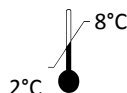


IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA

REF 814



EC

REP

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

INTENDED USE

The IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA is intended for the measurement of ADAMTS13 IgG autoantibodies 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) at the Tyr(1605)-Met(1606) bond 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 or low level of ADAMTS13 activity (<5%) may lead to an accumulation of UL-vWF multimers.⁴ The UL-vWF multimers will 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 and result in the production of non-functional ADAMTS13 protein.^{5,6} The acquired form of TTP is an autoimmune-like disorder caused by the development of autoantibodies to ADAMTS13 that inhibit its activity.⁷ The development of ADAMTS13 autoantibodies has been associated with certain drugs such as ticlopidine, clopidogrel, quinine and cyclosporine.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Diluted plasma samples are added to microwells coated with a full-length recombinant ADAMTS13. During an incubation period, autoantibodies to ADAMTS13 present in the sample will bind to the protein coated to the wells. Following a washing step, a goat anti-human IgG antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP) is added to the microwells and binds to IgG type ADAMTS13 autoantibodies that have bound to the coated microwells. 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 autoantibodies in the diluted plasma sample. ADAMTS13 autoantibody levels are expressed in Arbitrary Units/mL (AU/mL). One AU/mL is equal to 1 µg/mL of affinity purified human anti-ADAMTS13 IgG.

REAGENTS

- R1 ADAMTS13 coated microwells**, 96, with acetate cover sheet
R2 Assay Buffer, 15 mL, 2 vials (lyophilized)
R3 Plasma Standard, 60 AU/mL, 0.45 mL, 2 vials, (lyophilized)
R4 Positive Control, 0.35 mL, 2 vials (lyophilized)
R5 Detection Antibody, goat anti-human IgG-HRP, 140 µL
R6 Substrate, TMB, 11 mL
R7 Wash Buffer, PBS w/0.05% Tween 20, pH 7.4, 1 Liter (lyophilized)

WARNING

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

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

Assay Buffer	Danger (US) Warning (EU)	 	CONT Polyethylene glycol octylphenol ether H317, H319, H334, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P333 + P313, P337 + P313
Detection Antibody	Warning		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	Warning		H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

Hazard Statements:	H317 May cause an allergic skin reaction. H319 Causes serious eye irritation. H334 May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled.
Precautionary statements:	P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/spray. P264 Wash thoroughly after handling. 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. 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 ADAMTS13 Coated Microwells:** Once removed from the foil pouch, the microwells must be used within 30 minutes. Unused microwells may be stored at 2°-8°C for 4 weeks when sealed in the original pouch with the desiccant present, protected from any 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 Plasma Standard:** Reconstitute with 0.45 mL of Assay Buffer and let stand for 10 minutes. Mix prior to use. Standard may be aliquoted and stored at -20°C for up to 6 months.
- R4 Positive Control:** Reconstitute with 0.35 mL of Assay Buffer. Once reconstituted, the control may be stored for up to 4 weeks at -20°C. The control must be diluted 1:2 or 1:4 with Assay Buffer prior to assaying.
- R5 Detection Antibody:** Prepare working strength Detection Antibody by diluting 1:100 with Assay Buffer. For running all 96 microwells at one time, dilute 100 µL of Detection Antibody Conjugate up to 10 mL in Assay Buffer. If all 96 microwells are not to be used, dilute 20 µL of Detection Antibody up to 2 mL in Assay Buffer for each 16 microwell strip that will be used. Working strength Detection Antibody may be stored in the dark for 4 hours at room temperature or for 72 hours at 2°-8°C.
- R6 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.
- R7 Wash Buffer:** Dissolve the contents of the packet with 1 Liter 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. 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

filtered deionized/distilled water

50-300 μ L eight channel multi-pipette

0-200 μ L, 200-1000 μ L single pipettes

microwell plate reader for reading absorbance at 450 nm

microwell plate orbital shaker, microwell plate washer (optional)

0.5 M H_2SO_4 **Caution:** Handle Sulfuric acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Preparing 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 Plasma 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 60, 30, 15, 7.5, 3.75 and 1.87 AU/mL, respectively.
- 3a. **Well Dilution Method:** Add 200 μ L of Standard to microwells A1/A2. Add 100 μ L of Assay Buffer to microwells B1/B2 – F1/F2. Serially dilute the Standard by pipetting 100 μ L of the standard from microwells A1/A2 into microwells B1/B2. Mix and pipette 100 μ L from wells B1/B2 to wells C1/C2. Repeat this process through wells F1/F2. Remove and discard 100 μ L from wells F1/F2. Add 100 μ L of Assay Buffer to wells G1/G2 which serves as the 0 AU/mL standard.
- 3b. **Microcentrifuge Tube Dilution Method.** Pipette 225 μ L Assay Buffer into 5 appropriate sized tubes, which are labeled 30, 15, 7.5, 3.75 or 1.87 AU/mL. Add 225 μ L of Standard into the tube labeled 30 AU/mL and mix. Remove 225 μ L of the diluted Standard from the 30 AU/mL tube and add this to 15 AU/mL tube and mix. Continue this process until all the tubes have diluted Standard. Transfer 100 μ L of undiluted Standard to wells A1 and A2. Transfer 100 μ L of the diluted Standard from the 30 AU/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 μ L of Assay Buffer to wells G1 and G2, which serves as the 0 AU/mL standard.

Assay Procedure

4. Dilute each plasma sample 1:20 (1 part plasma + 19 parts Assay Buffer). Add 100 μ L of Positive Control or diluted sample to a microwell, cover with the acetate sheet and incubate for 2.5 hours at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 500 rpm).
5. Empty the contents of the microwells and wash 4 times with Wash Buffer. Washing may be performed either using microwell plate washing equipment or manually (fill the wells with Wash Buffer with a pipette or squeeze bottle, wait three minutes, empty and remove droplets by tapping the plate 4-5 times face down against absorbing material).
6. Add 100 μ L of Detection Antibody to each microwell, cover with the acetate sheet and incubate the wells for 1 hour at room temperature (18-25°C) on an orbital microwell plate shaker with agitation (at 500 rpm).
7. Wash the wells by repeating Step 5.
8. Add 100 μ L of Substrate to each microwell immediately after the wash step, cover the wells with the acetate sheet and incubate for 10 minutes at room temperature (18°-25°C). A blue color will develop.
9. Stop the enzymatic reaction by adding 50 μ L of 0.5M H_2SO_4 to each microwell. Add the acid with the same speed and order as you added the substrate. Shake the microwells to ensure even distribution of the H_2SO_4 . The solution color will turn yellow. Read the absorbances on a microwell plate reader at a wavelength of 450 nm within 10 minutes.

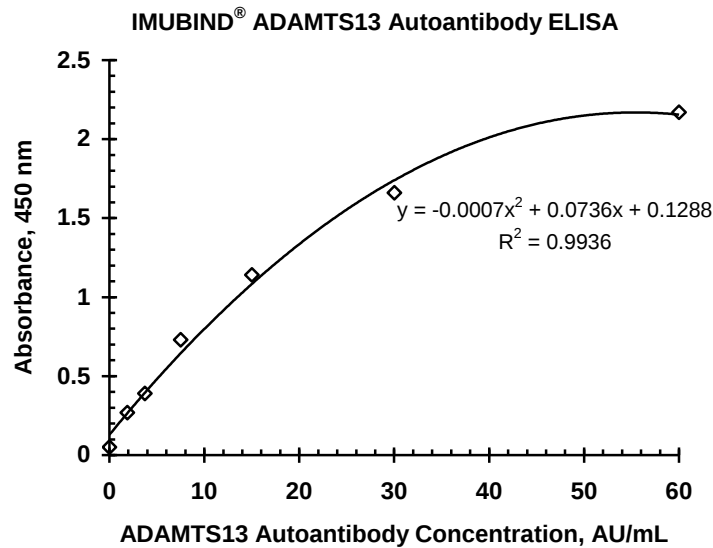
QUALITY CONTROL

The Positive Control plasma should be included each time the assay is run. The Positive Control is diluted at either a 1:2 or 1:4 dilution just prior to assaying. Since control materials are used for the effective monitoring of the performance of a test, each laboratory should use these values to determine out-of-control situations using their own laboratory rules.

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

The level of ADAMTS13 IgG autoantibody in the plasma sample is interpolated directly from the standard curve. Although the sample has been diluted 1:20 in the assay procedure, do not adjust the interpolated value to account for this dilution.

If the value of the sample exceeds the highest standard, dilute the sample further with Assay Buffer and repeat the assay. Account for this further dilution when calculating the value of the neat sample.

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 validated result. Exercise great care in minimizing disruption of the platelet pellet while recovering the platelet poor plasma. Samples should not be frozen and thawed more than two times.

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

EXPECTED VALUES

In a study of 119 normal donor plasmas (n=119), the mean level of ADAMTS13 IgG autoantibodies was found to be 9.0 AU/mL with a 95% reference limit of 26.3 AU/mL.⁸ Each laboratory should establish its own normal range using the local population.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The intra-assay coefficient of variation (CV) for this ELISA has been found to be 6.7%.

Specificity

The detection antibody used is highly specific for human IgG.

TRACEABILITY OF CALIBRATORS AND CONTROL MATERIAL

Information on traceability of calibrators and control material is available upon request.

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.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

The IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA ist ein Test zur Bestimmung von ADAMTS13 Autoantikörpern in humanem Plasma.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

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

Angeborene TTP ist eine seltene Erbkrankheit, die durch eine Mutation im ADAMTS13 Gen verursacht wird. Genetische Veränderungen wurden an vielen Stellen innerhalb des ADAMTS13 Gens lokalisiert, wodurch nicht-funktionales ADAMTS13 Protein gebildet wird.^{5,6} Die erworbene TTP-Form ist eine Autoimmun-Krankheit die durch inhibitorische ADAMTS13 Autoantikörper, die die Enzymaktivität hemmen, hervorgerufen wird.⁷ Die Bildung von ADAMTS13 Autoantikörpern ist mit bestimmten Arzneimitteln, wie Ticlopidin, Clopidogrel, Quinine und Cyclosporin, assoziiert. Die Bestimmung der ADAMTS13 Autoantikörper liefert Informationen, die für die Diagnose und Behandlung von Patienten mit erworbener TTP relevant ist.

TESTPRINZIP

Verdünnte Plasmaproben werden in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen gegeben, die mit rekombinantem "full-length" ADAMTS13 beschichtet sind. Während der anschließenden Inkubation binden die in der Probe vorliegenden ADAMTS13-Autoantikörper an das beschichtete Protein. Nach dem Waschen wird ein Meerrettichperoxidase (HRP)-markierter polyklonaler (Ziegen-) Detektionsantikörper der gegen humanes IgG gerichtet ist zugegeben. Während einer kurzen Inkubationszeit bindet der Antikörper an die an die Platte gebundenen ADAMTS13 Autoantikörper vom IgG Typ. 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 optische Dichte wird bei

450 nm gemessen, die ADAMTS13 Autoantikörper Menge in den verdünnten Plasmaproben wird anhand der mitgeführten Standardkurve ermittelt. Die ADAMTS13 Autoantikörper Werte werden in arbiträren Units/mL (AU/mL) angegeben. Eine AU/mL entspricht 1 µg/mL affinitäts-gereinigtem humanem anti-ADAMTS13 IgG.

REAGENZIEN

- R1 ADAMTS13-beschichtete Mikrotiterstreifen**, 96 Vertiefungen, mit Acetat-Abdeckfolie
- R2 Testpuffer**, 15 ml, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R3 Plasma Standard**, 60 AU/ml, 0.45 ml, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R4 Positiv-Kontrolle**, 0.35 ml, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R5 Detektions-Antikörper**, Ziegen anti-human IgG-HRP, 140 µl
- R6 Substrat**, TMB, 11 ml
- R7 Waschpuffer**, PBS mit 0.05% Tween 20, pH 7.4, 1 Liter (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.

In den USA darf dieses Produkt nur für Forschungszwecke verwendet werden. 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	Achtung			CONT Polyethylene glycol octylphenol ether H317, H319, H334, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P333 + P313, P337 + P313
Detection Antibody	Achtung			H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313
Wash buffer, PBS + Tween	Achtung			H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + P313

- Gefahren** H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
- Aussagen:** H319 Verursacht schwere Augenreizung.
H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
- Sicherheitshinweise:** P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/-Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264 Nach Gebrauch gründlich waschen.
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.
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 ADAMTS13-beschichtete Microwells, 6x 16 wells:** 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 Plasma Standard:** mit 0.45 mL Testpuffer rekonstituieren. 10 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen, dann vorsichtig mischen. Der Standard kann aliquotiert bei -20°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
- R4 Positiv-Kontrolle:** mit 0.35 mL Testpuffer rekonstituieren. Nach Rekonstitution kann die Positiv-Kontrolle bei -20°C bis zu 4 Wochen gelagert werden. Die Positiv-Kontrolle muß vor der Testdurchführung 1:2 oder 1:4 mit Testpuffer verdünnt werden.
- R5 Detektions-Antikörper:** der Detektions-Antikörper wird vor Gebrauch 1:100 mit Testpuffer verdünnt. Bei Verwendung der ganzen Mikrotiter-Platte mit 96 Vertiefungen, 100 µL Detektions-Antikörper in 10 mL Testpuffer verdünnen. Wenn nicht alle 96 Microwells verwendet werden, dann werden pro Teststreifen (16 Vertiefungen) 20 µL Detektions-Antikörper in 2 mL Testpuffer verdünnt. Der verdünnte Detektions-Antikörper kann im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu 4 Stunden und bei 2-8°C bis zu 72 Stunden gelagert werden.
- 6. Substrat, TMB:** gebrauchsfertige Lösung. Kann im Dunkeln bei 2°-8°C für den auf dem Etikett angegebenen Zeitraum gelagert werden.
- 7. Waschpuffer:** den Inhalt des Beutels in 1 Liter gefiltertem deionisierten bzw. destillierten Wasser auflösen. Der gebrauchsfertige Waschpuffer kann bei 2°-8°C bis zu 4 Wochen gelagert werden.

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Thrombozyten-armes Zitratplasma sollte für den Test verwendet werden. Kein EDTA verwenden. Siehe "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Tests 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

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 Plasma Standard, wie unter REKONSTITUTION DER REAGENZIEN angegeben, ansetzen. Fünf (5) serielle Verdünnungen nach einer der folgenden Methoden ansetzen (Schritt 3a oder 3b, siehe unten): Die Konzentrationen der seriell verdünnten Standards sind 60, 30, 15, 7.5, 3.75 und 1.87 AU/mL.
- 3a. **Verdünnung in der Mikrotiterplatte:** 200 µl des Standards in die Vertiefungen A1/A2 geben. Je 100 µl Testpuffer in die Vertiefungen B1/B2 bis F1/F2 geben. 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. 100 µl des Testpuffer in die Vertiefungen G1/G2 geben und als 0 AU/ml Standard verwenden.
- 3b. **Verdünnung in Mikrozentrifugenröhrchen:** 225 µl Testpuffer in 5 geeignete Röhrchen geben und mit 30, 15, 7.5, 3.75 oder 1.87 AU/ml beschriften. 225 µl Standard in das 30 AU/ml Röhrchen pipettieren und mischen. 225 µl des verdünnten Standards aus dem 30 AU/ml Röhrchen in das 15 AU/ml Röhrchen pipettieren und mischen. Diesen Prozess fortsetzen bis alle Röhrchen verdünnten Standard enthalten. 100 µl des unverdünnten Standards in die Vertiefungen A1/A2 pipettieren. 100 µl aus dem verdünnten 30 AU/ml Standard in die Vertiefungen B1/B2 pipettieren. Entsprechend je 100 µl aus den restlichen Standardröhrchen in die folgenden Vertiefungen pipettieren. 100 µl Testpuffer in die Vertiefungen G1/G2 pipettieren und als 0 AU/ml Standard verwenden.

Testdurchführung

- Die Plasmaproben 1:20 verdünnen (1 Teil Plasma + 19 Teile Testpuffer). Je 100 µl Positivkontrolle bzw. verdünnte Probe in die Vertiefungen der Mikortiterplatte pipettieren. Mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 2,5 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Orbital-Schüttler bei 500 rpm inkubieren.
- Inhalt aus den Vertiefungen entfernen und 4 mal mit Waschpuffer waschen. Dieser Waschschritt 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 verworfen und Tropfen entfernen indem Platte 4-5mal umgekehrt auf einem Papiertuch ausklopft wird.
- Je 100 µl Detektions-Antikörper in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf dem Orbital-Schüttler bei 500 rpm inkubieren.
- Vertiefungen wie unter Schritt 5 angegeben waschen.
- Je 100 µl Substrat unmittelbar nach dem letzten Waschschritt in die Vertiefungen pipettieren, mit der Azetat-Abdeckfolie bedecken und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (blaue Farbentwicklung).
- Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion je 50 µl 0,5 M H₂SO₄ in die Vertiefungen geben. Die Säurelösung in derselben Reihenfolge und Geschwindigkeit zugeben wie das Substrat. 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.

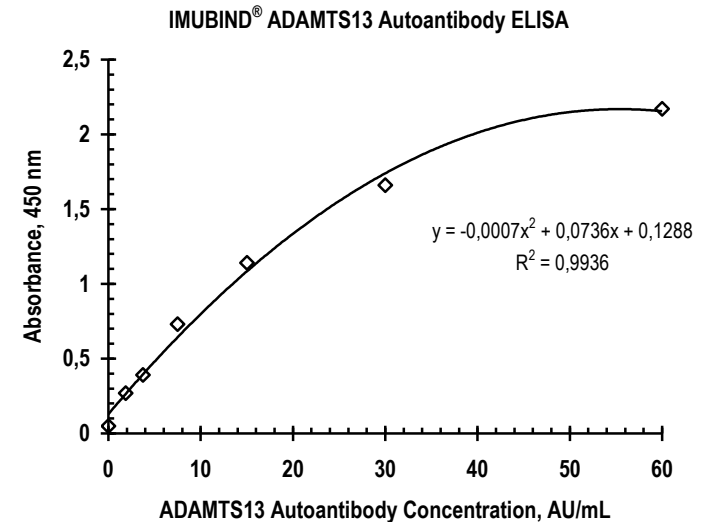
QUALITÄTSKONTROLLE

Das Positivkontrollplasma sollte bei jeder Testdurchführung mitbestimmt werden. Die Positivkontrolle wird entweder 1:2 oder 1:4 direkt vor der Testdurchführung verdünnt. Kontrollreagenzien werden für die wirksame Überwachung der Durchführung des Tests mitgeführt. Jedes Labor sollte diese Werte dazu verwenden, Testdurchläufe, die außerhalb des Kontrollbereichs liegen nach eigenen Laborregeln zu bestimmen.

ERGEBNISSE

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

Repräsentative Standardkurve



BERECHNUNGEN

Die Menge von ADAMTS13 IgG Autoantikörpern in der Plasmaprobe wird direkt von der Standardkurve abgelesen. Obwohl die Probe 1:20 verdünnt wurde, wird der von der Kurve abgelesene Werte nicht mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

Wenn der Wert der Probe über dem höchsten Standard liegt, dann muß die Probe stärker mit Probenpuffer verdünnt werden und der Test muß erneut durchgeführt werden. Diese weitere Verdünnung muß dann bei der Berechnung berücksichtigt werden.

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

In einer Studie mit 119 Normalpersonen (n=119) lag der Mittelwert der ADAMTS13 IgG Autoantikörperkonzentration bei 9,0 AU/mL, das obere (95%-) Referenzlimit liegt bei 26,3 AU/mL.⁸ Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalwert ermitteln unter Verwendung der lokalen Population.

LEISTUNGSMERKMAL

Präzision

Der Intra-Assay Variationskoeffizient wurde mit 6.7% bestimmt.

Spezifität

Der Detektions-Antikörper ist hoch-spezifisch für humanes IgG.

RÜCKFÜHRBARKEIT DES STANDARD MATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit des Standard Materials in diesem Kit sind bei American Diagnostica auf Anfrage erhältlich.

LITERATURHINWEISE

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

ESPAÑOL

USO PREVISTO

El ensayo IMUBIND® ADAMTS13 Autoantibody ELISA está concebido para medir la los anticuerpos IgG de 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 metaloproteínasa 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 o bajo nivel de la actividad de la ADAMTS13 (<5%) puede conducir a una acumulación de multímeros ultra grandes vWF.⁴ Los multímeros ultra grandes vWF se ligarán 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 y tienen como consecuencia 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.⁷ El desarrollo de autoanticuerpos de ADAMTS13 ha sido asociado a ciertos fármacos tales como la ticlopidina, el clopidogrel, la quinina y la ciclosporina.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las muestras diluidas de plasma se añaden a los micropocillos recubiertos de una ADAMTS13 recombinante de longitud completa. Durante un periodo de incubación, los autoanticuerpos contra la ADAMTS13 presentes en la muestra se unirán a la proteína con la que se encuentran revestidos los pocillos. Tras un paso de lavado, se añade a los micropocillos un anticuerpo IgG de cabra contra ADAMTS13 humana marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP), uniéndose a los autoanticuerpos de tipo IgG contra la ADAMTS13 que se ha vinculado a los micropocillos revestidos. 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 los autoanticuerpos de ADAMTS13 en la muestra diluida de plasma. Los niveles de autoanticuerpos de ADAMTS13 se expresan en unidades arbitrarias/mL (UA/mL). Una UA/mL es igual a 1 µg/mL de IgG humana contra ADAMTS13 purificada por afinidad.

REACTIVOS

- R1** Placa de microtitulación revestida de ADAMTS13, de 96 pocillos, con cubierta de acetato
- R2** Búfer de ensayo, 15 mL, 2 viales (lío-filizado)
- R3** Estándar de plasma, 60 UA/mL, 0,45 mL, 2 viales (lío-filizado)
- R4** Control positivo, 0,35 mL, 2 viales (lío-filizado)
- R5** Anticuerpo de detección, IgG-HRP de cabra contra ADAMTS13 humana, 140 µL
- R6** Sustrato, TMB, 11 mL
- R7** Búfer de lavado, PBS con Tween 20 al 0,05%, pH 7,4, 1 litro (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.

Se limita a propósitos de investigación únicamente en los Estados Unidos. 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	atención			CONT Polyethylene glycol octylphenol ether H317, H319, H334, P261, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P333 + P313, P337 + P313
Detection Antibody	atención			H319, P264, P280, P305 + P351 + P338, P337 + 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.
H319 Provoca irritación ocular grave.
H334 Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación.

Los consejos de prudencia: P261 Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
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.
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 ADAMTS13: Una vez extraídos de la bolsa de aluminio, los micropocillos deberán usarse en el transcurso de 30 minutos. Los micropocillos 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 de plasma: Reconstituirlo con 0,45 mL de búfer de ensayo y dejar reposar durante 10 minutos. Mezclar antes del uso. El estándar se puede congelar y almacenar a una temperatura de -20°C hasta por 6 meses.

R4 Control positivo: Reconstituirlo con 0,35 mL de búfer de ensayo. Una vez reconstituido, se puede almacenar el control hasta por 4 semanas a una temperatura de -20°C. Antes de efectuar el ensayo, el control deberá diluirse en proporción de 1:2 o de 1:4 con el búfer de ensayo.

R5 Anticuerpo de detección: Preparar el anticuerpo de detección de alta eficacia diluyéndolo en proporción de 1:100 con el búfer de ensayo. Para usar los 96 micropocillos de una sola vez, diluir 100 µL del conjugado de 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 de alta eficacia se puede almacenar en un lugar oscuro durante 4 horas a temperatura ambiente o bien durante 72 horas a una temperatura de 2° a 8°C.

R6 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.

R7 Búfer de lavado: Disolver el contenido del paquete en un 1 litro 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 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

Agua filtrada desionizada/destilada

Pipeta múltiple de ocho canales de 50 a 300 µL

Pipetas individuales de 0 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 estándares

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 de plasma 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 60, 30, 15, 7,5, 3,75 y 1,87 UA/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 UA/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 30, 15, 7,5, 3,75 o 1.87 UA/mL. Añadir 225 µL del estándar al tubo etiquetado con 30 UA/mL y mezclar. Sacar 225 µL del estándar diluido del tubo de 30 UA/mL y añadir esto al tubo de 15 UA/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 30 UA/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 UA/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 un micropocillo, cubrir con la cubierta de acetato e incubar durante 2,5 horas a temperatura ambiente (18 a 25°C) en un agitador orbital para placas de microtitulación bajo agitación (a 500 rpm).
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 (llenar los pocillos con el búfer de lavado usando una pipeta o una botella comprimible, esperar tres minutos, 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 1 hora a temperatura ambiente (18 a 25°C) en un agitador orbital para placas de microtitulación bajo agitación (a 500 rpm).
7. Lavar los pocillos repitiendo el paso 5.
8. 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 10 minutos a temperatura ambiente (18° a 25°C). Adquirirá un color azul.
9. 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. Sacudir los micropocillos para garantizar la distribución uniforme del H₂SO₄. La solución adquirirá un color amarillo. Leer las absorbancias en un lector de placas de microtitulación a una longitud de onda de 450 nm en el transcurso de 10 minutos.

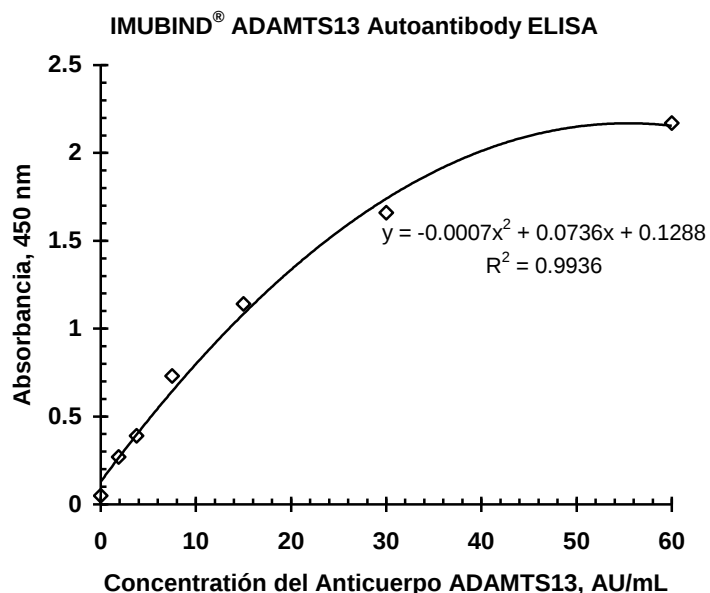
CONTROL DE CALIDAD

Se deberá incluir el plasma de control positivo cada vez que se ejecute el ensayo. Antes de efectuar el ensayo, el control positivo se diluye en proporción de 1:2 o de 1:4. Ya que los materiales de control se usan para verificar eficazmente el rendimiento del ensayo, cada laboratorio deberá utilizar tales valores para determinar la situaciones descontroladas usando sus propias normas de laboratorio.

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

El nivel de autoanticuerpos IgG de ADAMTS13 en el plasma se interpola directamente desde la curva estándar. Si bien se ha diluido la muestra en proporción 1:20 durante el procedimiento del ensayo, no se deberá ajustar el valor interpolado para tomar en cuenta esta dilución.

Si el valor de la muestra excediese el estándar más alto, diluir más la muestra con el búfer de ensayo y repetir el ensayo. Tomar en cuenta esta nueva dilución al calcular el valor de la muestra no diluida.

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 veces.

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

VALORES ESPERADOS

En un estudio de 119 plasmas de donantes normales (n=119), el nivel medio de anticuerpos IgG de ADAMTS13 fue de 9,0 UA/mL con un límite de referencia de 95% de 26,3 UA/mL.⁸ Cada laboratorio deberá establecer sus propios límites normales usando la población local.

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Precisión

El coeficiente de variación intraensayo (CV) para este ensayo ELISA fue de 6,7%.

Especificidad

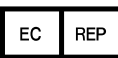
El anticuerpo de detección es altamente específico para la IgG humana.

Trazabilidad de los calibradores y del material de control

A petición, ponemos a disposición información acerca de la trazabilidad de los calibradores y del material de control.

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. Datos no publicados de BioMedica Diagnostics.

	ENGLISH	DEUTSCH	ESPAÑOL
	Definition of Symbols	Bedeutung der Symbole	Definición de símbolos
	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten	Consulte las instrucciones para el Uso
	Refer to SDS	SDS konsultieren	Consulte SDS
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik	Dispositivo para diagnóstico in vitro
	CE Mark	CE-Siegel	Marcaje CE
	Manufactured by	Hergestellt durch	Fabricado por
	Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern	Conservar entre 2°C y 8°C
	Batch code / Lot number	Charge	Número de Lote
	Expiration Date	Verfallsdatum	Fecha de expiración
	Catalog number	Katalog-Nr	Número de Catálogo
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertetung für Europa	Representante Europeo Autorizado
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Contains...	Enthält...	Contiene...