

TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity



GB

IT

PT

DE

ES

FR

REF 5450701 TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity



REF 5450761 TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity Calibrator Set 6 x 0.5 mL

REF 5450763 TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity Control Set 2 x 0.5 mL

symbols key / Symbolschlüssel / interpretazione dei simboli / explicación de símbolos / explicação dos símbolos / clé des symboles / Symbolnyckel / symbolforklaring / Tegnforklaring / Κλειδί συμβόλων / Използвани символи / символы / Ključova slova / Značenje simbola

	manufacturer / Hersteller / fabbricante / fabricante / fabricante / fabricant / Tillverkaren / Fabrikanten / Producent / Κατασκευαστής / Производител / Производител / výrobce / Proizvođač		expiry date / Verfallsdatum / data di scadenza / fecha de caducidad / data de validade / date d'expiration / utgångsdatum / udløbsdato / Utløpsdato / Ημερομηνία λήξης / срок на годност / datum expirace / срок годности / datum expirace / Rok trajanja
	storage temperature / Lagertemperatur / temperatura di conservazione / temperatura de conservación / temperatura de conservação / température de stockage / lagringstemperatur / opbevaringstemperatur / Oppbevaringstemperatur / θερμοκρασία αποθήκευσης / съхранение на / teplota skladování / температура хранения / teplota skladování / Temperatura lagerovanja		consult instructions for use / Gebrauchsanweisung beachten / consultare le istruzioni per l'uso / consulte las instrucciones de uso / consultar o manual de instruções / instruction d'utilisation / se användarinstruktioner / følg bruksveiledning / Følg bruksanvisningen / συμβουλευθείτε τις οδηγίες για τη χρήση / прочетете инструкцията за работа / potřeba řídit se instrukcemi / перед использованием читайте инструкцию / sledujte návod k použití / Pročitaj upustvo pre upotrebe
	CE-mark / CE-Kennzeichnung / marchio CE / marca de CE / Simbolo da CE / marquage CE / CE-märkning / CE-mærket / CE-merke / CE-σημάδι / CE марка / CE-označení / маркировка CE / značka CE / CE-marka		determinations / Bestimmungen / determinazioni / determinaciones / determinações / déterminations / bestämninngar / bestemmelse / Bestemmelse / προσδιορισμοί / брой тестове / stanovení / определний / počet stanovení / Definicija
AQUA	distilled water / destilliertes Wasser / acqua distillata / agua destilada / água destilada / eau distillée / destillerat vatten / destilleret vand / Destillert vann / απεσταγμένο νερό / децтилирана вода / destilovaná voda / дистиллированная вода / destilovaná voda / Serija	LOT	lot / Charge / lotto / lote / lote / lot / sats / serie / Parti / партиа / партида номер / šarže / лот / šarže / in vitro diagnostika
BUF	Reaction buffer / Reaktionspuffer / tampone di reazione / tampón de reacció / Tampão de reação / tampon de réaction / Reaktionspuffer / Reaktionsbuffer / Reaktionsbuffer / διάλυμα αντίδρασης / Реакцион буфер / Рабочий буферный раствор / Reakční pufr / Reakcioni pufer	MTP	microtiter plate / Mikrotiterplatte / placa microtiter / microplaca / microplaca / microplaques sensibilisées / Mikrotiterplatta / Mikrotiterplade / mikrotiterplate / πλάκα μικροτιτλοδότησης / Микротительна плака / Микропланшет / Mikrotitrační destička / Mikrotitrationsplatte
CAL	Calibrator / Kalibrator / Calibratore / calibrador / calibrador / calibreur / Kalibrator / Kalibrator / Kalibrator / Βαθμονομητής / Калибратор / калибратор / kalibrátor / Kalibrator	REF	catalogue number / Katalognummer / numero di catalogo / número de catálogo / número de referência / réf. de catalogue / katalognummer / Katalognummer / αριθμός καταλόγων / каталожен номер / katalogové číslo / каталожный номер / katalogové číslo / Kataloški broj
CONJ	Conjugate / Konjugat / Coniugato / conjugado / conjugado / conjugaté / Konjugerad / Konjugat / Konjugat / συνδεδετικό / Конюгат / Конъюгат / Konjugát / Konjugat	RTU	ready to use / gebrauchsfertig / pronto all'uso / listo para usar / pronto a usar / prêt à l'emploi / färdig att användas / færdig til brug / klar til bruk / έτοιμο προς χρήση / Готов за употреба / готов к использованию / k přímému použití / Razrediti ili rastvoriti
CONT	Control / Kontrolle / controllo / control / control / contrôle / Kontroll / Kontroll / Kontroll / διάλυμα ελέγχου / Контроль / Контрольный образец / Kontrola / Kontrola	STOP	stop solution / Stopplösung / Soluzione di arresto / solución de parada / solução de paragem / solution d'arrêt / Stoppløsning / Stop-opløsning / Stoppløsning / διάλυμα παύσης / Стоп раствор / Стоп-раствор / Zastavovací roztok / Stop solucija
DIL	dilute or dissolve in / verdünnen oder lösen in / diluire o dissolvere in / diluir o dissolver / diluir ou dissolver em / diluer ou dissoudre dans / spädd eller upplöst i / fortyndes eller opløses i / Fortyndes eller opløses i / αραιωση ή διάλυση σε / разтворете или разрежете с / zředí anebo rozpustit v / разбавить или растворить в / naředíť nebo rozpustit v / razrediti ili rastvoriti u	SUB	substrate / Substrat / substrato / substrato / substrato / substrat / Substrat / Substrat / Substrat / υπόστρωμα / Субстрат / Субстрат / Substrát / Substrat
INC	incubation buffer / Inkubationspuffer / tampone di incubazione / tampón de incubación / Tampão de incubação / tampon d'incubation / Inkubationspuffer / Inkubationsbuffer / Inkubationsbuffer / διάλυμα επώασης / Инкубационный буфер / Буфер для инкубации / Inkubační pufr / Inkubacioni pufer	WASH	washing solution concentrate / Waschlösungskonzentrat / concentrado de solución de lavado / solución de lavado concentrada / tampão de lavagem concentrado / Tampon de lavage concentré / Vattenlösningskoncentrat / Vaskeopløsningskoncentrat / vaskeløsningskoncentrat / смывочный раствор / Концентрированный мыльный раствор / Концентрат промышленного раствора / Koncentrat promývacího roztoku / Koncentrat solucije za ispiranje
IVD	in vitro diagnostic use / in vitro Diagnostikum / diagnostico in vitro / diagnóstico in vitro / diagnóstico in vitro / diagnostic in vitro / för in vitro diagnostik / in vitro diagnostik / in vitro diagnostisk bruk / рhση διαγνωστικής εντόβ σωλήνα / за ин vitro диагностика / pro in vitro diagnostiku / использовать для диагностики in vitro / diagnostický prostředek in vitro / Destilšana Voda		



PRODUCT DESCRIPTION

INTENDED USE

The TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA is a chromogenic test for the determination of ADAMTS-13 activity in human plasma. ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13) is an enzyme (vWF-cleaving protease or vWF-CP) that specifically cleaves unusually large von Willebrand factor (vWF) multimers, which induce platelet thrombus formation under high shear stress. If the activity of ADAMTS13 is lowered for some reason, however, unusually large vWF multimers may accumulate within blood causing thrombosis due to platelet aggregation, which in turn may lead to TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura).

COMPOSITION

- ELISA test strips (12), with 8 wells each, coated with a monoclonal anti GST- Antibody. The drying agent is supplied in an aluminium bag.
- GST-vWF73 Substrate; 2 vials; lyophilized; 6 mL.
- Calibrators (Standards) numbered from 1 to 6; lyophilized; 1 vial each; 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
- High and low control plasma, lyophilized, 1 vial each, 0.5 mL. **Concentrations are lot-specific; consult the label on the vial.**
- Reaction buffer; 1 vial; 30 mL; ready to use
- Conjugate: HRP conjugated monoclonal anti-N10 Antibody: 1 vial; 12mL; ready to use
- Colour reagent TMB (Tetramethylbenzidine); 1 vial; 12mL; ready to use
- Wash Buffer concentrate, 10-fold concentrated, 1 vial, 53 mL.
- Stop solution; sulphuric acid 0.5 mol/L, 1 vial, 12 mL; ready to use
- Sample dilution Microplate, 1 plate (ONLY for sample dilution!)
- Plate Sealer, 2 pieces.

MATERIAL REQUIRED (not supplied with the kit)

- Distilled water
- Measuring cylinder (500 mL)
- Precision pipettes (5, 50, 100 and 1000 µL)
- Variable pipette (200 and 1000 µL)
- Multichannel and/or dispensing pipettes (100 and 200 µL)
- ELISA washer or multichannel pipette
- ELISA reader with 450 nm filter, with a 620 nm reference filter if available.

WARNING AND PRECAUTIONS

- IVD for *in vitro* diagnostic use
- All human blood or plasma products as well as samples must be considered as potentially infectious. They have to be handled with appropriate care and in strict observance of safety regulations. The rules pertaining to disposal are the same as applied to disposing hospital waste.
- Calibrators and control plasmas are made from human blood and any individual plasma involved in the procedure is HbsAg, HIV ½ Ab and HCV-Ab-negative (see labels on the vials). However, all human blood products should be handled as potentially infectious material.
- Stopping solution (sulphuric acid) may irritate the skin. Should acid get into your eyes, wash out immediately with water and consult a doctor.
- The reagents sometimes contain preserving agents. Beware of swallowing! Avoid contact with skin or mucous membranes!

STABILITY AND STORAGE

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

Stability after reconstitution/opening:

Material/ Reagent	State	Storage	Stability
ELISA test strip	after opening	2 ... 8 °C with adhesive film in plastic bag with drying agent	Expiry date
GST-vWF73 Substrate	After reconstitution	-20 °C	6 weeks
Calibrators, control plasmas	after reconstitution	-20 °C	6 months
Reaction Buffer	After opening	2 ... 8 °C	6 months
Conjugate	After opening	2 ... 8 °C	4 months
Colour Reagent TMB	After opening	2 ... 8 °C	Expiry date
Wash Buffer (10-fold concentrate)	After opening	2 ... 8 °C	6 months
Wash Buffer	1+9 dilution of concentrate	2 ... 8 °C	3 weeks
Stop solution	After opening	2 ... 8 °C	Expiry date

TEST PROCEDURE

PREPARATION OF THE SAMPLES

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

PREPARATION OF REAGENT

- Before starting the test, all the required components are to be brought to room temperature.
- Preparing the washing buffer: Dilute 1 part by volume washing buffer concentrate with 9 parts by volume distilled water (1+9). Mix well! (Diluted washing buffer concentrate = washing buffer). There may be crystalline precipitations which will dissolve at 37°C within 10 minutes.
- Reconstituting vWF73 Substrate Solution: Substrate Solution is reconstituted with 6mL distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer).
- Reconstituting calibrators and control plasmas: Calibrators and control plasmas are reconstituted with **500 µL** distilled water and mixed for 10 seconds after a reconstitution time of 15 minutes (vortex mixer). Reconstituted components are clear to slightly turbid.
- Sample / Calibrator / Control dilution: dilute samples, calibrators and controls 31-fold with reaction buffer in a sample dilution Microplate
Example: 150µL Reaction buffer + 5µL Sample / Calibrator / Control
For higher precision, volumes can be upscaled, using larger tubes for dilution:
e.g. 600µL reaction buffer + 20µL Sample / Calibrator / Control

PERFORMANCE OF THE TEST

GST-vWF73 SUBSTRATE INCUBATION (reference 1,2,3,7,9)	Add GST-vWF73 Substrate Solution to anti-GST coated test strips	100µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 300 µL
SAMPLE INCUBATION (reference 1,2, 5,6,7,9,10)	Pipette diluted calibrators, control plasmas, samples into test wells;	100 µL
	Incubate at room temperature	30 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 300 µL
CONJUGATE REACTION (reference 1,2,7,9)	Pipette conjugate into wells	100 µL
	Incubate at room temperature	60 minutes
WASHING (reference 1,3,4)	Washing buffer	3 x 300 µL
TMB COLOUR REAGENT REACTION (reference 1,2,7,9)	Pipette TMB substrate into test wells,	100 µL
	Incubate at room temperature	30 minutes
STOPPING (reference 1,2,7)	Pipette stopping solution into wells	100 µL
MEASUREMENT (reference 8)	ELISA reader, 450 nm	shake 5 sec., measure within 10 min.

References

- Reagents of different lots must not be combined
- Precision and performance, among others, essentially depend on the following factors:
 - Thorough mixing of all substances used for dilution, 10 sec. with Vortex Mixer
 - Test calibrators, controls and samples in duplicates
 - Incubate at indicated temperature (RT: room temperature, 20...25°C)
 - Strict observance of the order of pipetting and of the time element as indicated
 - The time for sample incubation, conjugate and substrate reaction as indicated starts after pipetting the last sample. Incubation times should not vary by more than □ 5%.
 - During sample incubation and conjugate reaction, the time for pipetting calibrators/control plasmas/samples and/or conjugate solutions must not exceed 60 seconds per ELISA test strip (8 wells).
 - During substrate reactions and at stopping, the time needed for pipetting the substrate and/or the stopping solution must not exceed 10 seconds per ELISA test strip. Short pipetting times may be secured by using Multichannel pipettes.
- Label/number strips with a water resistant pen in case the strips accidentally fall out of the frame during testing.
- After the last washing, wells must be aspirated thoroughly, turned upside down and positioned on a blotting paper; by gentle tapping, the last remnants must be removed.
- A calibration curve has to be created for every assay
- Samples / calibrators / controls can be transferred from sample dilution microplate to anti-GST microplate by Multichannel pipette. Do not forget to change tips for every strip!
- No agitation is required during each reaction step
- By measuring the difference in wavelength at 450 and 620 nm the precision of the test is increased.
- For every Incubation step test plate has to be covered with plate sealer

10. It is not mandatory to use all six calibrators for creating a calibration curve For sample screening a calibration curve using calibrators 1, 2, 3, 4, and 6 is sufficient. When the focus is particularly in the lower range of ADAMTS13 activity, a calibration curve with calibrators 2, 3, 4, 5 and 6 is adequate.

LIMITATION OF THE TEST

Samples containing EDTA can not be used because EDTA is a strong inhibitor of ADAMTS13 function.

ANALYSES RESULTS

CALCULATION OF THE RESULTS

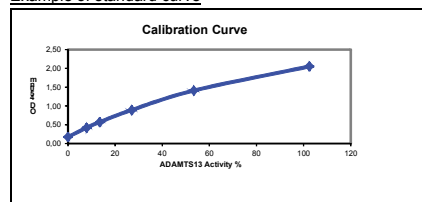
Setting up a reference curve: X axis: ADAMTS13 Activity [%]
Y axis: Extinction at 450nm

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

Assessment of reference curve:

- The extinction coefficient of the highest calibrator should be between 1.0 and 2.5.
- The extinction coefficient of the lowest Calibrator should be <0.2
- The validity of the test may be checked on the basis of the calculated control values.

Example of standard curve



Measuring concentration of samples

- Read off the concentration from the reference curve
- If there are samples with extinction coefficients higher than that of the highest point on the curve, they have to be prediluted with reaction buffer (1+1 or 1+3). The measured concentration then has to be multiplied with the dilution factor 2 or 4, respectively.

REFERENCE RANGE

Normal range for ADAMTS-13 Activity: **40 – 130 % (n=40)**

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

STANDARDISATION

Standards and Controls were produced from a normal donor. They were calibrated against an internal reference standard, which was produced from a pool of 300 normal donors, and defined with an activity of 100%.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Performance data are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

PRECISION

Reproducibility was determined with different samples (in series and day to day). The following results were obtained.

Sample	Intra assay variation		Inter assay variation	
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

ASSAY RANGE

0,3 % – 105 %

DETECTION LIMIT

0,2 %

LITERATURE

Please contact your local distributor or Technoclone.

PRODUKTBESCHREIBUNG

ANWENDUNG

Der TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA ist ein chromogener Test zur Bestimmung von ADAMTS-13 Aktivität in Humanplasma. ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13) ist ein Enzym (VWF cleaving Protease oder VWF-CP), das für die spezifische Spaltung von ungewöhnlich großen von Willebrand factor (vWF) Molekülen verantwortlich ist. Diese großen vWF Moleküle können unter Einfluss hoher Scherkräfte zur Bildung von Plättchen thromben führen. Bei verminderter ADAMTS-13 Aktivität können ungewöhnlich große vWF Multimere akkumulieren und zu Thrombose aufgrund von Plättchenaggregation führen, was wiederum zu TTP (thrombotic thrombocytopenic purpura) führen kann.

ZUSAMMENSETZUNG

- ELISA-Teststreifen (12): mit jeweils 8 Testvertiefungen; beschichtet mit monoklonalem anti-GST Antikörper, mit Trocknungsmittel im Aluminiumbeutel verpackt.
- GST-vWF73 Substrat; 2 Fl.; lyophilisiert; je 6 mL
- Kalibratoren (Standards): nummeriert von 1-6; lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5 mL.
Die chargenabhängigen Konzentrationen bitte den Flaschenetiketten entnehmen!
- Hohe und niedrige Kontrollplasmen, lyophilisiert; je eine Fl.; 0,5 mL.
Die chargenabhängigen Konzentrationen bitte den Flaschenetiketten entnehmen!
- Reaktionspuffer; 1 Fl.; 30 mL; ready to use
- Konjugat: HRP konjugierter monoklonaler anti-N10 Antikörper, 1 Fl.; 12 mL; ready to use.
- Farbreagenz TMB (Tetramethylbenzidine); 1 Fl.; 12 mL; ready to use
- Waschpufferkonzentrat; 10-fach konzentriert; 1 Fl.; 53 mL.
- Stopplösung: Schwefelsäure 0,5 mol/L, 1 Fl.; 12 mL; ready to use
- Mikrotiterplatte für Probenverdünnung, 1 Platte; (NUR für Probenverdünnung!)
- Ablebefolien für ELISA-Teststreifen, 2 Stk.

BENÖTIGTES MATERIAL (nicht im Kit enthalten)

- Aqua dest.
- Messzylinder (500 mL)
- Präzisionspipetten (5, 50, 100 und 1000 µL)
- Variable Pipette (200 und 1000 µL)
- Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten (100 und 200 µL)
- ELISA-Waschgerät oder Mehrkanalpipette
- ELISA-Reader mit 450 nm Filter und 620 Referenzfilter falls verfügbar

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur Anwendung als *in vitro* Diagnostikum
- Alle humanen Blut- bzw. Plasmaprodukte und Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Sie sind mit der notwendigen Sorgfalt und entsprechend den Sicherheitsvorschriften zu behandeln und wie Krankenhausmüll zu entsorgen.
- Obwohl alle Kalibratoren und Kontrollen, hergestellt aus humanem Blut, und alle hierzu verwendete Einzelplasmen HbsAg, HIV 1/2 Ak und HCV-Ak negativ (siehe Flaschenetikett) sind, müssen sie als potentiell infektiös betrachtet werden.
- Stopplösung für Antigen substrat kann zu Reizungen der Haut führen. Sollte Säure in die Augen gelangen, sofort mit viel Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen!
- Die Reagenzien enthalten teilweise Konservierungsmittel. Nicht schlucken! Haut- oder Schleimhautkontakt vermeiden!

LAGERUNG UND STABILITÄT

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

Stabilität nach Rekonstitution/nach Öffnen:

Material/ Reagenz	Zustand	Lagerung	Stabilität
ELISA - Teststreifen	Nach Öffnen	mit Ablebefolie in Alubeutel mit Trocknungsmittel	Ablaufdatum
GST-vWF73 Substrat	Nach Rekonstitution	-20 °C	6 Wochen
Kalibratoren, Kontrollplasmen	Nach Rekonstitution	-20 °C	6 Monate
Reaktionspuffer	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	6 Monate
Konjugat	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	4 Monate
Farbreagenz (TMB)	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	Ablaufdatum
Waschpuffer (10x konz)	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	6 Monate
Waschpuffer	1+9 Verdünnung des Konzentrates	2 ... 8 °C	3 Wochen
Stopplösung	Nach Öffnen	2 ... 8 °C	Ablaufdatum

TESTDURCHFÜHRUNG

VORBEREITUNG DER PROBEN

Probenmaterial: humanes Citratplasma. Proben können bis zu 2 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Bei -20°C können sie mehrere Monate aufbewahrt werden. Proben dürfen nicht mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut werden.

VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Vor Testbeginn alle benötigten Testkomponenten auf Raumtemperatur bringen.
- Herstellen des Waschpuffers: 1 Volumenteil Waschpufferkonzentrat mit 9 Volumenteilen Aqua dest. Verdünnen (1+9). Gut mischen! (Verdünntes Waschpufferkonzentrat = Waschpuffer). Eventuelle kristalline Niederschläge gehen bei 37°C innerhalb von 10 min in Lösung.
- Rekonstitution des vWF73 Substrats: Substrat wird mit 6mL Aqua dest rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 min, 10 Sekunden gemischt (Probenmischer).
- Rekonstituieren der Kalibratoren und Kontrollplasmen: Die Kalibratoren und Kontrollplasmen werden mit **500 µL** Aqua dest. rekonstituiert und nach einer Rekonstitutionszeit von 15 min, 10 Sekunden gemischt (Probenmischer). Rekonstituierte Komponenten sind klar bis leicht trüb.
- Verdünnung von Proben / Kalibratoren / Kontrollen: Proben, Kalibratoren und Kontrollen werden 31-fach mit Reaktionspuffer in der Mikrotiterplatte für Probenverdünnungen verdünnt.
Beispiel: 150 µL Reaktionspuffer + 5 µL Probe / Kalibrator / Kontrolle
Für höhere Präzision können Volumina auch aufskaliert werden, wobei anstelle der beigefügten Mikrotiterplatte größere Verdünnungsröhrchen benötigt werden.
z.B. 600 µL Reaktionspuffer + 20 µL Probe / Kalibrator / Kontrolle

TESTVERFAHREN

GST-vWF73 SUBSTRAT INKUBATION (Hinweise 1,2,3,7,9)	GST-vWF73 Substrat in Testvertiefungen der anti-GST Platte pipettieren.	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	60 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 300 µL
PROBEN-INKUBATION (Hinweise 1,2,5,6,7,9,10)	Verdünnte Kalibratoren, Kontrollplasmen und Proben in Testvertiefungen pipettieren.	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	30 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 300 µL
KONJUGAT-REAKTION (Hinweise 1,2,7,9)	Konjugat in Testvertiefungen pipettieren.	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	60 Minuten
WASCHEN (Hinweise 1,3,4)	Waschpuffer	3 x 300 µL
FARBREAGENZ TMB REAKTION (Hinweise 1,2,7,9)	Farbreagenz (TMB) in Testvertiefungen pipettieren.	100 µL
	Bei Raumtemperatur inkubieren	30 Minuten
STOPPEN (Hinweis 1,2,7)	Stopplösung in Testvertiefungen pipettieren	100 µL
MESSUNG (Hinweis 8)	ELISA reader, 450 nm	5 Sek. schütteln, Messung innerhalb von 10 Min.

HINWEISE

- Reagenzien verschiedener Chargen dürfen nicht kombiniert werden.
- Präzision und Wiederfindung hängen u.a. von folgenden Faktoren entscheidend ab:
 - Gute Durchmischung aller Verdünnungsansätze, 10 Sek. auf Probenmischer
 - Durchführung von Doppelbestimmungen
 - Inkubation bei der korrekten Temperatur (RT: Raumtemperatur; 20 - 25°C)
 - Genaue Einhaltung von Pipettierreihenfolge und Zeittakt.
 - Die angegebene Zeit für die Probeninkubation, Konjugat- und Substratreaktion wird nach der Pipettierung der letzten Probe genommen. Inkubationszeiten sollten um nicht mehr als ±5% variiert werden.
 - Bei der Probeninkubation und Konjugatreaktion darf die Zeit für die Pipettierung der Kalibratoren/Kontrollplasmen/Proben bzw. Konjugatlösung 60 Sek. pro ELISA-Teststreifen (8 Vertiefungen) nicht überschreiten.
 - Bei der Substratreaktion und beim Stoppen darf die Pipettierzeit der Substrat- bzw. Stopplösung 10 Sek. pro ELISA-Teststreifen nicht überschreiten. Kurze Pipettierzeiten werden durch Verwendung von Mehrkanal- bzw. Dispensierpipetten erreicht.
- Teststreifen mit wasserfestem Stift markieren, falls sie während des Testes versehentlich aus der Halterung fallen sollten.
- Nach dem letzten Waschvorgang müssen die Testvertiefungen leer gesaugt und auf saugfähigem Papier ausgeklopft werden.
- Für jeden Test muss eine neue Standardkurve erstellt werden.
- Proben / Kalibratoren / Kontrollen können mittels Multikanalpipette von der Probenverdünnungs-MTP auf die anti-GST MTP überführt werden. Nicht vergessen bei jedem Streifen die Pipettenspitzen zu wechseln!!
- zwischen den einzelnen Reaktionsschritten ist kein Schütteln notwendig
- durch Differenzwellenlängenmessung bei 450 und 620nm wird die Präzision des Tests erhöht.
- Bei jedem Inkubationsschritt müssen Teststreifen mit Ablebefolie abgedeckt werden.
- Es ist nicht immer erforderlich alle sechs Kalibratoren für die Erstellung einer Standardkurve zu verwenden. Zum screenen von Proben ist eine mittels Kalibrator 1, 2, 3, 4 und 6 erstellte Kurve ausreichend. Liegt der Fokus vor allem im niedrigen Bereich der ADAMTS13 Aktivität, sollte eine Kurve mit den Kalibratoren 2, 3, 4, 5 und 6 erstellt werden.

TESTEINSCHRÄNKUNGEN

Proben die EDTA enthalten, können nicht verwendet werden, da EDTA ein Inhibitor für die Funktion der ADAMTS13 ist.

ANALYSENERGEBNISSE

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

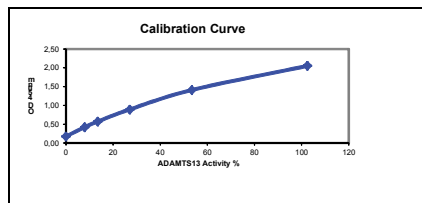
Erstellung der Bezugskurve: x-Achse: ADAMTS-13 Aktivität [%]
y-Achse: Extinktion 450 nm

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

Beurteilung der Bezugskurve:

- Der Extinktionskoeffizient des höchsten Kalibrators sollte zwischen 1,0 und 2,5 liegen.
- Der Extinktionskoeffizient des niedrigsten Kalibrators sollte <0,2 sein.
- Die Auswertbarkeit des Tests kann anhand der ermittelten Kontrollwerte überprüft werden.

Beispiel einer Standardkurve:



Konzentrationsbestimmung der Proben:

- Konzentrationen der Proben an der Bezugskurve ablesen
- Sollte der Extinktionswert einer Probe höher als der des höchsten Standards liegen, so muss die Probe mit Reaktionspuffer vorverdünnt werden (1+1 oder 1+3). Die ermittelte Konzentration wird in diesem Fall mit dem Verdünnungsfaktor 2 bzw. 4 multipliziert.

REFERENZBEREICH

Normalbereich für ADAMTS-13 Aktivität: **40 - 130% (n=40)**

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalbereich bestimmt. Die Beurteilung und Interpretation der serologischen Ergebnisse darf nur durch entsprechendes Fachpersonal erfolgen. Dabei muss die Patientenanamnese berücksichtigt werden.

STANDARDISIERUNG

Standards und Kontrollen wurden aus einem Normalspender produziert. Kalibriert wurden sie gegen einen internen Referenzstandard, der aus einem Pool von 300 Normalspendern hergestellt, und mit einer Konzentration von 100% Aktivität definiert wurde.

PRÄZISION

Die Reproduzierbarkeit wurde mit verschiedenen Proben bestimmt (in Serie und von Tag zu Tag). Die Ergebnisse sind wie folgt:

Probe	Intra assay		Inter assay	
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

MESSBEREICH

0,3 % – 105 %

BESTIMMUNGSGRENZE

0,2 %

LITERATUR

Bitte wenden Sie sich an Technoclone oder an Ihren Händler.

DESCRIZIONE DEL PRODOTTO
ANWENDUNG

Il test ELISA TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity è un dosaggio cromogenico per la determinazione dell'attività di ADAMTS-13 nel plasma umano. ADAMTS-13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13) è un enzima (VWF-cleaving protease o VWF-CP) che taglia in modo specifico i polimeri di dimensione anomala di fattore von Willebrand factor (vWF), che induce la formazione di trombi piastrinici in condizioni di stress elevate. Se l'attività di ADAMTS13 è inferiore al normale tali polimeri di grandi dimensioni di vWF si possono accumulare causando eventi trombotici da aggregazione piastrinica, che risultano nella patologia nota come TTP- trombocitopenia purpurea.

COMPOSIZIONE

- 1. ELISA test strips (12), da 8 pozzetti ciascuna, rivestiti con anticorpo monoclonale anti GST. Confezionata in busta in alluminio con dissecante.
- 2. GST-vWF73 Substrato; 2 fiale ; liofilizzato 6 mL.
- 3. Calibratori (Standards) numerati da 1 a 6; liofilizzati; 1 fiala ciascuno da 0,5 mL. Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala.
- 4. plasma di controllo a concentrazione bassa ed alta, liofilizzati; 1 fiala ciascuno da 0,5 mL. Le concentrazioni sono lotto-specifiche; consultare l'etichetta sulla fiala.
- 5. tampone di reazione; 1 fiala; 30 mL; pronto all'uso
- 6. Coniugato: anticorpo monoclonale anti-N10 coniugato con perossidasi: 1 fiala; 12 mL; pronto all'uso
- 7. reagente colorato TMB (Tetramethylbenzidine); 1 fiala; 12 mL; pronto all'uso
- 8. Wash Buffer concentrato, 10 X, 1 fiala, 53 mL.
- 9. Acido solforico soluzione di arresto 0,5 mol/l; 1 fiala di 12 mL, pronta per l'uso.
- 10. Sample dilution Microplate, 1 plate (ONLY for sample dilution!)
- 11. Film adesivo: per le strip del saggio ELISA; 2 pezzi.

MATERIALI NECESSARI MA (NON FORNITI CON IL KIT)

- 1. Acqua bidistillata.
- 2. Cilindro graduato da 500 mL.
- 3. Pipette di precisione da 5, 50, 100 e 1000 µL.
- 4. Pipetta ripetitiva da 200 µL e 1000 µL.
- 5. Pipette multicanale e/o dispensanti da 100 e 200 µL.
- 6. Buretta per ELISA o pipetta multicanale.
- 7. Lettore di piastra ELISA con filtro a 420 nm e con filtro di riferimento a 620 nm se disponibile.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- IVD Per uso diagnostico in vitro
- Tutti i prodotti del sangue o del plasma così come tutti i campioni devono essere considerati come potenzialmente infettivi. Devono essere maneggiati con particolare attenzione e in stretta osservanza delle regole di sicurezza. Le regole riguardanti l'eliminazione sono le stesse applicate allo smaltimento riguardante gli ospedali.
- I calibratori e i plasmidi controllo sono prodotti a partire da sangue umano e ogni plasma è stato testato e trovato negativo per gli anticorpi per l'HIV 1/2, HBs Ag e HVC (guardare l'etichetta sulle fialas). Comunque tutti i prodotti derivati da sangue umano dovrebbero essere maneggiati con cura come se fossero materiale potenzialmente infetto.
- La Stopping Solution (per il substrato antigene) potrebbe essere irritante per la pelle. Se l'acido viene a contatto con gli occhi, risciacquare immediatamente e consultare un dottore.
- Qualche volta i reagenti contengono composti conservanti (mertiolato). Stare attenti a non ingerire! Evitare il contatto con la pelle o le membrane mucose.

STABILITA' E CONSERVAZIONE

La data di scadenza riportata sull'etichetta è relativa alla conservazione della fiala non aperta a 2-8°C.

La stabilità dopo ricostituzione/apertura:

Materiale/Reagente	Stato	Conservazione	Stabilità
Strisce del kit ELISA	Dopo apertura	con il film adesivo nel sacchetto di plastica con un essiccante	Data di scadenza
GST-vWF73 substrato	Dopo ricostituzione	-20 °C	6 settimane
Calibratori, plasmidi controllo	Dopo ricostituzione	-20 °C	6 mesi
Tampone di reazione	Dopo apertura	2 ... 8 °C	6 mesi
Coniugato	Dopo apertura	2 ... 8 °C	4 mesi
Colour Reagent TMB	Dopo apertura	2 ... 8 °C	Data di scadenza
Tampone di lavaggio (10x conc)	Dopo apertura	2 ... 8 °C	6 mesi
Tampone di lavaggio	1+9 diluizioni del concentrato	2 ... 8 °C	3 settimane
Soluzione di arresto	Dopo apertura	2 ... 8 °C	Data di scadenza

PROCEDURE DEL TEST

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Tipologia di campione: plasma umano in citrato. Campioni forse immagazzinati per tre ore alla temperatura ambiente. A -20°C possono essere immagazzinate per parecchi mesi. I campioni non possono essere congelati e non hanno sciolto parecchie volte.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

- 1. Prima di iniziare il saggio, tutti i componenti necessari devono essere portati a temperatura ambiente.
- 2. Preparazione del Washing Buffer: diluire 1 parte in volume del Washing Buffer Concentrate con 9 parti in volume di acqua bidistillata (1+9). Miscelare bene! (Il Washing Buffer diluito è il tampone utilizzato nei lavaggi). Si potrebbero formare dei precipitati cristallini che si scioglieranno a 37°C in 10 minuti.
- 3. Ricostituzione della soluzione substrato vWF73: impiegare 6 mL di acqua distillata e dopo 15 minuti dalla ricostituzione mescolare per 10 secondi al vortex.
- 4. Ricostituzione dei calibratori e dei plasmidi controllo: i calibratori e i plasmidi controllo sono ricostituiti con 500 µL di acqua bidistillata e miscelati per 10 secondi dopo un tempo di ricostituzione di 15 minuti (usare un Vortex Mixer). I reagenti ricostituiti vanno da un aspetto limpido a leggermente torbido.
- 5. Diluizione del Campione / Calibratore / Controllo: diluire i campioni, calibratori e i controlli 31 volte con il tampone di reazione in una micropiastrella per la diluizione dei campioni. Esempio : 150 µL tampone di reazione + 5 µL campione / Calibratore / Controllo.... Per una maggiore precisione aumentare il volume dei reagenti utilizzando una provetta più larga per la diluizione: e.g. 600 µL di tampone di reazione + 20 µL campione / Calibratore / Controllo

PERFORMANCE DEL SAGGIO

INCUBAZIONE GST-vWF73 SUBSTRATO (reference 1,2,3,7,9)	aggiungere GST-vWF73 Soluzione Substrato alle strips della piastra rivestita con anti GST	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 300 µL
INCUBAZIONE DEL CAMPIONE (reference 1,2,5,6,7,9, 10)	Dispensare i calibratori, controllo, campione diluiti nei pozzetti	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	30 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 300 µL
REAZIONE DI CONIUGAZIONE (reference 1,2,7,9)	Aggiungere la Conjugate nei pozzetti	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	60 minuti
LAVAGGI (reference 1,3,4)	Washing Buffer	3 x 300 µL
Reazione TMB (reference 1,2,7,9)	Inserire la TMB nei pozzetti	100 µL
	Incubare a temperatura ambiente	30 minuti
STOPPING (reference 1,2,7)	Inserire la Stopping solution nei pozzetti	100 µL
MISURAZIONE (reference 8)	Lettore di piastre ELISA, 450 nm	Agitare 5 secondi; misurare entro 10 minuti

REFERENCE

- 1. I reagenti di differenti lotti non devono essere mischiati.
- 2. La precisione e la performance, dipendono, tra le altre cose, dai seguenti fattori:
 - miscelare tutte le componenti usate per la diluizione 10 secondi con il Vortex Mixer.
 - utilizzare i calibratori, i controlli e i campioni in duplicato.
 - incubare alla temperatura indicata (RT: temperatura ambiente, 20...25°C).
 - stretto rispetto dell'ordine di aggiunta dei composti nei pozzetti e dei tempi come indicato.
 - il tempo di incubazione del campione, di reazione del coniugato e del substrato come indicato inizia dopo aver aggiunto l'ultimo campione. Il tempo di incubazione non dovrebbe variare di più o meno un 5%.
 - durante il tempo di incubazione e di reazione del coniugato, il tempo impiegato per aggiungere i calibratori/controlli plasma/campioni e/o soluzioni dei coniugati non deve superare i 60 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA (8 pozzetti).
 - durante la reazione con il substrato e allo stopping, il tempo necessario per l'aggiunta del substrato e/o della Stopping Solution non deve superare i 10 secondi per ogni striscia del kit dell'ELISA. Un ridotto tempo di pipettaggio potrebbe essere ottenuto utilizzando pipette ripetitive o pipette multicanale.
- 3. Ogni striscia del kit ELISA deve essere numerata con pennarello indelebile per evitare ogni errore in caso di errato posizionamento nel telaio durante le varie operazioni
- 4. Dopo l'ultimo lavaggio i pozzetti devono essere completamente aspirati, capovolti e posti su carta da blotting, rimuovendo le gocce rimanenti colpendo delicatamente gli stessi
- 5. Dispensare e ottenere una curva di calibrazione per ogni seduta di analisi svolta
- 6. Campioni calibratori e controlli possono essere trasferiti dalla micropiastrella per diluizione alla micropiastrella con pozzetti anti GST mediante pipette multicanale, cambiare il puntale ad ogni uso!
- 7. Non sono necessari passaggi di agitazione della micropiastrella durante il dosaggio
- 8. La precisione del test è incrementata se si calcola la differenza tra la lettura a lunghezza d'onda 450 nm e quella a 620 nm.
- 9. Durante ciascuna incubazione la micropiastrella deve essere coperta con i fogli adesivi forniti nel kit.
- 10. Non è sempre necessario utilizzare tutti i sei calibratori per creare la curva di calibrazione. Per lo screening è sufficiente utilizzare una curva di calibrazione composta dai calibratori 1, 2, 3, 4, e 6, utilizzare una curva di calibrazione composta dai calibratori 2, 3, 4, 5 e 6 è adeguata nel caso si voglia focalizzare l'analisi in un intervallo di valori bassi dell'attività dell'ADAMTS13.

LIMITAZIONI DEL SAGGIO

Samples containing EDTA can not be used because EDTA is a strong inhibitor of ADAMTS13 function.

ANALISI DEI RISULTATI

CALCOLO DEI RISULTATI

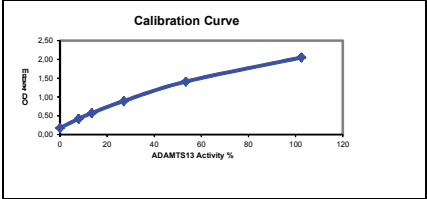
Costruzione di una curva standard: asse delle x: ADAMTS-13 attività [%] asse delle y: densità ottica a 450 nm

utilizzare una visualizzazione linear-linear con spline cubico o un'adeguamento punto/punto.

Calcolo della curva standard:

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

Esempio di curva standard



Misurazione delle concentrazioni dei campioni:

- Calcolare le concentrazioni dalla curva standard.
- Se ci sono campioni con coefficiente d'estinzione più alto di quello del punto più alto della curva, questi devono essere prediluiti con il tampone di incubazione (1+1 o 1+3). La misura delle concentrazioni poi deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione 2 o 4 rispettivamente.

INTERVALLO DI RIFERENZA

Intervallo di normalità ADAMTS-13 Attività: 40 - 130% (n=40) Si raccomanda a ciascun laboratorio di determinare i propri valori di normalità. Nell'interpretazione dei dati di tale dosaggio va tenuta in considerazione tutta la storia clinica del paziente.

STANDARDIZZAZIONE

Standards e Controlli sono stati prodotti da un donatore sano. Sono stati calibrati verso uno standard di riferimento internazionale prodotto da un pool di 300 donatori normali, per i quali è stata definita un'attività del 100%.

PRECISIONE

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

Campione	Intra assay		Inter assay	
	Campione 1	Campione 2	Campione 3	Campione 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

INTERVALLO

0,3 % – 105 %

LIMITE DI RILEVAZIONE

0,2 %

LETTERATURA

Si prega di contattare la Technoclone oppure il Vostro distributore

DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO
APLICACIÓN

TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA es un test cromogénico para la determinación de la actividad de ADAMTS-13 activity en plasma humano. ADAMTS-13 (una metaloproteínasa de tipo desintegrina con trombospondina tipo 1 motivo 13) es una enzima (proteasa con actividad proteolítica sobre el vWF o sobre el vWF-CP) que digiere específicamente multímeros inusualmente largos de factor von Willebrand (vWF) los cuales inducen la formación de trombos plaquetarios bajo situación de elevado stress. Si la actividad del ADAMTS13 se encuentra reducida por alguna razón, multímeros inusualmente largos de vWF pueden acumularse en el torrente sanguíneo provocando trombosis causada por agregación plaquetaria, la cual a su vez puede provocar TTP (púrpura trombocitopénica trombótica).

COMPOSICION

- 1. ELISA Tiras de prueba ELISA (12), con 8 pocillos cada una, recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-GST; el agente deshidratante se suministra en una bolsa de aluminio.
- 2. Substrato GST-vWF73; 2 viales; liofilizados; 6 mL.
- 3. Calibradores (Standards) numerados del 1 al 6; liofilizados; 1 vial de cada uno; 0,5 mL. Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.
- 4. Plasmas control alto (High) y bajo (low), liofilizado, 1 vial de cada uno, 0,5 mL. Las concentraciones dependen del lote; consultar la etiqueta en el vial.
- 5. Tampón de reacción; 1 vial; 30 mL; listo para usarse
- 6. Conjugado: Anticuerpo Monoclonal HRP anti-N10 Antibody: 1 vial; 12 mL; listo para usarse
- 7. Cromógeno TMB (Tetrametilbenzidina); 1 vial; 12 mL; listo para usarse
- 8. Concentrado de tampón de lavado, concentrado 10x (concentrado 10 veces), 1 vial, 53 mL.
- 9. Solución de parada; ácido sulfúrico 0,5 mol/L, 1 vial, 12 mL; listo para usarse
- 10. Microplaca para dilución de muestras, 1 placa (¡SOLO para dilución de muestras!)
- 11. Película adhesiva para las tiras de pruebas ELISA (2).

MATERIAL NECESARIO (no se suministra con el kit)

- 1. Agua destilada
- 2. Probeta graduada (500 mL)
- 3. Pipetas de precisión (5, 50, 100 y 1000 µL)
- 5. Pipeta variable (200 y 1000 µL)
- 6. Pipetas multicanal y/o dispensadoras (100 y 200 µL)
- 7. Lavador ELISA o pipeta multicanal
- 8. Lector ELISA con filtro de 450 nm (filtro de referencia de 620 nm si resulta disponible.)

ADVERTENCIA Y PRECAUCIONES

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

ESTABILIDAD Y CONSERVACION

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

Estabilidad después de la reconstitución/de su apertura:

Material/ Reactivo	Situación	Conservación	Estabilidad
Tiras de prueba	después de su apertura	2...8 °C con película adhesiva en una bolsa de plástico con deshidratante	fecha de caducidad
Substrato GST-vWF73	después de la reconstitución	-20 °C	6 semanas
Calibradores, plasma de control	después de la reconstitución	-20 °C	6 meses
Tampón de reacción	después de su apertura	2 ... 8 °C	6 meses
Conjugado	después de su apertura	2 ... 8 °C	4 meses
Cromóforo TMB	después de su apertura	2 ... 8 °C	fecha de caducidad
Tampón de lavado (concentrado 10x)	después de su apertura	2 ... 8 °C	6 meses
Solución de Tampón de lavado	Dilución 1+9 del concentrado	2 ... 8 °C	3 semanas
Solución de parada	después de su apertura	2 ... 8 °C	fecha de caducidad

MÉTODO DE LA PRUEBA

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Material: plasma humano citratado. La muestra de plasma se puede conservar durante 2 horas a temperatura ambiente. Puede mantenerse congelada a -20° C durante varios meses. No pueden congelarse y descongelarse más de 1 vez.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

- 1. Antes de iniciar la prueba, deberán llevarse a temperatura ambiente todos los componentes necesarios.
- 2. Preparar el tampón de lavado: Diluir una parte de volumen de concentrado de tampón de lavado con 9 partes de volumen de agua destilada (1+9). ¡Mézclese bien! (concentrado de tampón de lavado diluido = tampón de lavado). Pueden producirse precipitaciones cristalinas que se disolverán a 37°C en 10 minutos.
- 3. Reconstituir el solución substrato vWF73: El solución substrato se reconstituye con 6 mL de agua destilada, se mezcla 10 segundos y luego durante 15 minutos con un vortex.
- 4. Reconstituir el plasmas calibradores y controles: Los calibradores y controles se reconstituyen con 500 µL de agua destilada, se mezclan durante 10 segundos y luego durante 15 min con un vortex. Los componentes reconstituidos son claros o ligeramente turbios.
- 5. Muestra/Calibrador/Control. Dilución: Diluir las muestras, calibradores y controles 31-dobles con tampón de reacción en una microplaca de dilución de muestra. Por ejemplo: 150 µL Tampón de Reacción + 5 µL Muestra / Calibrador / Control.... Para una mayor precisión, los volúmenes pueden ser reajustados, usando tubos más grandes para la dilución: Por ejemplo: 600 µL Tampón de Reacción + 20 µL Muestra / Calibrador / Control

MÉTODO DE LA PRUEBA

SUBSTRATO GST-vWF73 INCUBACION (referencia 1,2,3,7,9)	Dispensar GST-vWF73 Solución de substrato en las tiras de prueba recubiertas con anti-GST	100µL
	Incubar a temperatura ambiente	60 minutos
LAVADO (referencia 1,3,4)	Solución de Tampón de lavado	3 x 300 µL
INCUBACIÓN DE LA MUESTRA (referencia 1,2, 5,6,7,9, 10)	Dispensar calibradores, controles, y muestras diluidos en las tiras de pruebas	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	30 minutos
LA VADO (referencia 1,3,4)	Solución de Tampón de lavado	3 x 300 µL
REACCION CONJUGADO (referencia 1,2,7,9)	Dispensar conjugado en los pocillos de las tiras de pruebas	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	60 minutos
LAVADO (referencia 1,3,4)	Solución de Tampón de lavado	3 x 300 µL
REACCIÓN CROMÓFORO TMB (referencia 1,2,7,9)	Dispensar substrato TMB en los pocillos de las tiras de pruebas	100 µL
	Incubar a temperatura ambiente	30 minutos
PARADA (referencia 1,2,7)	Dispensar solución de parada en los pocillos de las tiras de pruebas	100 µL
LECTURA (referencia 8)	Lector ELISA, 450 nm	agitar 5 sec., medir durante 10 min.

References

- 1. No se deben combinar los reactivos de diferentes lotes
- 2. La precisión y reproducibilidad dependen principalmente, entre otras cosas, de los siguientes factores:
 - La mezcla a fondo todas las sustancias empleadas en la dilución, 10 seg y luego con vortex.
 - Deben testarse los calibradores, controles y muestras en duplicado
 - La incubación debe llevarse a cabo a las temperaturas indicadas (RT: Temperatura ambiente, 20...25°C)
 - La estricta observancia del orden pipeteo y de los tiempos indicados
 - El tiempo indicado para la incubación de la muestra, la reacción de conjugado y de substrato se inicia tras pipetear la última muestra. Los tiempos de incubación no deberán variar en más de ±5%.
 - Durante la incubación de la muestra y la reacción de conjugado, el tiempo para pipetear los calibradores/muestras/plasmas de control y/o soluciones de conjugado diluidos, no debe exceder de 60 segundos para la tira de prueba ELISA (8 pocillos).
 - Durante la reacción de substrato y la parada, el tiempo necesario para pipetear el substrato y/o la solución parada no debe exceder de 10 segundos por cada tira de prueba ELISA. Se podrán lograr tiempos breves en las pruebas usando pipetas multicanal y dispensadoras.
- 3. Indicar el número en las tiras con un lápiz resistente al agua para el caso en de que se desprendan accidentalmente de su sitio durante la realización de la prueba.
- 4. Después del último lavado, los pocillos deben ser aspirados a fondo, darlos la vuelta y colocarlos sobre un papel absorbente, los últimos residuos se deben eliminar golpeando suavemente.
- 5. Debe realizarse una curva de calibración en cada ensayo.
- 6. Las muestras/calibradores y Controles pueden transferirse desde la microplaca de dilución a la tiras de prueba anti-GST con una pipeta multicanal. ¡No olvidar cambiar las puntas de pipeta tras cada pipeteo!
- 7. No es necesario agitar después de cada paso de reacción.
- 8. Midiendo la diferencia entre la lectura a 450 y 620 nm se incrementa la precisión del test.
- 9. Durante cada incubación se debe cubrir la microplaca.
- 10. No es siempre necesario usar los seis calibradores para crear una curva de calibrado. Para un cribado de muestras es necesario una curva de calibrado usando los calibradores 1, 2, 3, 4 y 6. Cuando el interés esté centrado particularmente en el rango más bajo de actividad ADAMTS13, una curva de calibrado con los calibradores 2, 3, 4, 5 y 6 es la adecuada.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Muestras que contienen EDTA no pueden utilizarse, ya que el EDTA es un potente inhibidor de la actividad del ADAMTS 13.

RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

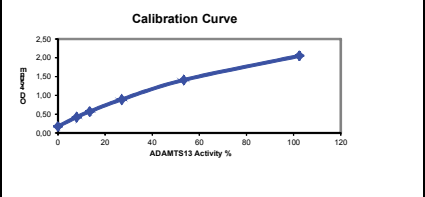
Trazado de una curva de referencia: Eje X: ADAMTS13 Activity [%]
Eje Y: Extinción a 450nm

La curva de referencia es lineal-lineal, únanse los valores mediante una curva punto a punto o cúbic spline.

Evaluación de la curva de referencia:

- El coeficiente de extinción del calibrador más alto deberá estar de entre 1,0 y 2,5.
- El coeficiente de extinción del calibrador más bajo deberá estar ser <0,2.
- La validez de la prueba se puede comprobar sobre la base de los valores de control calculados.

Ejemplo de curva estándar:



Medida de la concentración de las muestras :

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

RANGO DE REFERENCIA

Rango de normalidad para la actividad del ADAMTS-13 es de 40-130% (n=40)

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

ESTANDARDIZACIÓN

Los Calibradores y Controles se han fabricado a partir de plasma de donantes normales. Se han calibrado frente a un estándar interno, el cual se preparó a partir de un pool de 300 donantes normales, y su actividad se definió como 100%.

PRECISIÓN

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

Muestra	Intra assay		Inter assay	
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

RANGO DEL TEST

0,3 % – 105 %

LÍMITE DE DETECCIÓN

0,2 %

BIBLIOGRAFÍA

Le rogamos que se dirija a Technoclone o a su distribuidor.

DESCRIÇÃO DO PRODUTO

UTILIZAÇÃO

O TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA é um teste cromogénico para a determinação da actividade da ADAMTS-13 em plasma humano. A ADAMTS-13 (uma metaloproteinase do tipo desintegrina com trombospondina tipo 1 motivo 13) é uma enzima (protease de clivagem do vWF ou vWF-CP) que especificamente cliva multímeros anormalmente grandes do Factor de vonWillebrand (vWF), os quais induzem a formação dum trombo de plaquetas em situações de elevado stress. Se, no entanto, a actividade da ADAMTS13 está diminuída, por algum motivo, os multímeros anormalmente grandes do vWF podem acumular-se na corrente sanguínea causando trombose devido à agregação plaquetária, que por sua vez pode levar à TTP (púrpura trombocitopénica trombótica).

COMPOSIÇÃO

- 1. Tiras teste de ELISA (12), com 8 poços cada, revestidas com um anticorpo monoclonal anti - GST. O agente secante é fornecido num saco de alumínio.
- 2. Substrato GST-vWF73; 2 frascos; liofilizados; 6 mL.
- 3. Calibradores (Padrões) numerados de 1 a 6; liofilizados; 1 frasco cada; 0,5 mL. **As concentrações são específicas de lote; consulte o rótulo no frasco.**
- 4. Plasmas de controlo alto e baixo, liofilizados, 1 frasco cada, 0,5 mL. **As concentrações são específicas de lote; consulte o rótulo no frasco.**
- 5. Tampão de reacção; 1 frasco; 30 mL; pronto a usar.
- 6. Conjugado: Anticorpo monoclonal anti-N10 conjugado com HRP: 1 frasco; 12 mL; pronto a usar.
- 7. Reagente de cor TMB (Tetrametilbenzidina); 1 frasco; 12 mL; pronto a usar.
- 8. Tampão de lavagem concentrado, concentrado 10 vezes, 1 frasco, 53 mL.
- 9. Solução de paragem; ácido sulfúrico 0,5 mol/L, 1 frasco, 12 mL; pronto a usar.
- 10. Microplaca de diluição de amostras, 1 placa (APENAS para a diluição das amostras!).
- 11. Selador de placas, 2 unidades.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido com o kit)

- 1. Água destilada
- 3. Proveta (500 mL)
- 4. Pipetas de precisão (5, 50, 100 e 1000 µL)
- 5. Pipeta variável (200 e 1000 µL)
- 6. Pipetas de dispensa e/ou Multicanal (100 e 200 µL)
- 7. Lavadora de placas de ELISA ou pipeta Multicanal
- 8. Leitor de ELISA com filtro de 450 nm, e com um filtro de referência de 620 nm se possível.

AVISOS E PRECAUÇÕES

- Apenas para utilização no diagnóstico *in vitro*.
- Todos os produtos provenientes de sangue humano ou plasma, bem como as amostras devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem ser manuseados com especial atenção e com rigorosa observância das regras de segurança. Os requisitos para eliminação de desperdícios são os mesmos que os aplicados para a eliminação de lixo hospitalar.
- Os controlos e calibradores são feitos a partir de sangue humano e qualquer plasma individual envolvido no processo foi testado e considerado negativo para AgHbs, Anticorpo anti-HIV 1/2 e Anticorpo anti - HCV (veja rótulos nos frascos). No entanto, todos os produtos provenientes de sangue humano devem ser manuseados como material potencialmente infeccioso.
- A solução de paragem (ácido sulfúrico) pode irritar a pele. Se o ácido entrar em contacto com os olhos, deverá lavá-los imediatamente com água e deverá consultar um médico.
- Por vezes, os reagentes contêm agentes conservantes. Não ingerir! Evite contacto com a pele ou membranas mucosas!

ARMAZENAMENTO E ESTABILIDADE

A data de validade impressa nos rótulos aplica-se aos frascos por abrir e armazenados entre + 2 a 8 °C. Estabilidade após reconstituição/abertura:

Material/ Reagente	Estado	Armazenamento	Estabilidade
Tiras teste de ELISA	Após abertura	2 a 8 °C com filme adesivo em saco de plástico com agente secante	Data de Validade
Substrato GST-vWF73	Após reconstituição	-20 °C	6 semanas
Calibradores, plasmas de controlo	Após reconstituição	-20 °C	6 meses
Tampão de reacção	Após abertura	2 ... 8 °C	6 meses
Conjugado	Após abertura	2 ... 8 °C	4 meses
Reagente de cor TMB	Após abertura	2 ... 8 °C	Data de Validade
Tampão de lavagem (concentrado 10 vezes)	Após abertura	2 ... 8 °C	6 meses
Tampão de lavagem	Diluição 1+9 do concentrado	2 ... 8 °C	3 semanas
Solução de paragem	Após abertura	2 ... 8 °C	Data de Validade

PROCEDIMENTO DO TESTE

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Material de amostra: plasma humano colhido com citrato de sódio. As amostras podem ser armazenadas à temperatura ambiente, até duas horas. As amostras podem ser armazenadas a -20°C durante vários meses. As amostras não devem ser congeladas e descongeladas várias vezes.

PREPARAÇÃO DE REAGENTE

- 1. Antes de começar o teste, todos os componentes necessários devem estar à temperatura ambiente.
- 2. Preparação do tampão de lavagem: Dilua 1 parte da solução de lavagem concentrada com 9 partes de água destilada (1+9). Misture bem! (Tampão de lavagem concentrado após diluição = tampão de lavagem). Pode haver precipitações cristalinas que se dissolverão a 37°C em 10 minutos.
- 3. Reconstituição do Substrato vWF73: Solução de Substrato é reconstituída com 6 mL de água destilada e agitada durante 10 segundos após um tempo de reconstituição de 15 minutos (agitador vortex).
- 4. Reconstituição do calibradores e plasmas de controlo: Os calibradores e plasmas de controlo são reconstituídos com 500 µL de água destilada e agitados durante 10 segundos após um tempo de reconstituição de 15 minutos (agitador vortex). Os componentes reconstituídos apresentam-se claros a ligeiramente turvos.
- 5. Diluição das Amostra/ Calibrador/ Controlo: Dilua as amostras, calibradores e controlos 31vezes com o tampão de reacção numa microplaca de diluição de amostra Exemplo: 150 µL Tampão de reacção + 5 µL Amostra/ Calibrador/ Controlo... Para uma precisão mais elevada, os volumes podem ser superiores, use tubos maiores para as diluições: e.x 600 µL tampão de reacção + 20 µL Amostra/ Calibrador/ Controlo

EXECUÇÃO DO TESTE

SUBSTRATO GST-vWF73 INCUBAÇÃO (referência 1,2,3,7,9)	Adicione Solução substrato GST-vWF73 na placa tiras de teste revestidas com anti-GST	100µL
	Incube à temperatura ambiente	60 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	3 x 300 µL
INCUBAÇÃO DA AMOSTRA (referência 1,2, 5,6,7,9, 10)	Pipete os calibradores, plasmas de controlo e amostras diluídos nos poços teste	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	30 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	3 x 300 µL
REACÇÃO DO CONJUGADO (referência 1,2,7,9)	Pipete o conjugado nos poços	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	60 minutos
LAVAGEM (referência 1,3,4)	Tampão de lavagem	3 x 300 µL
REACÇÃO DO REAGENTE DE COR TMB (referência 1,2,7,9)	Pipete Substrato TMB nos poços teste	100 µL
	Incube à temperatura ambiente	30 minutos
PARAGEM (referência 1,2,7)	Pipete solução de paragem nos poços	100 µL
MEDICÇÃO (referência 8)	Leitor de ELISA, 450 nm	agite 5 segundos, meça dentro de 10 min.

Referências

- 1. Não devem ser combinados reagentes de lotes diferentes
- 2. A precisão e o desempenho, entre outros, dependem essencialmente dos seguintes factores:
 - Agitação cuidada de todas as substâncias usadas para diluição, 10 segundos no agitador Vortex
 - Calibradores do teste, controlos e amostras em duplicado
 - Incubação à temperatura indicada (TA: temperatura ambiente, 20 a 25°C)
 - Cumprimento rigoroso da ordem de pipetagem e do tempo tal como indicado
 - O tempo para a incubação de amostra, para a reacção do conjugado e do substrato, tal como indicado, começa após a pipetagem da última amostra. Os tempos de incubação não devem variar mais do que ± 5%.
 - Durante a incubação de amostra e a reacção do conjugado, o tempo para pipetar os calibradores/ plasmas de controlo /amostra e/ou o conjugado não deve exceder 60 segundos por tira de testes de ELISA (8 poços).
 - Durante as reacções do substrato e de paragem, o tempo necessário para pipetar o substrato e/ou a solução de paragem não deve exceder 10 segundos por tira de testes de ELISA. Tempos de pipetagem curtos podem ser garantidos usando pipetas Multicanal.
- 3. Marque/numere as tiras com um marcador resistente à água no caso das tiras acidentalmente caírem da armação durante o decorrer do procedimento.
- 4. Após a última lavagem, os poços devem ser aspirados completamente, devem ser virados para baixo e colocados num papel absorvente; batendo suavemente, deve ser removido o líquido remanescente.
- 5. Para cada ensaio tem que ser criada uma curva de calibração.
- 6. As amostras / calibradores / controlos podem ser transferidos da Microplaca de diluição para a anti-GST Microplata através da pipeta Multicanal. Não se esqueça de mudar as pontas em todas as tiras!
- 7. Não é necessária qualquer agitação durante cada passo da reacção.
- 8. Medindo a diferença em comprimento de onda a 450 e 620 nm a precisão do teste é aumentada.
- 9. Para cada passo de incubação a placa deve ser coberta com o selador de placa.
- 10. Nem sempre é necessário usar os seis calibradores para realizar a curva de calibração, para um rastreio das amostras é suficiente realizar a curva de calibração com os calibradores 1, 2, 3, 4 e 6. Quando o foco está particularmente no limite inferior da actividade da ADAMTS13, é adequado realizar a curva de calibração com os calibradores 2, 3, 4, 5 e 6.

LIMITAÇÃO DO TESTE

Não podem ser usadas amostras que contêm EDTA porque o EDTA é um forte inibidor da função da ADAMTS13.

RESULTADOS DAS ANÁLISES

CÁLCULO DOS RESULTADOS

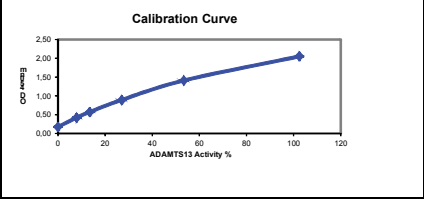
Preparar a curva de referência: Eixo dos X: Actividade da ADAMTS13 [%]
Eixo dos Y: Absorvências a 450nm

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

Avaliação da curva de referência:

- A densidade óptica do calibrador mais alto deverá estar entre 1,0 e 2,5.
- A densidade óptica do calibrador mais baixo deverá ser <0,2
- A validação do teste pode ser verificada com base nos valores do controlo calculados.

Exemplo de curva de calibração



Medição da concentração das amostras

- Leia a concentração a partir da curva de referência
- Se houver amostras com densidades ópticas maiores do que a densidade óptica do ponto mais alto da curva, elas devem ser previamente diluídas com tampão de reacção (1+1 ou 1+3). Nesse caso a concentração medida tem que ser multiplicada pelo factor de diluição 2 ou 4, respectivamente.

INTERVALO DE REFERÊNCIA

Intervalo normal para a Actividade da ADAMTS-13: 40 - 130% (n=40)
É recomendável que os laboratórios individualmente, estabeleçam o seu próprio intervalo normal. Na interpretação dos resultados serológicos, deve ser tido em consideração o histórico do paciente.

PADRONIZAÇÃO

Os padrões e controlos foram produzidos a partir de um dador normal. Foram calibrados contra um padrão de referência interno que foi produzido a partir de uma pool de 300 dadores normais e definidos com uma actividade de 100%.

PRECISÃO

A reprodutibilidade foi determinada com amostras diferentes (em séries e dia a dia). Foram obtidos os seguintes resultados:

Amostra	Intra assay		Inter assay	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

INTERVALO DO ENSAIO LIMITE DE DETECÇÃO

0,3 % – 105 % 0,2 %

BIBLIOGRAFIA

Por favor entrar em contacto com a Technoclone ou com o seu distribuidor local.

DESCRIPTION DU PRODUIT

UTILISATION PRÉVUE

Le TECHNOZYM® ADAMTS-13 Activity ELISA est un test chromogénique pour la détermination de l'activité ADAMTS-13 dans le plasma humain. L' ADAMTS-13 (désintégrine-like et métalloprotéinase avec thrombospondine de type 1 motif 13) est une protéase spécifique du facteur von Willebrand (vWF) ou vWF-CP qui clive spécifiquement et réduit la taille anormalement grande des multimères du facteur von Willebrand (vWF), lesquels permettent la formation d'agrégats plaquettaires dans la microcirculation où les forces de cisaillement sont élevées. Si l'activité de l'ADAMTS-13 est plus basse pour diverses raisons, le vWF circule sous la forme anormale de multimères de grandes tailles pouvant s'accumuler dans le sang entraînant des phénomènes de coagulation anormaux, par activation et adhésion des plaquettes puis formation de thrombi, qui peuvent à son tour générer un Purpura Thrombotique Thrombocytopénique (PTT).

COMPOSITION

- 12 barrettes de test ELISA contenant 8 puits recouverts avec un anticorps monoclonal anti GST. Les barrettes sont emballées dans un sac en aluminium contenant un agent dessiccant.
- Substrat lyophilisé GST-vWF73, 2 flacons de 6 mL
- Calibreurs numérotés de 1 à 6, lyophilisés, chaque calibreur est fourni dans un flacon de 0.5 mL. **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- Contrôles plasmatiques haut et bas, lyophilisés et fournis chacun dans un flacon de 0.5mL. **Les concentrations sont dépendantes du lot; consulter les étiquettes sur les flacons.**
- Tampon de réaction, 1 flacon prêt à l'emploi de 30 mL.
- Solution de Conjugué : anticorps monoclonal anti-N10 conjugué à de l' HRP, 1 flacon prêt à l'emploi de 12 mL.
- Substrat chromogène : TMB (tétraméthylbenzidine), 1 flacon prêt à l'emploi de 12 mL.
- Tampon de lavage 10 fois concentré, 1 flacon de 53 mL.
- Solution d'arrêt: acide sulfurique 0.5 mol/L; 1 flacon prêt à l'emploi de 12 mL.
- 1 microplaque servant UNIQUEMENT à la dilution des échantillons : plaque de dilution
- 2 films protecteurs pour microplaque.

MATÉRIEL REQUIS (non fourni avec le kit)

- Eau distillée
- Eprouvette graduée de 500 mL
- Pipettes de précision (5, 50, 100, 1000 µL)
- Pipettes réglables (200 et 1000 µL)
- Pipettes multicanaux (100 et 200 µL)
- Automate de lavage ELISA ou pipettes multicanaux
- Lecteur de plaque ELISA équipée d'un filtre à 450 nm et si possible avec un filtre de référence à 620 nm

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Dispositif médical IVD uniquement pour le diagnostic in vitro.
- Tous les produits élaborés à partir de sang humain et de plasma aussi bien que tous les échantillons doivent être considérés comme étant potentiellement infectieux. Ils doivent être manipulés avec une attention particulière, et ceci dans la stricte observance des règles de sécurité. Les règles concernant le stockage des déchets sont identiques à celles appliquées à l'hôpital.
- Les standards et contrôles plasmatiques sont élaborés à partir de sang humain, et tous les plasmas utilisés ont été vérifiés HBS Ag, HIV ½ Ab et HCV-Ag négatifs (voir les étiquettes sur le kit et/ou sur les flacons). Cependant, comme tout plasma humain, ils doivent être manipulés comme du matériel potentiellement infectieux.
- La solution d'arrêt (acide sulfurique) peut être irritante pour la peau. En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement avec de l'eau et consulter un médecin.
- Les réactifs contiennent des agents conservateurs. Ne pas les avaler ! Éviter tout contact avec la peau ou les muqueuses.

STABILITÉ ET STOCKAGE

La date d'expiration des réactifs sur les flacons concernent uniquement le stockage des flacons non ouverts à +2 / +8°C. Stabilité après reconstitution / après ouverture:

Matériel/Réactif	État	Stockage	Stabilité
Bandelettes de test ELISA	Après ouverture	+2 / +8°C sous film adhésif avec agent dessiccant dans un sac en plastique	Date de péremption
Substrat GST-vWF73	Après reconstitution	-20°C	6 semaines
Calibreurs et contrôles	Après reconstitution	-20°C	6 mois
Tampon de réaction	Après ouverture	2...8°C	6 mois
Solution de Conjugué	Après ouverture	2...8°C	4 mois
Substrat Chromogène TMB	Après ouverture	2...8°C	Date de péremption
Tampon de lavage concentré	Après ouverture	2...8°C	6 mois
Tampon de lavage dilué au 1/10 ^{ème}	Après dilution	2...8°C	3 semaines
Solution d'arrêt	Après ouverture	2...8°C	Date de péremption

PROCÉDURE DU TEST

PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Matériel: Plasma citraté humain. Les échantillons peuvent être conservés jusqu'à 2 heures au maximum à température ambiante. Mais ils peuvent être stockés pendant plusieurs mois à -20°C. Les échantillons ne doivent pas être congelés et décongelés plusieurs fois.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- Avant de commencer les dosages, tous les composants doivent être placés et stabilisés à température ambiante.
- Préparation du tampon de lavage à utiliser: Diluer 1 vol de tampon de lavage concentré avec 9 volumes d'eau distillée (1+9). Bien mélanger ! Il se peut qu'il y ait des précipitations cristallines: celles-ci se dissolvent à 37°C en 10 minutes.
Le tampon de lavage cité par la suite est toujours du tampon de lavage dilué
- Reconstitution de la solution de substrat vWF73 : La solution de substrat est reconstituée avec 6 mL d'eau distillée. Attendre la stabilisation pendant 15 minutes puis agiter la solution au vortex pendant 10 secondes.
- Reconstitution des calibreurs et des contrôles plasmatiques : Les calibreurs et les contrôles plasmatiques sont reconstitués avec 500 µL d'eau distillée. Attendre la stabilisation pendant 15 minutes puis agiter la solution au vortex pendant 10 secondes. Les solutions reconstituées sont claires ou très légèrement troubles.
- Dilution des échantillons / calibreurs / contrôles :
Les échantillons / calibreurs / contrôles doivent être dilués au préalable 31 fois avec le tampon de réaction en utilisant la plaque de dilution.
Exemple : 150 µL de tampon de réaction + 5 µL d'échantillon / calibreur / contrôle
Exemple : 300 µL de tampon de réaction + 10 µL d'échantillon / calibreur / contrôle
Pour une plus grande précision, les volumes peuvent être augmentés, en utilisant des tubes de dilution plus grands : soit 600 µL de tampon de réaction + 20 µL d'échantillon / calibreur / contrôle.

PERFORMANCE DU TEST

INCUBATION DU SUBSTRAT GST-vWF73 (référence 1,2,3,7,9)	Ajouter la solution de substrat GST-vWF73 dans chaque puits des barrettes recouvertes d'anti-GST	100 µL
	Incuber à température ambiante	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	Tampon de lavage, 3 lavages	3 x 300 µL
INCUBATION DES ÉCHANTILLONS (référence 1,2,5,6,7,9,10)	Ajouter les calibreurs / contrôles / échantillons dilués dans chaque puits	100 µL
	Incuber à température ambiante	30 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	Tampon de lavage, 3 lavages	3 x 300 µL
REACTION AVEC LE CONJUGUE (référence 1,2,7,9)	Ajouter la solution de conjugué dans chaque puits	100 µL
	Incuber à température ambiante	60 minutes
LAVAGE (référence 1,3,4)	Tampon de lavage, 3 lavages	3 x 300 µL
REACTION DU CHROMOGENE (référence 1,2,7,9)	Ajouter la solution de substrat chromogène dans chaque puits	100 µL
	Incuber à température ambiante	30 minutes
SOLUTION D'ARRÊT (référence 1,2,7)	Ajouter la solution d'arrêt dans chaque puits	100 µL
MESURE (référence 8)	Lecture de plaque ELISA, 450 nm	Agiter 5 sec., mesurer avant 10 minutes

- Références :
- Ne pas utiliser ensemble des réactifs provenant de différents lots.
 - Le bon déroulement et la précision du test dépendent des facteurs suivants:
 - Bien mélanger les substances utilisées lors des dilutions : vortex 10 secondes.
 - Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être testés en double.
 - Les incubations doivent être effectuées à la température indiquée (température ambiante : 20-25°C).
 - Respecter strictement l'ordre de pipetage et le temps d'incubation pour chaque élément comme indiqué.
 - Le temps d'incubation des échantillons, conjugués, et substrat démarre après le pipetage du dernier échantillon. Les temps d'incubation ne doivent pas varier de ± 5 %.
 - Durant l'incubation des échantillons et la réaction avec le conjugué, **les temps de pipetage du calibreur / échantillon / contrôle et/ou des solutions conjuguées, ne doivent pas excéder 60 secondes par barrette de test ELISA** (8 puits).
 - Durant la réaction du substrat et lors de l'arrêt de la réaction, le temps nécessaire au pipetage du substrat et/ou de la solution d'arrêt ne doit pas excéder 10 secondes par barrette. Pour cela utiliser de préférence une pipette multicanaux
 - Numéroté les barrettes avec un feutre résistant à l'eau au cas où les bandes tombent accidentellement de la plaque durant le test.
 - Après le dernier lavage, les puits doivent être rigoureusement secs : pour cela, retourner la plaque d'analyse sur du papier absorbant et la taper doucement.
 - Une courbe de calibration doit être effectuée pour chaque analyse.
 - Echantillons / calibreurs / contrôles peuvent être transférés de la microplaque de dilution à la plaque d'analyse avec une pipette multicanaux. Ne pas oublier de changer les embouts pour chaque barrette !
 - Aucune agitation n'est nécessaire à chaque étape de réaction.
 - En mesurant la différence de densité optique à 450 nm et 620 nm, la précision de l'analyse est augmentée.
 - Durant chaque étape d'incubation, la microplaque ou les barrettes doivent être recouvertes par le film protecteur.
 - Il n'est pas obligatoire d'utiliser les six calibreurs pour la courbe de calibration.
- Pour un screening d'échantillons, une courbe de calibration utilisant les calibreurs 1, 2, 3, 4 et 6 est suffisante. Quand la cible de l'activité ADAMTS-13 est dans l'échelle basse, une courbe de calibration avec les calibreurs 2, 3, 4, 5 et 6 est adaptée.

LIMITES DU TEST

Les échantillons contenant de l'EDTA ne peuvent être utilisés car l'EDTA est un inhibiteur fort de la fonction de l'ADAMTS-13.

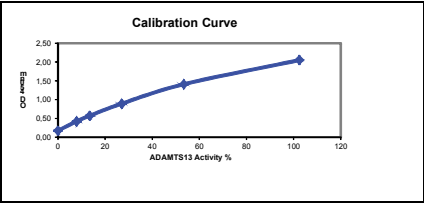
ANALYSE DES RÉSULTATS

CALCUL DES RÉSULTATS

Établissement de la gamme d'étalonnage :
Axe des X: Activité ADAMTS-13 (%)
Axe des Y : Densité optique mesurée à 450 nm
Le graphique est de type linéaire-linéaire avec une droite de calibration polynomiale ou avec un tracé point à point.

- Evaluation de la gamme d'étalonnage :
- La densité optique du calibreur le plus grand doit se situer entre 1.0 et 2.5.
 - La densité optique du plus faible calibreur doit être inférieure à 0,2.
 - La validité du test doit être vérifiée sur la base des valeurs calculées des contrôles.

Exemple de gamme d'étalonnage :



- Mesure des concentrations des échantillons :
- Lire la concentration à partir de la gamme d'étalonnage.
 - Si des échantillons ont une densité optique supérieure à celle du point le plus haut de la gamme d'étalonnage, ils doivent alors être pré-dilués avec le tampon de réaction (1+1 ou 1+3). La concentration mesurée doit alors être multipliée par 2 ou 4, respectivement.

INTERPRETATION DES RESULTATS / GAMME DE REFERENCE
Les valeurs normales pour l'activité ADAMTS-13 sont comprises entre **40 et 130 % (n=40)**
Il est recommandé pour chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales. Lors de l'interprétation des résultats sérologiques, l'historique du patient doivent être pris en compte.

STANDARDISATION

Les standards et les contrôles sont produits à partir de donneurs normaux. Ils ont été calibrés par rapport à un étalon standard interne, fabriqué à partir d'un pool de 300 donneurs normaux et défini comme ayant une activité à 100 %.

PERFORMANCES

Les performances sont établies à partir des données ci-dessous. Les résultats obtenus peuvent varier selon les Laboratoires.

PRECISION

La reproductibilité a été déterminée avec différents échantillons (en séries et sur plusieurs jours) Les résultats suivants ont été obtenus:

échantillon	Intra assay variation		Inter assay variation	
	échantillon 1	échantillon 2	échantillon 3	échantillon 4
N	40	40	10	10
Mean (% activity)	71,3	8,6	68,7	8,2
SD (% activity)	3,8	0,4	4,7	0,7
CV (%)	5,4	5,2	6,8	8,0

LINEARITE

0,3 % – 105 %

LIMITE DE DETECTION

0,2 %

LITTÉRATURE

Veillez vous adresser SVP à la société Technoclone ou directement à votre revendeur