

ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity*

REF 812



EC	REP
----	-----

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

INTENDED USE

The ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity assay is a fluorescence resonance energy transfer (FRET) assay for the measurement of ADAMTS13 in human plasma. The assay is 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} An ADAMTS13 activity level below 5% of normal leads to an accumulation of UL-vWF multimers in plasma.⁴ The UL-vWF multimers bind to receptors on platelets inducing platelet aggregation and formation of intravascular microthrombi.

Congenital TTP is a rare heritable disorder caused by mutations within the ADAMTS13 gene which 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 enzyme activity.⁷ Measurement of the ADAMTS13 activity level has been useful in identifying patients with TTP from other thrombocytopenic conditions such as hemolytic uremic syndrome (HUS) and idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP).⁸

The existing assays for measuring ADAMTS13 activity including multimer analysis, collagen binding and vWF ELISAs can be long, difficult to perform and highly variable. A rapid and easy to perform FRET assay using a synthetic VWF73 peptidyl substrate was described by Kokame, *et al.*⁹ Recently, Zhang, *et al.*, developed a novel recombinant VWF86 FRET substrate based upon autoquenching of fluorescein.¹⁰

PRINCIPLE OF THE METHOD

ACTIFLUOR ADAMTS13 is a FRET assay that measures the amount of ADAMTS13 activity in human plasma. A citrated plasma sample is assayed for ADAMTS13 protease activity using recombinant VWF86-ALEXA FRET substrate. Proteolytic cleavage of the VWF86-ALEXA FRET substrate between the tyr/met residues by ADAMTS13 uncouples the ALEXA fluorochromes resulting in an increase in fluorescence. The increase in fluorescence over time (V_{max}) due to cleavage of the substrate by ADAMTS13 is monitored at 37°C using a spectrofluorometer ($Ex=485\text{ nm}$; $Em=535\text{ nm}$). A standard curve is constructed using normal plasma with a known concentration of ADAMTS13. The ADAMTS13 activity in the plasma is determined by interpolation of the V_{max} values from the standard curve.

* United States Patent No. 7,270,976

REAGENTS – Sufficient for assaying 16 samples in duplicate

- R1 Fluorescence Microwells**, 48 (white)
R2 ADAMTS13 Standard, 250 µL, 2 vials (lyophilized)
R3 ADAMTS13 Positive Control, 150 µL (lyophilized)
R4 DMSO, 0.5 mL
R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrate, 300 µL (lyophilized)
R6 Assay Buffer, 10 mL, 2 vials (lyophilized)
R7 ADAMTS13 Inactivated Plasma, 0.5 mL, 3 vials (lyophilized)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

This product contains human source material that 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 registered methods. As no known test method can provide complete assurance that products derived from human specimens will not transmit HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 or other blood-borne pathogens, this reagent should be handled as recommended for any potentially infectious human specimen.

Do not use kit components beyond the expiration date. Do not mix reagents from different kits. Avoid microbial contamination of the kit components. Do not mouth pipette.

FRET substrate	Warning		H315, H319, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313	
Assay Buffer	Danger	  	CONT	4-Morpholinopropansulphonic acid, Sodium azide H302, H311, H315, H319, H335, H411, P261, P264, P270, P273, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313

Hazard Statements:

H302 Harmful if swallowed.
H311 Toxic in contact with skin.
H315 Causes skin irritation.
H319 Causes serious eye irritation.
H335 May cause respiratory irritation.
H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Precautionary Statements:

P261 Avoid breathing dust.
P264 Wash thoroughly after handling.
P270 Do not eat, drink or smoke when using this product.
P273 Avoid release to the environment.
P280 Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P302 + P352 IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.

Precautionary Statements

P305 + P351 + P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P332 + P313 If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
P337 + P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

REAGENT PREPARATION AND STORAGE

R2 ADAMTS13 Standard

Reconstitute a vial with 250 µL of filtered deionized or distilled water. Let stand for 15 minutes at room temperature (18°-25°C) before gently mixing. See the vial label for the lot specific standard concentration "C". The ADAMTS13 Standard may be held at room temperature until use. Store reconstituted standard at 2°-8°C if not used within 2 hours. The standard is stable for up to 4 hours when at 2°-8°C and for up to 12 weeks when stored at -70°C or colder. Avoid multiple freeze-thaws.

R3 Positive Control

Reconstitute with 150 µL of filtered deionized or distilled water. Let stand for 15 minutes at room temperature (18°-25°C) before gently mixing. Positive Control may be held at room temperature until use. Store reconstituted control at 2°-8°C if not used within 2 hours. The Positive Control is stable for up to 4 hours when at 2°-8°C and for up to 12 weeks when stored -70°C or colder. Avoid multiple freeze-thaws.

R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrate

Prepare a 25% DMSO solution by diluting the DMSO reagent 1:4 with filtered deionized water. Reconstitute the substrate with 300 µL of the 25% DMSO solution. Let stand for 15 minutes at room temperature (18°-25°C) before gently mixing. DO NOT VORTEX! NOTE: Protect from light. The substrate may be held at room temperature until use. The ALEXA488-VWF86 FRET Substrate is stable for up to 2 weeks when protected from light and stored at 2°-8°C and for up to 12 months when stored at -20°C or colder. Avoid multiple freeze-thaws.

R6 Assay Buffer

Reconstitute a vial of Assay Buffer with 10 mL of filtered deionized or distilled water. Let stand for 15 minutes before briefly vortexing. A vial contains sufficient Assay Buffer to perform 24 assays. Assay Buffer is stable for up to 1 day at room temperature (18°-25°C) and for up to 12 weeks when stored at -20°C.

R7 ADAMTS13 Inactivated Plasma

Reconstitute a vial of ADAMTS13 Inactivated Plasma with 500 µL of filtered deionized or distilled water. Let stand for 15 minutes at room temperature (18°-25°C) before gently mixing. The ADAMTS13 Inactivated Plasma may be held at room temperature until use. Store reconstituted plasma at 2°-8°C if not used within 2 hours. The ADAMTS13 Inactivated Plasma is stable for up to 4 hours when at 2°-8°C and for up to 12 weeks when stored at -70°C or colder. Avoid multiple freeze-thaws.

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, January 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 1,500 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at room temperature and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored at -70°C for up to 6 months
4. Frozen plasma should be thawed rapidly at 37°C. Thawed plasmas should be stored at room temperature and assayed within 2 hours.

PROCEDURE

Materials Provided – See Reagents

Materials Required But Not Provided

filtered deionized or distilled water
8-channel pipette covering 50-200 µL
1-channel pipette covering 10-200 µL
microcentrifuge tubes, 1.5 mL
microwell plate fluorometer

Preparation of Standards and Reagents

A. Preparation of ADAMTS13 Standards

Prepare seven (7) ADAMTS13 standards for generating the standard curve by making serial dilutions of the ADAMTS13 Standard in microfuge tubes as follows:

Tube	Standard Concentration	Volume of	Added to
1	"C" ng/mL	120 µL of Standard	0 µL
2	C/2 ng/mL	60 µL from Tube 1	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma
3	C/4 ng/mL	60 µL from Tube 2	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma
4	C/8 ng/mL	60 µL from Tube 3	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma
5	C/16 ng/mL	60 µL from Tube 4	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma
6	C/32 ng/mL	60 µL from Tube 5	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma
7	0 ng/mL	0 µL	60 µL of ADAMTS13 Inactivated Plasma

B. Preparation of Sample Plasma and Positive Control

Sample plasma and Positive Control are each diluted 1:2 with ADAMTS13 Inactivated Plasma by adding 50 µL of citrated plasma or Positive Control to 50 µL of Inactivated Plasma and mixing gently. Hold at room temperature.

C. Preparation of ALEXA488-VWF86 FRET Substrate

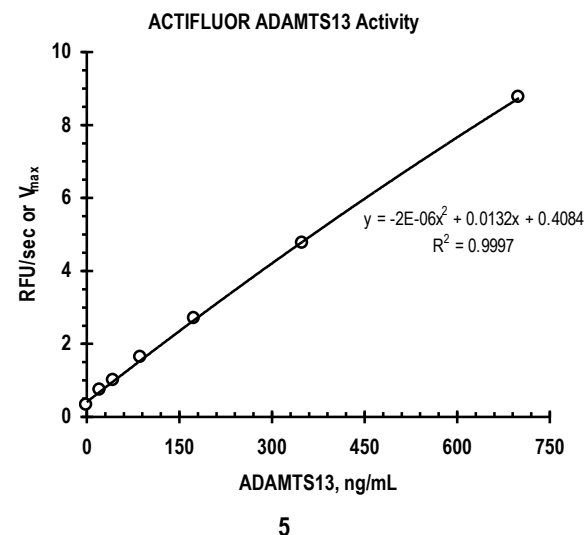
Pre-warm the Assay Buffer to 37°C. Just prior to use in Step 5 below, dilute the reconstituted ALEXA488-VWF86 FRET Substrate 1:25 with Assay Buffer (e.g. add 0.2 mL of Substrate to 4.8 mL of Assay Buffer). Note: The assay requires 1.6 mL of prepared substrate for every 16 microwells used.

Assay Procedure (Kinetic Method)

1. Add 80 µL of Assay Buffer to each microwell to be used.
2. Add 20 µL of each ADAMTS13 Standard from Step A to wells A1-A2 through G1-G2 respectively. Add 20 µL of 1:2 diluted Positive Control from Step B to wells H1-H2.
3. Add 20 µL of 1:2 diluted plasma samples from Step B to each of two microwells.
4. Place the microwell plate in a fluorescence plate reader set at Ex=485 nm and Em=535 nm, with a cut-off at 530 nm, and the temperature set at 37°C. Use a low setting for photomultiplier tube. For readers using filters, use an FITC filter combination set. Allow the standards and samples to warm for 3 minutes.
5. Add 100 µL of 1:25 diluted ALEXA488-VWF86 FRET Substrate from Step C to each microwell.
6. Measure the increase in fluorescence for 20 minutes, collecting data at 20 second intervals. Calculate the rate of change in fluorescence, RFU/sec or V_{max} .

RESULTS

A standard curve is constructed by plotting the RFU/sec or V_{max} for each standard versus the corresponding concentration of ADAMTS13 in ng/mL. A standard curve should be generated each time the assay is performed. A representative standard curve using a SpectraMax® Spectrofluorometer (Molecular Devices, CA) is shown below.



CALCULATION (Kinetic Method)

Interpolate the ADAMTS13 concentration in the diluted sample and Positive Control directly from the standard curve via the RFU/sec or V_{max} of the sample. Multiply this concentration by 2 to obtain the ADAMTS13 concentration in the neat sample and Positive Control. If the RFU/sec or V_{max} of the sample falls above the range of the standard curve, dilute the plasma further with ADAMTS13 Inactivated Plasma and repeat the assay.

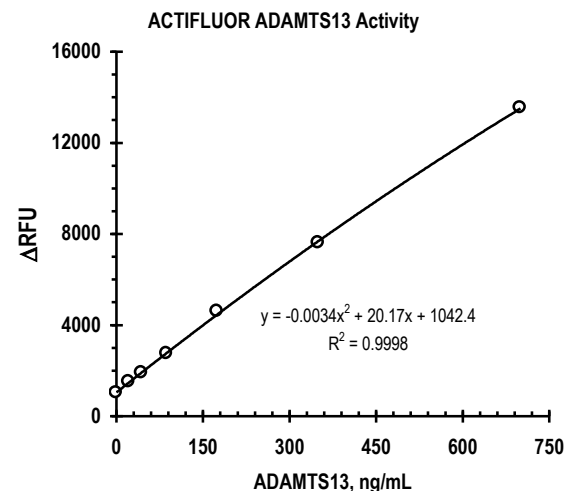
Alternative Assay Procedure (Endpoint Method)

If the fluorescence plate reader is not suitable for measurement in the kinetic mode, the endpoint method can be used.

1. Add 80 μ L of Assay Buffer to each microwell to be used.
2. Add 20 μ L of each ADAMTS13 Standard from Step A to wells A1-A2 through G1-G2 respectively. Add 20 μ L of 1:2 diluted Positive Control from Step B to wells H1-H2.
3. Add 20 μ L of 1:2 diluted plasma samples from Step B to each of two microwells.
4. Place the microwell plate in a fluorescence plate reader set at $Ex=485$ nm and $Em=535$ nm, with a cut-off at 530 nm, and the temperature set at 37°C. Use a low setting for photomultiplier tube. For readers using filters, use an FITC filter combination set. Allow the standards and samples to warm for 3 minutes.
5. Add 100 μ L of 1:25 diluted ALEXA488-VWF86 FRET Substrate from Step C to each microwell.
6. Immediately read the fluorescence in the microwells ($T=0$).
7. Incubate the microwells for 20 minutes at 37°C. Read the fluorescence again ($T=20$). Calculate the net change in fluorescence, ΔRFU ($RFU_{T=20} - RFU_{T=0}$).

RESULTS

A standard curve is constructed by plotting the ΔRFU for each standard versus the corresponding concentration of ADAMTS13 in ng/mL. A standard curve should be generated each time the assay is performed. A representative standard curve using a SpectraMax® Spectrofluorometer (Molecular Devices, CA) is shown below.



CALCULATION (Endpoint method)

Interpolate the ADAMTS13 concentration in the diluted sample and Positive Control directly from the standard curve via the ΔRFU . Multiply this concentration by 2 to obtain the ADAMTS13 concentration in the neat sample and Positive Control. If the ΔRFU of the sample falls above the range of the standard curve, dilute the plasma further with ADAMTS13 Inactivated Plasma and repeat the assay.

EXPECTED VALUES

In a study of normal individuals ($n=234$), the mean (± 1 SD) ADAMTS13 activity level was found to be 666 ± 135 ng/mL.

QUALITY CONTROL

The Positive Control should be included whenever the assay is performed. If the Positive Control fails to fall within the specified range, the test should be repeated. Contact BioMedica Diagnostics if the control repeatedly fails to fall within the specified range.

TRACEABILITY OF CALIBRATORS AND CONTROLS

Information on traceability of calibrators and controls is available upon request.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision

The intra-assay coefficient of variation was determined to be 4.1%

The inter-assay coefficient of variation was determined to be 4.4%.

REFERENCES

1. Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. L. *Blood* 1996, **87**: 4223-4234.
2. Tsai, H. M. *Blood* 1996, **87**: 4235-4244.
3. Furlan, M., *et al.* *N Engl J Med* 1998, **339**: 1578-1584.
4. Moake, J. L., *et al.* *N. Engl J Med* 1982, **307**: 1432-1435.
5. Zheng X, *et al.* *J Biol Chem* 2001, **276**: 41059-41063.
6. Levy, G. G., Nichols, W. C. and Lian, E. C. *Nature* 2001, **413**: 488-494.
7. Tsai, H. M., Rice, L. and Sarode, R. *Ann Intern Med* 2000, **132**: 794-799.
8. Unpublished data from BioMedica Diagnostics.
9. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama, A. and Miyata, T. *Br. J. Haematol.* 2005, **129**: 93.
10. Zhang, L., Lawson, H. L., Harrish, V. C., Huff, J. D., Knovich, M. A. and Owen, J. *Anal Biochem* 2006, **358**: 298-300.

SpectraMax is a trademark of Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

* United States Patent No. 7,270,976

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Der ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Aktivitätstest ist ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) Test zur Bestimmung von ADAMTS13 in humanem Plasma. Der Test ist für die *in vitro* Diagnostik geeignet.

ERKLÄRUNG DES TESTVERFAHRENS

ADAMTS13, auch als Willebrand Factor (vWF) spaltende Protease bekannt, ist eine Zink Metalloproteinase die ultragroße vWF Multimere (UL-vWF) zwischen den Tyr(1605)-Met(1606) Resten 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 führt zu einer Anhäufung von UL-vWF Multimeren im Plasma.⁴ Diese UL-vWF Multimere binden an Thrombozyten-Rezeptoren und führen zu einer Thrombozytenaggregation und intravaskulären Thrombosen.

Die familiäre TTP ist eine seltene vererbte Krankheit, die auf einer Mutation im ADAMTS13 Gen beruht. Dadurch wird nicht-funktionales ADAMTS13 Protein gebildet.^{5,6} Die erworbene TTP-Form ist eine Autoimmun-Krankheit die durch inhibitorische ADAMTS13 Autoantikörper, die die Enzymaktivität hemmen, hervorgerufen wird.⁷ Die Quantifizierung der ADAMTS13 Aktivität ist hilfreich um TTP Patienten von anderen Thrombozytopenischen Erkrankungen wie das Hämolytisch-Urämische Syndrom (HUS) oder die Idiopathische Thrombozytopenische Purpura (ITP) zu unterscheiden.⁸

Tests zur Messung der ADAMTS13 Aktivität die auf Multimer Analyse, Kollagen Bindung oder vWF ELISAs beruhen sind zeitaufwändig, schwierig durchzuführen und hoch variabel. Ein schneller und einfach durchzuführender FRET Test, der synthetische VWF73 Peptidyl Substrate verwendet, wurde von Kokame, *et al.* beschrieben.⁹ Kürzlich haben Zhang, *et al.* ein neues rekombinantes VWF86 FRET Substrat entwickelt welches auf dem Autoquenching von Fluorescein beruht.¹⁰

TESTPRINZIP

ACTIFLUOR ADAMTS13 ist ein FRET Test, der die Menge an ADAMTS13 Aktivität in humanem Plasma misst. Die ADAMTS13 Protease Aktivität in einer Zitratplasma Probe wird mittels rekombinantem ALEXA488-VWF86 FRET Substrat untersucht. Die proteolytische Spaltung des ALEXA488-VWF86 FRET Substrats zwischen den Tyr/Met Resten durch ADAMTS13, entkoppelt die ALEXA Fluorochrome was zu einem Anstieg der Fluoreszenz führt. Der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit (V_{max}) während der Spaltung des Substrats durch ADAMTS13 wird bei 37°C unter Verwendung eines

Spektrfluorometers (Ex=485 nm; Em=535 nm) gemessen. Eine Standardkurve wird mit Normalplasma und einer bekannten ADAMTS13 Konzentration erstellt. Die ADAMTS13 Aktivität im Plasma wird durch Interpolation des V_{max} Wertes aus der Standardkurve bestimmt.

REAGENZIEN – Ausreichend für 16 Proben in Doppelbestimmung

- R1 Fluoreszenz Mikrotiter Streifen** (6x8) mit Rahmen, 48 Vertiefungen (weiss)
- R2 ADAMTS13 Standard**, 250 µL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R3 ADAMTS13 Positivkontrolle**, 150 µL (lyophilisiert), 1 Fläschchen
- R4 DMSO**, 0.5 mL, 1 Fläschchen
- R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrat**, 300 µL (lyophilisiert), 1 Fläschchen
- R6 Assaypuffer**, 10 mL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)
- R7 ADAMTS13 inaktiviertes Plasma**, 0.5 mL, 3 Fläschchen (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.

FRET substrate	Achtung		H315, H319, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313		
Assay Buffer	Gefahr		<table border="1"><tr><td>CONT</td><td>4-Morpholinopropansulphonic acid, NaN₃</td></tr></table> H302, H311, H315, H319, H335, H411, P261, P264, P270, P273, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313	CONT	4-Morpholinopropansulphonic acid, NaN ₃
CONT	4-Morpholinopropansulphonic acid, NaN ₃				

- Gefahren Aussagen:**
- H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 - H311 Giftig bei Hautkontakt.
 - H315 Verursacht Hautreizungen.
 - H319 Verursacht schwere Augenreizung.
 - H335 Kann die Atemwege reizen.
 - H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
- Sicherheitshinweise:**
- P261 Einatmen von Staub vermeiden.
 - P264 Nach Gebrauch gründlich waschen.
 - P270 Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
 - P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

- Sicherheitshinweise:**
- 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.
 - P332 + P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
 - P337 + P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

REKONSTITUTION DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

R2 ADAMTS13 Standard

250 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen dann vorsichtig mischen. Die chargenspezifische Standardkonzentration „C“ ist auf dem Etikett des Fläschchens angegeben. Der rekonstituierte Standard kann bei Raumtemperatur bis zur Benutzung aufbewahrt werden. Der rekonstituierte Standard sollte bei 2-8°C gelagert werden, wenn er nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird. Der Standard ist 4 Stunden bei 2-8°C und bis 12 Wochen bei -70°C oder kälter stabil. Vermeiden Sie mehrfaches Einfrieren und Auftauen

R3 Positivkontrolle

150 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen, dann vorsichtig mischen. Die Kontrolle bei 2-8°C lagern, wenn sie nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird. Die Positivkontrolle ist 4 Stunden bei Lagerung bei 2-8°C und 12 Wochen bei Lagerung bei -70°C oder kälter stabil. Vermeiden Sie mehrfaches Einfrieren und Auftauen.

R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrate

DMSO (R4) 1:4 mit gefiltertem deionisiertem Wasser verdünnen, um eine 25% DMSO Lösung herzustellen. 300 µL der 25% DMSO Lösung in das Fläschchen geben. Nicht vortexen! und 15 min stehen lassen und dann vorsichtig mischen. BEACHT: Vor Licht schützen. Das ALEXA488-VWF86 FRET Substrat kann bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch gelagert werden. Das Substrat ist bei Lagerung im Dunkeln 2 Wochen bei 2-8°C und 12 Monate bei -20°C oder kälter stabil.

R6 Assaypuffer

10 mL destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. 15 min stehen lassen und dann kurz vortexen. Ein Fläschchen enthält genügend Testpuffer um 24 Tests durchzuführen. Bei Lagerung bei Raumtemperatur (18-25°C) ist der Assaypuffer 1 Tag und bei Lagerung bei -20°C für 12 Wochen stabil.

R7 ADAMTS13 Inaktiviertes Plasma

500 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. 15 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen, dann vorsichtig mischen.. Das inaktivierte Plasma kann bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert werden. Wenn es nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird, dann bei 2-8°C lagern. ADAMTS13 inaktiviertes Plasma ist bei Lagerung bei 2-8°C 4 Stunden und bei -70°C oder kälter 12 Wochen stabil.. Mehrfaches Einfrieren und Auftauen vermeiden.

PROBENABNAHME UND VORBEREITUNG

Nur Thrombozyten armes Zitratplasma sollte für den Test verwendet werden. Kein EDTA verwenden. Siehe "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", CLSI Document H21-A5, Vol. 28, No. 5, January 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 1,500 x g für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Das Plasma sollte bei 2-8°C gelagert werden und innerhalb von 4 Stunden bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei -70°C bis zu 6 Monate gelagert werden.
4. Gefrorenes Plasma sollte zügig bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma sollte bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von 2 Stunden bestimmt werden.

TESTDURCHFÜHRUNG

Kitkomponenten – Siehe Reagenzien

Notwendige Materialien, die nicht mitgeliefert werden

0.22 µm gefiltertes deionisiertes oder destilliertes wasser
 8 - Kanalphette für Volumenbereich von 50-200 µL
 1 - Kanalphette für Volumenbereich von 10-200 µL
 Mikrozentrifugen Röhrchen, 1.5 mL
 Mikrotiterplatten Fluorometer

Vorbereitung der Standards und Reagenzien

A. Vorbereitung der ADAMTS13 Standards

Sieben (7) ADAMTS13 Standards vorbereiten, um die Standardkurve zu erstellen. Dazu serielle Verdünnungen des ADAMTS13 Standards in Mikroröhrchen wie unten beschrieben herstellen:

Röhrchen	Standard Konzentration	Volumen von	Hinzugeben zu
1	"C" ng/mL	120 µL des Standards	0 µL
2	C/2 ng/mL	60 µL aus Röhrchen 1	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma
3	C/4 ng/mL	60 µL aus Röhrchen 2	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma
4	C/8 ng/mL	60 µL aus Röhrchen 3	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma
5	C/16 ng/mL	60 µL aus Röhrchen 4	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma
6	C/32 ng/mL	60 µL aus Röhrchen 5	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma
7	0 ng/mL	0 µL	60 µL ADAMTS13 inaktiviertem Plasma

B. Vorbereitung der Plasmaproben und Positivkontrolle

Vor der Testdurchführung werden die Plasmaproben und die Positivkontrolle 1:2 mit ADAMTS13 inaktiviertem Plasma verdünnt. 50 µL Zitratplasma oder Positivkontrolle zu 50 µL ADAMTS13 Inaktiviertem Plasma geben und vorsichtig mischen. Bis zur Testung bei Raumtemperatur halten.

C. Vorbereitung des ALEXA488-VWF86 FRET Substrats

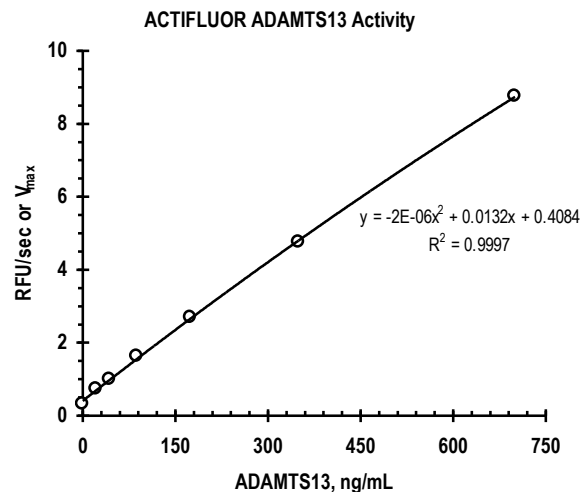
Assaypuffer auf 37°C vorwärmen bevor der Test durchgeführt wird. Bei Schritt 5 (s.u.) wird rekonstituiertes FRET Substrat 1:25 mit dem vorgewärmten Assaypuffer verdünnt (z.B. 0.2 mL des Substrats zu 4.8 mL Assaypuffer geben).

Testdurchführung (Kinetische Methode)

1. Je 80 µL Assaybuffer in die Vertiefungen geben.
2. Je 20 µL der ADAMTS13 Standards aus A in die Vertiefungen A1-A2 bis G1-G2 geben. Je 20 µL der 1:2 verdünnten Positivkontrolle aus Schritt B in die Vertiefungen H1-H2 geben.
3. Je 20 µL der 1:2 verdünnten Plasmen aus B in jeweils 2 Microwells pipettieren (Doppelbestimmungen).
4. Die Microtiter Platte in einen Fluoreszenz Plattenleser einsetzen. Folgende Einstellungen: Ex=485 nm; Em=535 nm, mit einem Cut-Off bei 530 nm; Temperatur 37°C. Anwender die Filter benutzen, bitte FITC Filter Kombinationsset verwenden. Standards und Proben 3 minuten bei 37°C inkubieren.
5. Rekonstituiertes ALEXA488-VWF86 Substrat 1:25 mit dem vorgewärmten Assaypuffer (aus Schritt C) verdünnen (z.B. 0.2 mL Substrat zu 4.8 mL Assaypuffer geben).
6. Je 100 µL des 1:25 verdünnten ALEXA488-VWF86 FRET Substrate in jedes Microwell pipettieren. Vor der Messung die Platte kurz schütteln
7. Den Anstieg der Fluoreszenz 20 min lang, in 20 sec Intervallen bestimmen. Die Rate der Fluoreszenzänderung bestimmen, RFU/sec oder V_{max} .

ERGEBNISSE

Es wird eine Standardkurve erstellt indem der RFU/sec oder V_{max} für jeden Standard gegen die entsprechende ADAMTS13 Konzentration in ng/mL aufgetragen wird. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Eine repräsentative Standardkurve unter Verwendung des SpectraMax® Spectrofluorometer (Molecular Devices, CA) ist unten dargestellt



BERECHNUNG (Kinetische Methode)

Die ADAMTS13 Konzentration in der zu bestimmenden Probe ist direkt aus der Standardkurve über den RFU/sec oder V_{max} der Probe zu interpolieren. Diese Konzentration mit 2 multiplizieren um die ADAMTS13 Konzentration in der unverdünnten Probe oder der Positivkontrolle zu erhalten. Falls der RFU/sec oder V_{max} der Probe oberhalb des Messbereichs der Standardkurve liegt, ist das Plasma weiter mit ADAMTS13 Inaktiviertem Plasma zu verdünnen und der Test zu wiederholen.

Alternative Testdurchführung (Endpunkt Methode)

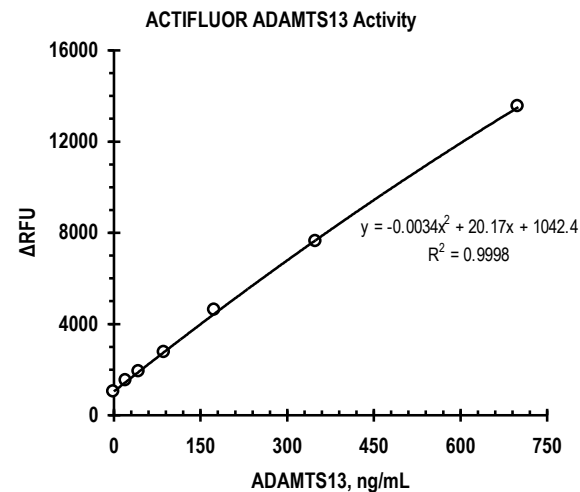
Wenn der Fluoreszenz-Reader nicht für kinetische Messungen geeignet ist, dann kann die Endpunkt Methode verwendet werden.

1. Je 80 μ L Assaybuffer in die Vertiefungen geben.
2. Je 20 μ L der ADAMTS13 Standards aus A in die Vertiefungen A1-A2 bis G1-G2 geben. Je 20 μ L der 1:2 verdünnten Positivkontrolle (aus Schritt B) in die Vertiefungen H1-H2 geben.
3. Je 20 μ L der 1:2 verdünnten Plasmen aus B in jeweils 2 Microwells pipettieren (Doppelbestimmungen).

4. Die Microtiter Platte in einen Fluoreszenz Plattenleser einsetzen. Folgende Einstellungen: Ex=485 nm; Em=535 nm, mit einem Cut-Off bei 530 nm; Temperatur 37°C. Anwender die Filter benutzen, bitte FITC Filter Kombinationsset verwenden. Standards und Proben 3 Minuten bei 37°C inkubieren.
5. Rekonstituiertes ALEXA488-VWF86 Substrat 1:25 mit dem vorgewärmten Assaypuffer (aus Schritt C) verdünnen (z.B. 0.2 mL Substrat zu 4.8 mL Assaypuffer geben).
6. Je 100 μ L des 1:25 verdünnten ALEXA488-VWF86 FRET Substrat (aus Schritt C) in jede Vertiefung pipettieren. Vor der Messung die Platte kurz schütteln.
7. Sofort die Fluoreszenz beim Start der Reaktion ablesen ($T=0$).
8. Die Platte 20 Minuten bei 37°C inkubieren, schütteln und nochmal die Fluoreszenz messen ($T=20$ min). Berechnen Sie delta RFU ($\Delta RFU = RFU_{T=20min} - RFU_{T=0}$).

ERGEBNISSE

Es wird eine Standardkurve erstellt indem der delta RFU Wert für jeden Standard gegen die entsprechende ADAMTS13 Konzentration in ng/mL aufgetragen wird. Bei jeder Testdurchführung ist eine Standardkurve zu erstellen. Eine repräsentative Standardkurve unter Verwendung des SpectraMax® Spectrofluorometer (Molecular Devices, CA) ist unten dargestellt.



BERECHNUNG (Endpunkt Methode)

Die ADAMTS13 Konzentration in der zu bestimmenden Probe ist direkt aus der Standardkurve über delta RFU der Probe oder Positivkontrolle abzulesen. Die ermittelte Konzentration muß mit 2 multipliziert werden, um die ADAMTS13 Konzentration in der unverdünnten Probe oder Positivkontrolle zu erhalten. Falls der delta RFU der Probe oberhalb des Messbereichs der Standardkurve liegt, ist das Plasma weiter mit ADAMTS13 Inaktiviertem Plasma zu verdünnen und der Test zu wiederholen.

ERWARTETE WERTE

In einer Studie mit Normalpatienten (n=234), wurde der mittlere ADAMTS13 Aktivitätswert bei 666 ± 135 ng/mL gefunden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Die Positivkontrolle muss immer mitgeführt werden, wenn der Test durchgeführt wird. Wenn die Positivkontrolle nicht in den Zielbereich fällt, wie auf dem Etikett angegeben, dann muss der Test wiederholt werden. Kontaktieren Sie BioMedica Diagnostics, wenn die Positivkontrolle wiederholt nicht im Zielbereich liegt.

RÜCKFÜHRBARKEIT DES KALIBRATOR- UND KONTROLLMATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit sind bei BioMedica Diagnostics auf Anfrage erhältlich.

LEISTUNGSMERKMAL**Präzision**

Der Intra-Assay Variationskoeffizient wurde mit 4.1% bestimmt.

Der Inter-Assay Variationskoeffizient wurde mit 4.4% bestimmt.

LITERATURSTELLEN

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.
9. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama, A. and Miyata, T. *Br. J. Haematol.* 2005, **129**: 93.
10. Zhang, L., Lawson, H. L., Harrish, V. C., Huff, J. D., Knovich, M. A. and Owen, J. *Anal Biochem* 2006;**358**:298-300.

SpectraMax ist ein geschützter Markenname von Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA.

ESPAÑOL**USO PREVISTO**

El ensayo de Actividad ACTIFLUOR™ ADAMTS13 es un ensayo de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) para medir la ADAMTS13 en el plasma humano. El ensayo es para uso en diagnóstico *in vitro*.

EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

ADAMTS13, también conocida como proteasa de escisión del factor de von Willebrand (vWF), es una metaloproteasa de cinc que escinde multímeros de vWF muy grandes (UL-vWF) en la unión Tyr(1605)-Met(1606) situada en la región A2 del vWF.¹ Varios estudios han demostrado que se asocian bajos niveles de actividad de la ADAMTS13 con la púrpura trombocitopénica trombótica (PTT), una enfermedad hematológica potencialmente mortal caracterizada por un recuento bajo de plaquetas, trombos microvasculares, fragmentación de glóbulos rojos y complicaciones renales y del SNC.^{2,3} Un nivel de actividad de la ADAMTS13 por debajo del 5 % de lo normal produce una acumulación de multímeros del UL-vWF en el plasma.⁴ Los multímeros del UL-vWF se unen a receptores en las plaquetas e inducen la agregación de plaquetas y la formación de microtrombos intravasculares.

La PTT congénita es un trastorno raro y hereditario causado por mutaciones en el gen de la ADAMTS13 que conlleva la producción de proteína de ADAMTS13 disfuncional.^{5,6} La forma adquirida de la PTT es un trastorno tipo autoinmune causado por el desarrollo de autoanticuerpos para la ADAMTS13 que inhiben la actividad de las enzimas.⁷ Medir el nivel de actividad de la ADAMTS13 ha resultado útil para identificar a pacientes con PTT de otras afecciones trombocitopénicas, como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y la púrpura trombocitopénica idiopática (TCI).⁸

Los ensayos en curso para medir la actividad de la ADAMTS13, que incluye análisis de multímeros, unión de colágeno y ELISA de vWF, pueden ser largos, difíciles de realizar y muy variables. Kokame y otros describieron un ensayo FRET rápido y fácil de realizar mediante un sustrato de peptidil VWF73 sintético.⁹ Recientemente, Zhang y otros desarrollaron un nuevo sustrato FRET VWF86 recombinante basado en la autoextinción de la fluoresceína.¹⁰

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ACTIFLUOR ADAMTS13 es un ensayo FRET que mide la cantidad de actividad de la ADAMTS13 en el plasma humano. Se prueba la actividad de la proteasa ADAMTS13 en una muestra de plasma citratado utilizando el sustrato FRET VWF86-ALEXA recombinante. La escisión proteolítica del sustrato FRET VWF86-ALEXA entre los residuos tyr/met mediante ADAMTS13 desliga los fluorocromos ALEXA, lo que aumenta la fluorescencia. El aumento de la fluorescencia con el tiempo ($V_{\text{máx}}$) debido a la escisión del sustrato mediante ADAMTS13 se controla a 37 °C utilizando un espectrofluorómetro (Ex=485 nm; Em=535 nm). Se construye una curva estándar utilizando plasma normal con una concentración conocida de ADAMTS13. La actividad de ADAMTS13 en el plasma se determina interpolando los valores $V_{\text{máx}}$ de la curva estándar.

REACTIVOS – Suficiente para realizar ensayos de 16 muestras por duplicado

- R1 Micropocillos fluorescentes**, 48 (blancos)
- R2 Estándar ADAMTS13**, 250 µl, 2 frascos (lío filizados)
- R3 Control positivo de ADAMTS13**, 150 µl (lío filizado)
- R4 DMSO**, 0,5 ml
- R5 Sustrato FRET ALEXA488-VWF86**, 300 µl (lío filizado)
- R6 Amortiguador de ensayo**, 10 ml, 2 frascos (lío filizados)
- R7 Plasma inactivado de ADAMTS13**, 0,5 ml, 3 frascos (lío filizados)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Este producto contiene material de origen humano y se ha comprobado que no es un reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), virus de la hepatitis C (VHC) y los virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 (VIH-1, VIH-2) usando métodos registrados. Como ningún método de prueba puede ofrecer completa seguridad de que los productos derivados de especímenes humanos no transmitan HBsAg, VHC, VIH-1, VIH-2 u otros patógenos transmitidos por la sangre, este reactivo se debe manipular de la forma recomendada para cualquier espécimen humano potencialmente infeccioso.

No utilice componentes del equipo que estén caducados. No mezcle reactivos de equipos distintos. Evite la contaminación microbiana de los componentes del equipo. No use la pipeta por la boca.

Sustrato FRET	Atención		H315, H319, P264, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313	
Amortiguador de ensayo	Peligro	 	CONT	ácido 4-morfolinopropan sulfónico, azida de sodio
			H302, H311, H315, H319, H335, H411, P261, P264, P270, P273, P280, P302 + P352, P305 + P351 + P338, P332 + P313, P337 + P313	

- Indicaciones de peligro:**
- H302 Nocivo en caso de ingestión.
 - H311 Tóxico en contacto con la piel.
 - H315 Provoca irritación cutánea.
 - H319 Provoca irritación ocular grave.
 - H335 Puede irritar las vías respiratorias.
 - H411 Tóxico para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
- Consejos de prudencia:**
- P261 Evitar respirar el polvo.
 - P264 Lavarse concienzudamente tras la manipulación.
 - P270 No comer, beber ni fumar durante su utilización.
 - P273 Evitar su liberación al medio ambiente.
 - P280 Llevar protección ocular/ facial.
 - P302 + P352 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con cuidado y con jabón y agua 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.
- P332 + P313 En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
- P337 + P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL REACTIVO

R2 Estándar ADAMTS13

Reconstituya un frasco con 250 µl de agua destilada o desionizada filtrada. Déjelo reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) antes de mezclarlo suavemente. Observe en la etiqueta del frasco la concentración estándar "C" específica del lote. El estándar ADAMTS13 puede mantenerse a temperatura ambiente hasta utilizarla. Guarde el estándar reconstituido a 2 °C-8 °C si no se utiliza en menos de 2 horas. El estándar se mantiene estable hasta 4 horas cuando está a 2 °C-8 °C y hasta 12 semanas cuando se guarda a -70 °C o más frío. Evitar congelar y descongelar varias veces.

R3 Control positivo

Reconstituya con 150 µl de agua destilada o desionizada filtrada. Déjelo reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) antes de mezclarlo suavemente. El control positivo puede mantenerse a temperatura ambiente hasta utilizarlo. Guarde el control reconstituido a 2 °C-8 °C si no se utiliza en menos de 2 horas. El control positivo se mantiene estable hasta 4 horas cuando está a 2 °C-8 °C y hasta 12 semanas cuando se guarda a -70 °C o más frío. Evitar congelar y descongelar varias veces.

R5 Sustrato FRET ALEXA488-VWF86

Prepare una solución de DMSO al 25% diluyendo el reactivo DMSO 1:4 con agua desionizada filtrada. Reconstituya el sustrato con 300 µl de la solución DMSO al 25%. Déjelo reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) antes de mezclarlo suavemente. ¡NO MEZCLAR EN VÓRTEX! NOTA: protéjalo de la luz. El sustrato puede mantenerse a temperatura ambiente hasta utilizarlo. El sustrato FRET ALEXA488-VWF86 se mantiene estable hasta 2 semanas cuando se protege de la luz y se guarda a 2 °C-8 °C y hasta 12 meses cuando se guarda a -20 °C o más frío. Evitar congelar y descongelar varias veces.

R6 Amortiguador de ensayo

Reconstituya un frasco de amortiguador de ensayo con 10 ml de agua destilada o desionizada filtrada. Déjelo reposar durante 15 minutos antes de mezclarlo en vórtex brevemente. Un frasco contiene suficiente amortiguador de ensayo para realizar 24 ensayos. El amortiguador de ensayo se mantiene estable hasta 1 día a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) y hasta 12 semanas cuando se guarda a -20 °C.

R7 Plasma inactivado de ADAMTS13

Reconstituya un frasco de plasma inactivado de ADAMTS13 con 500 µl de agua destilada o desionizada filtrada. Déjelo reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C-25 °C) antes de mezclarlo suavemente. El plasma inactivado de ADAMTS13 puede mantenerse a temperatura ambiente hasta utilizarlo. Guarde el plasma reconstituido a 2 °C-8 °C si no se utiliza en menos de 2 horas. El plasma inactivado de ADAMTS13 se mantiene estable hasta 4 horas cuando está a 2 °C-8 °C y hasta 12 semanas cuando se guarda a -70 °C o más frío. Evitar congelar y descongelar varias veces.

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Solo puede utilizarse para este ensayo con plasma pobre en plaquetas recogido en citrato. No use EDTA. Consulte "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guidelines-Fifth Edition", documento del CLSI H21-A5, Vol. 28, N° 5, enero de 2008. Debe recogerse el plasma de este modo:

1. Recoja 9 partes de sangre en 1 parte de 3,2 % (0,109 M) de solución anticoagulante de citrato de trisodio.
2. Centrifugue la muestra de sangre a 1.500 x g durante 15 minutos.
3. El plasma debe guardarse a temperatura ambiente y analizarse en menos de 2 horas. También puede guardar el plasma a -70 °C hasta 6 meses.
4. Debe descongelar rápidamente el plasma congelado a 37 °C. El plasma descongelado debe guardarse a temperatura ambiente y analizarse en menos de 2 horas.

PROCEDIMIENTO

Materiales proporcionados – Ver Reactivos

Materiales necesarios pero no suministrados

agua destilada o desionizada filtrada
pipeta de 8 canales que abarque 50-200 µl
pipeta de 1 canal que abarque 10-200 µl
tubos de microcentrifugadora, 1,5 ml
fluorómetro para placa de micropocillo

Preparación de estándares y reactivos

A. Preparación de estándares ADAMTS13

Prepare siete (7) estándares ADAMTS13 para generar la curva estándar realizando diluciones en serie del estándar ADAMTS13 en tubos de microfuga, del siguiente modo:

Tubo	Estándar Concentración	Volumen de	Añadido a
1	"C" ng/ml	120 µl de estándar	0 µl
2	C/2 ng/ml	60 µl del tubo 1	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13
3	C/4 ng/ml	60 µl del tubo 2	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13
4	C/8 ng/ml	60 µl del tubo 3	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13
5	C/16 ng/ml	60 µl del tubo 4	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13
6	C/32 ng/ml	60 µl del tubo 5	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13
7	0 ng/ml	0 µl	60 µl de plasma inactivado de ADAMTS13

B. Preparación de muestras de plasma y control positivo

La muestra de plasma y el control positivo se diluyen cada uno a 1:2 con plasma inactivado de ADAMTS13 añadiendo 50 µl de plasma citrato o control positivo para 50 µl de plasma inactivado y mezclándolo suavemente. Manténgalo a temperatura ambiente.

C. Preparación de sustrato FRET ALEXA488-VWF86

Precalentar el amortiguador de ensayo a 37 °C. Justo antes de utilizar en el paso 5 inferior, diluya el sustrato FRET ALEXA488-VWF86 reconstituido a 1:25 con amortiguador de ensayo (p. ej. añada 0,2 ml de sustrato a 4,8 ml de amortiguador de ensayo). Nota: El ensayo requiere 1,6 ml de sustrato preparado para cada 16 micropocillos utilizados.

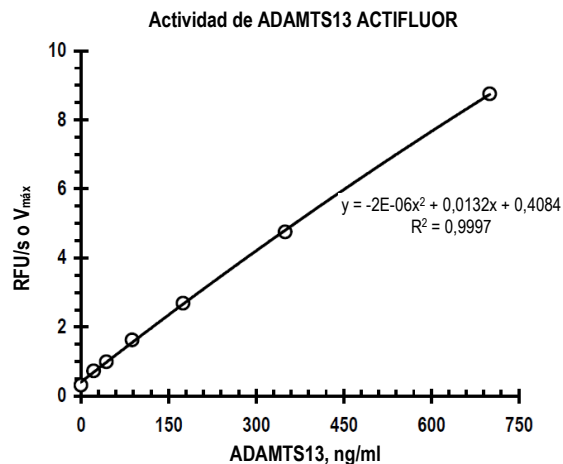
Procedimiento del ensayo (método cinético)

1. Añada 80 µl de amortiguador de ensayo a cada micropocillo que se utilizará.
2. Añada 20 µl de cada estándar ADAMTS13 del paso A a los pocillos A1-A2 mediante G1-G2 respectivamente. Añada 20 µl de control positivo diluido 1:2 del paso B a los pocillos H1-H2.
3. Añada 20 µl de muestras de plasma diluidas a 1:2 del paso B a cada uno de los dos micropocillos.
4. Coloque la placa de micropocillo en un lector de placas de fluorescencia configurado en Ex=485 nm y Em=535 nm, con un valor de corte de 530 nm, y la temperatura configurada a 37 °C. Use un ajuste bajo para el tubo fotomultiplicador. Para lectores que utilizan filtros, use un conjunto de combinación de filtros FITC. Deje que los estándares y muestras se calienten durante 3 minutos.
5. Añada 100 µl de sustrato FRET ALEXA488-VWF86 diluido a 1:25 del paso C a cada micropocillo.

6. Mida el aumento de fluorescencia durante 20 minutos, recopilando datos a intervalos de 20 segundos. Calcule la velocidad de cambio en la fluorescencia, RFU/s o $V_{\text{máx}}$.

RESULTADOS

Se crea una curva estándar con puntos de RFU/s o $V_{\text{máx}}$ para cada estándar frente a la concentración correspondiente de ADAMTS13 en ng/ml. Debe generarse una curva estándar cada vez que se realiza el ensayo. A continuación se muestra una curva estándar representativa utilizando un espectrofluorómetro SpectraMax® (Molecular Devices, CA).



CÁLCULO (método cinético)

Interpole la concentración de ADAMTS13 en la muestra diluida y el control positivo directamente desde la curva estándar mediante el RFU/s o $V_{\text{máx}}$ de la muestra. Multiplique esta concentración por 2 para obtener la concentración de ADAMTS13 en la muestra limpia y en el control positivo. Si el RFU/s o $V_{\text{máx}}$ de la muestra supera el intervalo de la curva estándar, diluya más el plasma con plasma inactivado de ADAMTS13 y repita el ensayo.

Procedimiento del ensayo alternativo (método de criterio de valoración)

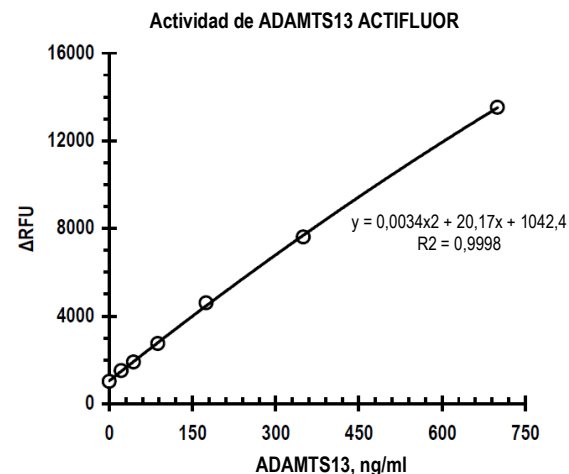
Si el lector de placas de fluorescencia no es adecuado para medir en el modo cinético, puede utilizarse el método de criterio de valoración.

1. Añada 80 μ l de amortiguador de ensayo a cada micropocillo que se utilizará.
2. Añada 20 μ l de cada estándar ADAMTS13 del paso A a los pocillos A1-A2 mediante G1-G2 respectivamente. Añada 20 μ l de control positivo diluido 1:2 del paso B a los pocillos H1-H2.
3. Añada 20 μ l de muestras de plasma diluidas a 1:2 del paso B a cada uno de los dos micropocillos.

4. Coloque la placa de micropocillo en un lector de placas de fluorescencia configurado en $\text{Ex}=485 \text{ nm}$ y $\text{Em}=535 \text{ nm}$, con un valor de corte de 530 nm, y la temperatura configurada a 37 °C. Use un ajuste bajo para el tubo fotomultiplicador. Para lectores que utilizan filtros, use un conjunto de combinación de filtros FITC. Deje que los estándares y muestras se calienten durante 3 minutos.
5. Añada 100 μ l de sustrato FRET ALEXA488-VWF86 diluido a 1:25 del paso C a cada micropocillo.
6. Lea de inmediato la fluorescencia en los micropocillos ($T=0$).
7. Incube los micropocillos durante 20 minutos a 37 °C. Lea la fluorescencia de nuevo ($T=20$). Calcule el cambio neto en la fluorescencia, ΔRFU ($\text{RFU}_{T=20} - \text{RFU}_{T=0}$).

RESULTADOS

Se crea una curva estándar con puntos de ΔRFU para cada estándar frente a la concentración correspondiente de ADAMTS13 en ng/ml. Debe generarse una curva estándar cada vez que se realiza el ensayo. A continuación se muestra una curva estándar representativa utilizando un espectrofluorómetro SpectraMax® (Molecular Devices, CA).



CÁLCULO (método de criterio de valoración)

Interpole la concentración de ADAMTS13 en la muestra diluida y el control positivo directamente desde la curva estándar mediante el ΔRFU . Multiplique esta concentración por 2 para obtener la concentración de ADAMTS13 en la muestra limpia y en el control positivo. Si el ΔRFU de la muestra supera el intervalo de la curva estándar, diluya más el plasma con plasma inactivado de ADAMTS13 y repita el ensayo.

VALORES ESPERADOS

En un estudio de personas normales (n=234), el nivel medio de actividad (± 1 SD) ADAMTS13 resultó ser 666 ± 135 ng/ml.

CONTROL DE CALIDAD

Debe incluirse el control positivo siempre que se realice el ensayo. Si el control positivo no se encuentra en el intervalo especificado, debe repetirse la prueba. Póngase en contacto con BioMedica Diagnostics si el control no se encuentra en el intervalo especificado una y otra vez.

RASTREABILIDAD DE LOS CALIBRADORES Y CONTROLES

Puede solicitar información sobre rastreabilidad de los calibradores y controles.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Precisión

Se determinó que el coeficiente de variación entre ensayos es del 4,1 %

Se determinó que el coeficiente de variación intranalítica es del 4,4 %

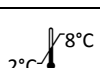
BIBLIOGRAFÍA

1. Furlan, M., Robles, R. and Lämmle, B. L. *Blood* 1996, **87**: 4223-4234.
2. Tsai, H. M. *Blood* 1996, **87**: 4235-4244.
3. Furlan, M., *et al.* *N Engl J Med* 1998, **339**: 1578-1584.
4. Moake, J. L., *et al.* *N. Engl J Med* 1982, **307**: 1432-1435.
5. Zheng X, *et al.* *J Biol Chem* 2001, **276**: 41059-41063.
6. Levy, G. G., Nichols, W. C. and Lian, E. C. *Nature* 2001, **413**: 488-494.
7. Tsai, H. M., Rice, L. and Sarode, R. *Ann Intern Med* 2000, **132**: 794-799.
8. Unpublished data from BioMedica Diagnostics.
9. Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, Okayama, A. and Miyata, T. *Br. J. Haematol.* 2005, **129**: 93.
10. Zhang, L., Lawson, H. L., Harrish, V. C., Huff, J. D., Knovich, M. A. and Owen, J. *Anal Biochem* 2006, **358**: 298-300.

SpectraMax es una marca comercial de Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.

* N° de patente de Estados Unidos 7,270,976

DEFINITION OF SYMBOLS // BEDEUTUNG DER SYMBOLE // DEFINICIÓN DE SÍMBOLOS

	Consult instructions for use	Gebrauchsanleitung beachten	Consulte las instrucciones de uso
	Refer to SDS	SDS konsultieren	Atención, ver SDS
	In vitro diagnostic medical device	Medizinisches Produkt zur in vitro-Diagnostik	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Manufactured by	Hergestellt durch	Fabricante
	Store at 2°C to 8°C	Bei 2°C bis 8°C lagern	Almacenar de 2 °C a 8 °C
	Batch code / Lot number	Charge	Código de lote
	Expiration Date	Verfallsdatum	Fecha de caducidad
	Catalog number	Katalog-Nr	Número de catálogo
	CE Mark	CE-Siegel	Marca CE
	European Authorised Representative	Autorisierte Vertretung für Europa	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Contains sufficient for <n> tests	Inhalt ausreichend für <n> Tests	Contenido suficiente para <n> ensayos
	contains	enthält	contenido