluida de plasma.

REACTIVOS

- R1 Placa de microtitulación revestida de anticuerpo monoclonal contra la ADAMTS13 humana**, de 96 pocillos, con cubierta de acetato
- R2 Búfer de ensayo**, 15 mL, 3 viales (lío-filizado)
- R3 Estándar ADAMTS13**, 100 ng/mL, 0,6 mL, 2 viales (lío-filizado)
- R4 Control positivo**, 0,25 mL, 2 viales (lío-filizado)
- R5 Anticuerpo de detección**, IgG de conejo biotilado contra la ADAMTS13 humana, 120 µL
- R6 Conjugado enzimático**, SA-HRP, 120 µL
- R7 Substrato**, TMB, 11 mL
- R8 Búfer de lavado**, PBS con Tween 20 al 0,05%, pH 7,4, 1 L (lío-filizado)

ADVERTENCIA

El material de partida de algunos de los reactivos contenidos en este kit son de origen humano. Haciendo uso de los métodos aprobados por la FDA, se ha verificado que este material no es reactivo ante el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), del virus de la hepatitis C (HCV) y del virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 y 2 (HIV-1, HIV-2). Ya que no existe ningún método conocido que garantice completamente que los productos derivados de la sangre humana no transmitan los virus HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 u otros agentes patógenos transmitidos a través de la sangre, se deberá manipular los reactivos según las recomendaciones aplicables a las muestras humanas potencialmente infecciosas. Todos los residuos vinculados con las muestras usadas en el ensayo y los reactivos de origen humano se deberán desechar en un contenedor para residuos biológicos.

Únicamente para el uso *in vitro*. No se deberá usar internamente en humanos ni animales. Los componentes del kit no deberán utilizarse después de la fecha de caducidad especificada. No se deberá combinar reactivos de kits diferentes. Se deberá evitar la contaminación microbiana de los reactivos. No se deberá fumar, comer ni beber en las áreas en donde se manipulen muestras o reactivos del kit. No se deberá pipetear los reactivos con la boca. Se deberá utilizar bata de laboratorio y guantes desechables durante todo el proceso del ensayo y lavarse las manos esmeradamente después de él. Se deberá evitar salpicaduras y la formación de aerosoles.

Assay Buffer	peligro		CONT Ethylenediaminetetraacetic acid trisodium salt, Polyethylene glycol octylphenol ether H318, H412, P280, P273, P305 + P351 + P338, P310
Detection Antibody	atención		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Enzyme Conjugate	atención		CONT 2-methyl-4-isothiazol-3-one H317, P261, P272, P280, P302 + P352, P333 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	atención		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

Declaraciones peligros:	H317 Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
	H318 Provoca lesiones oculares graves.
	H319 Provoca irritación ocular grave.
	H412 Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
Los consejos de prudencia:	P261 Evitar respirar la niebla/los vapores/el aerosol.
	P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
	P272 Las prendas de trabajo contaminadas no podrán sacarse del lugar de trabajo.
	P273 Evitar su liberación al medio ambiente.
	P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
	P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
	P305 + P351 + P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
	P310 Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACION TOXICOLOGICA o a un médico.
	P333 + P313 En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
	P337 + P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Los reactivos no abiertos y liofilizados son estables hasta la fecha de caducidad especificada en el empaque siempre que se almacenen según se indica.

R1 Placa de microtitulación revestida de anticuerpo monoclonal contra la ADAMTS13 humana: Una vez extraídas de la bolsa de aluminio, las tiras de microtitulación deberán usarse en el transcurso de 30 minutos. Las tiras que no se hubiesen usado podrán almacenarse a una temperatura de 2° a 8°C durante 4 semanas si se encuentran precintadas en la bolsa original con la bolsa de material higroscópico y protegidas de la humedad.

R2 Búfer de ensayo: Reconstituirlo con 15 mL de agua desionizada/destilada. Mezclar suavemente el contenido del vial. El búfer de ensayo podrá utilizarse hasta por 4 semanas si se almacena a una temperatura de 2° a 8°C.

R3 Estándar ADAMTS13: Reconstituirlo con 0,6 mL de búfer de ensayo. El estándar se puede congelar y almacenar a una temperatura de -20°C hasta por 6 meses. El estándar se prepara a partir de plasma normal calibrado según una ADAMTS13 recombinante.

R4 Control positivo: Reconstituirlo con 0,25 mL de búfer de ensayo. Una vez reconstituido, el control podrá almacenarse hasta por 4 meses a -20°C.

R5 Anticuerpo de detección: Se entrega en forma de concentrado. Diluir el anticuerpo de detección en proporción de 1:100 con el búfer de ensayo inmediatamente antes del uso. Para usar los 96 micropocillos de una sola vez, diluir 100 µL del anticuerpo de detección en búfer de ensayo hasta alcanzar 10 mL. Si no hubiesen de usarse todos los 96 micropocillos, diluir 20 µL del anticuerpo de detección en búfer de ensayo hasta alcanzar 2 mL para cada tira de microtitulación

de 16 micropocillos a usarse. El anticuerpo de detección en concentración funcional es estable durante 4 horas a una temperatura de 2° a 8°C. Desechar cualquier anticuerpo de detección de alta eficacia que no se haya utilizado.

R6 Conjugado enzimático, SA-HRP: Se entrega en forma de concentrado. Diluir el conjugado enzimático en proporción de 1:100 con el búfer de ensayo inmediatamente antes del uso. Para usar los 96 micropocillos de una sola vez, diluir 100 µL del conjugado enzimático en búfer de ensayo hasta alcanzar 10 mL. Si no hubiesen de usarse todos los 96 micropocillos, diluir 20 µL del conjugado enzimático en búfer de ensayo hasta alcanzar 2 mL para cada tira de microtitulación de 16 micropocillos a usarse. El conjugado enzimático en concentración funcional es estable durante 2 horas a una temperatura de 2° a 8°C. Desechar cualquier conjugado enzimático de alta eficacia que no se haya utilizado.

R7 Substrato, TMB: Se entrega listo para usar. Se puede utilizar hasta la fecha de caducidad especificada en el vial siempre que se almacene en un lugar oscuro a una temperatura de 2° a 8°C.

R8 Búfer de lavado: Disolver el contenido del paquete en un 1 L de agua desionizada/destilada. Tras la reconstitución, el búfer de lavado podrá utilizarse hasta por 4 semanas si se almacena a una temperatura de 2° a 8°C.

OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

En este ensayo se podrá utilizar únicamente plasma pobre en trombocitos recogido con citrato. No se deberá utilizar plasma tomado con EDTA. Consúltase la directiva "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, 2008. El plasma se deberá tomar de la siguiente manera:

1. Recoger 9 partes de sangre en una parte de solución anticoagulante de citrato trisódico al 3,2% (0,109 M).
2. Centrifugar la muestra de sangre a 10,000 x g durante 15 minutos.
3. El plasma se deberá almacenar a una temperatura de 2° a 8°C y el ensayo se deberá efectuar en un plazo máximo de 4 horas. En lugar de ello, se puede almacenar el plasma a una temperatura de -20°C hasta por 6 meses.
4. El plasma congelado se deberá descongelar rápidamente a una temperatura de 37°C. Los plasmas descongelados se deberán almacenar a una temperatura de 2° a 8°C y el ensayo se deberá efectuar en un plazo máximo de 4 horas.

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados - Ver reactivos

Material necesario que no es parte del suministro

0,22 µm de H₂O filtrada y desionizada

Pipeta múltiple de ocho canales de 50 a 300 µL

Pipetas individuales de 0 a 20 µL, 20 a 200 µL y 200 a 1000 µL

Lector de placas de microtitulación para la lectura de la absorbancia a 450 nm

Agitador orbital para placas de microtitulación

Lavadora de placas de microtitulación (opcional)

0,5 M de H₂SO₄ **Cuidado:** Manipular con extremo cuidado el ácido sulfúrico. Evitar cualquier contacto con la piel y los ojos. Usar gafas y guantes de seguridad durante la manipulación.

Preparación de los estándares ADAMTS13

1. Abrir la bolsa de aluminio y extraer las tiras de microtitulación y el marco. Separar las tiras que no han de usarse y volverlas a colocar en la bolsa de aluminio, precintando bien la bolsa y dejando la bolsa de material higroscópico dentro. Almacenar la bolsa de aluminio a una temperatura de 2 a 8°C.
2. Reconstituir el estándar ADAMTS13 como se indica en el apartado PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS. Preparar cinco (5) disoluciones en serie del estándar usando uno de los siguientes métodos (paso 3a o 3b a continuación). Las concentraciones del estándar diluido en serie serán de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 o 3,12 ng/mL, respectivamente.
- 3a. **Método de dilución en pocillos:** Añadir 200 µL del estándar a los micropocillos A1/A2. Añadir 100 µL del búfer de ensayo a los micropocillos B1/B2 – F1/F2. Diluir en serie el estándar pipeteando 100 µL del estándar de los micropocillos A1/A2 a los micropocillos B1/B2. Mezclar y pipetear 100 µL de los pocillos B1/B2 a los pocillos C1/C2. Repetir este procedimiento hasta los pocillos F1/F2. Sacar y desechar 100 µL de los pocillos F1/F2. Añadir 100 µL del búfer de ensayo a los pocillos G1/G2, lo que servirá de estándar de 0 ng/mL.
- 3b. **Método de dilución en el tubo de microcentrifugación.** Pipetear 225 µL del búfer de ensayo a 5 tubos de tamaño adecuado etiquetados respectivamente 50, 25, 12,5, 6,25 o 3,12 ng/mL. Añadir 225 µL del estándar al tubo etiquetado con 50 ng/mL y mezclar. Sacar 225 µL del estándar diluido del tubo de 50 ng/mL y añadir esto al tubo de 25 ng/mL y mezclar. Continuar con este procedimiento hasta que todos los tubos tengan estándar diluido. Transferir 100 µL del estándar no diluido a los pocillos A1 y A2. Transferir 100 µL del estándar diluido del tubo de 50 ng/mL a los pocillos B1 y B2. De modo similar, transferir el resto de los tubos con estándar diluido a los pocillos sucesivos de la placa. Añadir 100 µL del búfer de ensayo a los pocillos G1 y G2, lo que servirá de estándar de 0 ng/mL.

Procedimiento del ensayo

4. Diluir cada muestra de plasma en proporción de 1:20 (1 parte de plasma + 19 partes de búfer de ensayo). Añadir 100 µL del control positivo o de la muestra diluida a una placa de microtitulación, cubrir con la cubierta de acetato suministrada e incubar durante 1 hora a una temperatura de 37°C.
5. Vaciar el contenido de los micropocillos y lavar 4 veces con el búfer de lavado. El lavado se puede llevar a cabo utilizando una lavadora de placas de microtitulación o de modo manual. Para el lavado manual, llenar los pocillos con el búfer de lavado usando una pipeta o una botella comprimible, vaciar y eliminar las gotitas golpeando suavemente la placa 4 a 5 veces cara abajo contra un material absorbente.
6. Añadir 100 µL del anticuerpo de detección a cada micropocillo, cubrir con la cubierta de acetato e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 a 25°C) en un agitador orbital para placas de microtitulación bajo agitación (a 250 rpm).
7. Lavar los pocillos repitiendo el paso 5.
8. Añadir 100 µL del conjugado enzimático en concentración funcional a cada micropocillo, cubrir con la cubierta de acetato e incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 a 25°C) en un agitador orbital para placas de microtitulación bajo agitación (a 250 rpm).
9. Lavar los pocillos repitiendo el paso 5.
10. Añadir 100 µL de sustrato a cada micropocillo inmediatamente después del paso de lavado, cubrir los pocillos con la cubierta de acetato e incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18° a 25°C), tornándose azul el sustrato durante ese periodo de tiempo.
11. Detener la reacción enzimática añadiendo 50 µL de 0,5M H₂SO₄ a cada micropocillo. Añadir el ácido a la misma velocidad y en el mismo orden en que se añadió el sustrato. Golpear suavemente el marco de los micropocillos para garantizar la distribución uniforme del H₂SO₄. La solución adquirirá un color amarillo. Leer las absorbancias usando el lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm en el transcurso de 10 minutos.

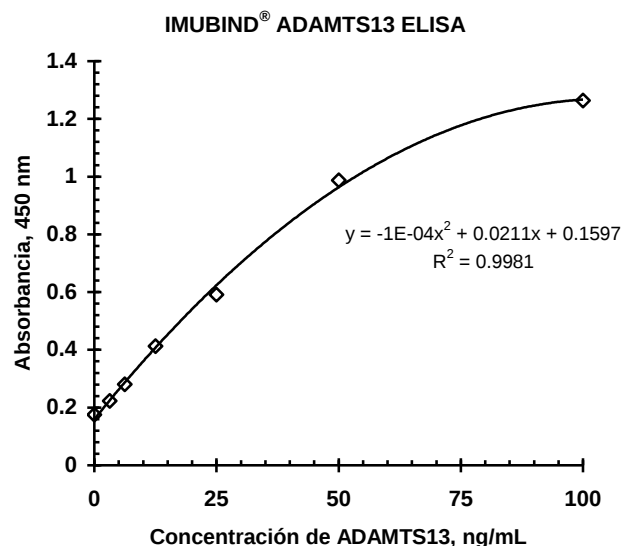
CONTROL DE CALIDAD

Se deberá incluir el plasma de control positivo cada vez que se ejecute el ensayo.

RESULTADOS

Construya una curva estándar marcando el valor medio de absorbancia de cada estándar frente a su correspondiente concentración de ADAMTS13. Se deberá generar una curva estándar cada vez que se ejecute el ensayo. La curva estándar que aparece a continuación sirve únicamente para efectos de demostración.

Curva estándar representativa



CÁLCULOS

Determinar la cantidad de ADAMTS13 en la muestra diluida de plasma mediante interpolación directa a partir de la curva estándar. Ya que la muestra de plasma desconocida se diluye en proporción de 1:20 durante la preparación, multiplicar los resultados por 20 a fin de obtener la concentración de ADAMTS13 en la muestra no diluida de plasma. El cálculo es

$$[\text{ADAMTS13}]_{\text{Muestra de plasma}} = [\text{ADAMTS13}]_{\text{Muestra diluida de plasma}} \times 20$$

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La contaminación por plaquetas en muestras de plasma interferirá con los resultados del ensayo. Las muestras de plasma deberán encontrarse libres de plaquetas a fin de obtener un resultado válido. Se deberá prestar gran esmero en la reducción a un mínimo de la disrupción del sedimento de plaquetas al recuperar el plasma pobre en trombocitos. Las muestras no se deberán congelar y descongelar más de dos (2) veces.

No se deberá obtener las muestras usando EDTA como anticoagulante. Las muestras ictericas, lipémicas y hemolizadas pueden interferir con el ensayo.

VALORES ESPERADOS

El nivel medio de ADAMTS13 en el plasma citratado de donantes normales (n=49) fue de 740 ± 110 ng/mL.⁸ Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites normales usando la población local.

En el plasma de pacientes con TTP adquirida, el nivel medio de ADAMTS13 fue de 244 ± 121 ng/mL (n=16), es decir significativamente más bajo que el nivel normal. Algunos pacientes con TTP congénita tuvieron niveles de ADAMTS13 por debajo del límite de detección del ensayo ELISA.^{9,10}

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión

Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo (CV) para este ensayo ELISA fueron de 4,0% y 7,3% respectivamente.

Especificidad

Los anticuerpos de captura y detección son altamente específicos para la ADAMTS13 humana.

BIBLIOGRAFÍA

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 BioMedica Diagnostics.
9. Peyvandi, F., *et al.* *Brit J Haematol* 2004, **127**: 433-439.
10. Starke, R., *et al.* *Brit J Haematol* 2006, **136**: 649-655.

ENGLISH

DEUTSCH

FRANCAIS

ESPAÑOL

	Definition of Symbols	Bedeutung der Symbole	Definizione dei simboli	Definición de símbolos
	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten	Lire le mode d'emploi	Consulte las instrucciones para el Uso
	Refer to SDS	SDS konsultieren	Reportez-vous à SDS	Consulte SDS
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik	Dispositif de diagnostic médical in vitro	Dispositivo para diagnóstico in vitro
	CE Mark	CE-Siegel	Marque CE	Marcaje CE
	Manufactured by	Hergestellt durch	Fabricant	Fabricado por
	Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern	Conserver à une température de 2°C à 8°C	Conservar entre 2°C y 8°C
	Batch code / Lot number	Charge	Numéro de lot	Número de Lote
	Expiration Date	Verfallsdatum	Date d'expiration	Fecha de expiración
	Catalog number	Katalog-Nr	Numéro de référence dans le catalogue	Número de Catálogo
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertretung für Europa	Représentant européen autorisé	Representante Europeo Autorizado
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	contains	enthält	contient	contiene