

5-ELISA ADAMTS-13 Antigen

Art.Nr. 5D-55501

ELISA zur Bestimmung von ADAMTS-13 96 Tests

Nur für Forschungszwecke.

Nicht zur Verwendung in diagnostischen Verfahren.

Verwendungszweck:

Der 5-ELISA ADAMTS-13 Antigen Kit ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung von ADAMTS-13 Antigen in Plasma oder anderen biologischen Flüssigkeiten.

Zusammenfassung und Testprinzip:

Dieser Sandwich-ELISA basiert auf der Beschichtung der Mikrotiterplatte mit einem polyklonalen Antikörper zur Bindung von ADAMTS-13. Nach einem Waschschrift wird der gebundene ADAMTS-13 mit einem Peroxidase-konjugierten polyklonalen Antikörper markiert. Nach einem weiteren Waschschrift, in dem das überschüssige Immunkonjugat entfernt wird, wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂), zugefügt und es entwickelt sich eine gelbe Farbe, die beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach blau umschlägt. Die bei 450 nm gemessene Farbentwicklung ist direkt proportional zur ADAMTS-13-Konzentration der Probe. Die Ergebnisse werden, unter Bezugnahme auf den internationalen Standard für ADAMTS-13 in Plasma, in Internationalen Einheiten (IE) pro mL angegeben (1).

ADAMTS-13 ist eine Metalloprotease, die im Plasma in einer Konzentration zwischen 500 und 800 ng/mL vorliegt. Es spaltet nach seiner Freisetzung in den Blutkreislauf aus Endothelzellen (durch Weibel-Palade-Körperchen) große von Willebrand Faktor-Polymere in Polymere mit geringerem Molekulargewicht (2).

Reagenzien:

- COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit einem stabilisierten polyklonalen Anti-Human-ADAMTS-13-Antikörper. Die Platte ist mit einem Trockenmittel luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
- SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL Probenverdünner, gebrauchsfertig.
- WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter Waschlösung.
- CAL:** 2 Flaschen lyophilisiertes Kalibrationsplasma, bei Rekonstitution mit 2 mL Probenverdünner bereits **1:20 verdünnt**.*
- C1 (High):** 2 Flaschen lyophilisiertes Kontrollplasma, bei Rekonstitution mit 1 mL Probenverdünner bereits **1:20 verdünnt**.*
- C2 (Low):** 2 Flaschen lyophilisiertes Kontrollplasma, bei Rekonstitution mit 1 mL Probenverdünner bereits **1:20 verdünnt**.*
- IC:** 1 Flasche mit 500 µL Anti-(h)-ADAMTS-13-HRP Konjugat, 50-fach konzentriert.
- ICD:** 1 Flasche mit 25 mL Konjugatverdünner, gebrauchsfertig.
- TMB:** 1 Flasche mit 25 mL Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin mit Wasserstoffperoxid. Gebrauchsfertig.
- SA:** 1 Flasche mit 7,5 mL Stopplösung (0,50M Schwefelsäure).

* Die exakten chargenspezifischen ADAMTS-13 Konzentrationen sind dem Datenblatt zu entnehmen, welches der Packung beiliegt.

Warnhinweise:

- Einige der mit diesem Kit gelieferten Reagenzien enthalten humanen (Kontroll- und Kalibrationsplasma) und tierischen Ursprungs. Jedes zur Herstellung der Reagenzien verwendete Humanplasma wurde mit anerkannten Methoden getestet und negativ für Hepatitis B-Oberflächenantigen, Hepatitis C-Antikörper (HCV) und Antikörper gegen HIV 1 und 2 eingestuft. Das zur Herstellung des bovinen Serumalbumins eingesetzte bovine Blut wurde mit anerkannten Methoden auf Infektionserreger, insbesondere auf spongiforme Rinderenzephalopathie (BSE), getestet. Keine Testmethode kann jedoch die Anwesenheit infektiöser Stoffe vollständig ausschließen. Die Reagenzien müssen daher durch das Laborpersonal mit größter Sorgfalt unter Beachtung aller für Produkte biologischen Ursprungs erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potenziell infektiös gehandhabt werden.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Richtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.
- Jedes in Zusammenhang mit diesem Testkit stehende Vorkommnis ist dem Hersteller zu melden.
- Weist das TMB-Substrat eine Gelbfärbung auf, ist dies ein Zeichen für Kontamination.

Vorbereitung der Reagenzien:

Den Kit vor Gebrauch für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur bringen, um die Verwendung der Reagenzien bei zu niedriger Temperatur, welche die Kinetik des Tests reduzieren kann, zu vermeiden. Nicht verwendete Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern.

Die Reagenzflaschen sind unter Vakuum verschlossen. Die Verschlüsse der lyophilisierten Reagenzien sind vorsichtig zu entfernen, um einen Verlust an Reagenz beim Öffnen zu vermeiden.

Wird der Inhalt des Kits ordnungsgemäß verwendet und gelagert, dann kann er bei Bedarf über einen Zeitraum von einem Monat und Streifen für Streifen verwendet werden.

- COAT (ELISA-Mikrotiterplatte):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die Testserie erforderliche Anzahl an Streifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Nicht verwendete Streifen können für 4 Wochen bei 2-8°C im Originalbeutel (hermetisch verschlossen und vor Feuchtigkeit geschützt, in Gegenwart des Trockenmittels) gelagert werden.
- SD (Probenverdünner):** Gebrauchsfertig. Dieses Reagenz enthält 0,05% Proclin-300. Stabilität des in der Originalflasche gelagerten Reagenzes unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 4 Wochen bei 2-8°C
- WS (Waschlösung):** Falls notwendig im Wasserbad bei 37°C bis zur vollständigen Auflösung allfälliger Feststoffe inkubieren. Die Flasche durchmischen und die Waschlösung 1:20 mit aqua dest. verdünnen (mit 50 mL lassen sich folglich 1 Liter verdünnte Waschlösung herstellen). Stabilität des in der Originalflasche gelagerten Reagenzes unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 4 Wochen bei 2-8°C
- CAL (Kalibrationsplasma):** Den Inhalt jeder Flasche mit exakt 2 mL **SD** Probenverdünner rekonstituieren, um ein bereits 20-fach verdünntes Kalibrationsplasma mit einer definierten ADAMTS-13-Konzentration zu erhalten. Stabilität des geschlossenen in der Originalflasche gelagerten Kalibrationsplasmas nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)
 - 24 Stunden bei 2-8°C
 - 2 Monate bei ≤ -20°C
- C1, C2 (Kontrollplasma 1 High und Kontrollplasma 2 Low):** Den Inhalt jeder Flasche mit 1 mL **SD** Probenverdünner rekonstituieren, um ein bereits 20-fach verdünntes Kontrollplasma zu erhalten. Stabilität des in der Originalflasche gelagerten Plasmas nach Rekonstitution unter der Voraussetzung, dass dieses nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 8 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
 - 24 Stunden bei 2-8°C.
 - 2 Monate bei ≤ -20°C.
- IC (Anti-(h)-ADAMTS-13-HRP Konjugat):** Stabilität nach Öffnung, in der Originalflasche gelagert, unter der Voraussetzung, dass das Reagenz nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 4 Wochen bei 2-8°C.
 Unmittelbar vor der Verwendung die erforderliche Menge des 50-fach konzentrierten **IC** 50-fach mit **ICD** Konjugatverdünner verdünnen und gut durchmischen. Stabilität des verdünnten Konjugats:
 - 6 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
- ICD (Konjugatverdünner):** Gebrauchsfertig. Enthält 0,05% Proclin-300. Stabilität nach Öffnung, in der Originalflasche gelagert, unter der Voraussetzung, dass das Reagenz nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 4 Wochen bei 2-8°C.
- TMB:** Gebrauchsfertig. Stabilität nach Öffnung, in der Originalflasche gelagert, unter der Voraussetzung, dass das Reagenz nicht kontaminiert wurde und keine Verdunstung erfolgte:
 - 4 Wochen bei 2-8°C.
- SA (Stopplösung):** Enthält 0,50M Schwefelsäure, gebrauchsfertig.

Erforderliche Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:

- 8-Kanal- oder ELISA-Repetierpipette für Volumina von 50-300 µL
- Einkanalpipetten für Volumina in den Bereichen von 0 bis 20, 20 bis 200 und 200 bis 1000 µL
- Mikrotiterplattenreader zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm

Gewinnung und Vorbereitung der Proben:

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig mit 0,109M Citrat, (3,2%) als Antikoagulant (1 Volumenteil) durch Venenpunktion abgenommen. Die Gewinnung, Vorbereitung und Lagerung der Proben (Plasma oder Serum) hat gemäß lokalen Vorschriften zu erfolgen. In Bezug auf die Lagerung der Proben sind die Referenzen zu beachten.

Testdurchführung:

Zwei-Stufen-Protokoll:

Standard-Testprotokoll mit 1:20-Verdünnung. Die ADAMTS-13-Konzentrationen der Proben werden direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Werden andere Probenverdünnungen verwendet, sind die auf der Abszisse aufgetragenen Konzentrationen durch 20 zu dividieren und die gemessene Konzentration mit dem für die Probe angewandten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Testplasmen müssen mindestens 1:5 mit **SD** Probenverdünner verdünnt werden.

- Die Kontrollen sind bereits gebrauchsfertig (1:20 verdünnt).
- Die Testplasmen werden 1:20 (oder, falls notwendig, höher) mit **SD** Probenverdünner verdünnt.
- Das benötigte Immunkonjugat **IC** ist 1:50 mit **ICD** Konjugatverdünner zu verdünnen.

4. Kalibrationsbereich: Der Kalibrator **CAL** mit einer ADAMTS-13-Konzentration "c" ist mit **SD** zu verdünnen, um den folgenden Kalibrationsbereich zu erhalten:

	c	0.75 c	0.50 c	0.25 c	0.10 c	0
CAL µL	500	375	250	125	50	0
SD µL	0	125	250	375	450	500

5. Testansatz (Zwei-Stufen-Methode): Die erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Nach folgendem Schema die Reagenzien in die Vertiefungen zugeben:

Probe oder Reagenz	Volumen	Arbeitsschritt
Kalibratoren, Kontrollen, Probe	200 µL/Vertiefung	In die Vertiefungen pipettieren (a)
60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b) (c)		
WS	300 µL/Vertiefung	5x Waschen
IC	200 µL/Vertiefung	Unmittelbar nach dem Waschen hinzupipettieren (d)
60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b)(c)		
WS	300 µL/Vertiefung	5x Waschen
TMB-H₂O₂	200 µL/Vertiefung	Sofort hinzupipettieren (d)
Exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b) (c)		
SA (e)	50 µL/Vertiefung	Stoppen der Reaktion
Durch vorsichtiges Schwenken homogenisieren und 10 Minuten warten Innerhalb von 20 Minuten die Absorption bei 450 nm ablesen (f)		

Ein-Stufen-Protokoll:

Testprotokoll mit 1:10-Verdünnung. Die ADAMTS-13-Konzentrationen der Proben werden direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Werden andere Probenverdünnungen verwendet, sind die auf der Abszisse aufgetragenen Konzentrationen durch 10 zu dividieren und die gemessene Konzentration mit dem für die Probe angewandten Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Testplasmen müssen mindestens 1:2 mit **SD** Probenverdünner verdünnt werden.

Kalibrator, Kontrollen und Immunkonjugat **IC** müssen 2-fach konzentrierter als beim Zwei-Stufen-Protokoll verwendet werden:

- Kalibrator (**CAL**) mit lediglich 1 mL **SD** rekonstituieren.
- Kontrollen **C1** (High) und **C2** (Low) mit lediglich je 0,5 mL **SD** rekonstituieren. Diese sind dann gebrauchsfertig (bereits 1:10 verdünnt).
- Testplasmen sind 1:10 (oder, falls notwendig, höher) mit **SD** Probenverdünner zu verdünnen.
- Das benötigte Immunkonjugat **IC** ist 1:25 mit **ICD** Konjugatverdünner zu verdünnen.
- Kalibrationsbereich: Der Kalibrator **CAL** mit einer ADAMTS-13-Konzentration "c" ist mit **SD** zu verdünnen, um den folgenden Kalibrationsbereich zu erhalten:

	C	0.75 c	0.50 c	0.25 c	0.10 c	0
CAL µL	300	225	150	75	30	0
SD µL	0	75	150	225	270	300

6. Testansatz (Ein-Stufen-Methode): Die erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Nach folgendem Schema die Reagenzien in die Vertiefungen zugeben:

Probe oder Reagenz	Volumen	Arbeitsschritt
IC	100 µL/Vertiefung	Rasch hinzufügen, unmittelbar gefolgt von:
Kalibratoren, Kontrollen, Probe	100 µL/Vertiefung	In die Vertiefungen pipettieren (a) Zum Mischen vorsichtig schwenken
60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b) (c)		
WS	300 µL/Vertiefung	5x Waschen
TMB-H₂O₂	200 µL/Vertiefung	Sofort hinzupipettieren (d)
Exakt 8 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b) (c)		
SA (e)	50 µL/Vertiefung	Stoppen der Reaktion
Durch vorsichtiges Schwenken homogenisieren und 10 Minuten warten Innerhalb von 20 Minuten die Absorption bei 450 nm ablesen (f)		

Anmerkungen:

a) Kontrollen und Proben müssen so rasch wie möglich pipettiert werden, um eine homogene immunologische Kinetik zu gewährleisten. Etwaige größere Verzögerungen zwischen der Pipettierung in die erste und die letzte Vertiefung können die Kinetik beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen (Unterschätzung der Werte bei den letzten Vertiefungen).

b) Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.

c) Die Inkubationen sollten vorzugsweise bei 20±1°C erfolgen.

d) Im Zuge des Hinzufügens der Reagenzien oder nach jedem einzelnen Waschschrift dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die, an der Platte immobilisierten, Komponenten und damit die Reaktivität der des Tests beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Falls nötig, kann die Platte mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst direkt vor Zugabe des nächsten Reagenzes geleert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und abruptes Entfernen der

Waschlösung vermieden wird, da dieses die Beschichtung beschädigen und damit die Reaktivität der Platte senken könnte.

e) Die Zugabe des Substrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Dies gilt auch für das Stoppen der Reaktion. Beim Einstufen-Protokoll hat die Farbentwicklung eine geringere Kinetik als beim Zwei-Stufen-Protokoll, die Farbentwicklung wird daher auf 8 Minuten verlängert.

f) Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge zwischen 620 und 690 nm verwendet werden.

Qualitätskontrolle:

Die Verwendung von Kontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzcharge die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests. Gemäß guter Laborpraxis ist bei jeder Testserie eine Qualitätskontrolle zu inkludieren, um die generierten Ergebnisse zu überprüfen.

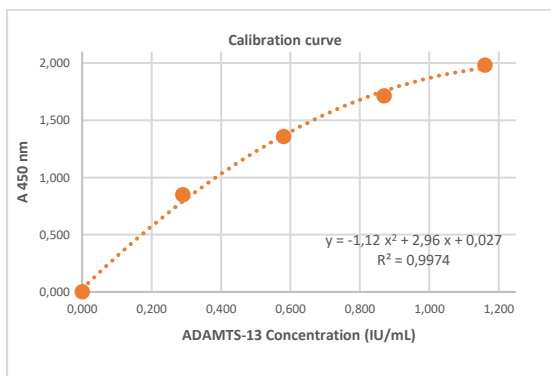
Jedes Labor sollte unter den eigenen Testbedingungen seine Akzeptanzbereiche festlegen und die erwartete Testleistung verifizieren. Im Falle einer Automatisierung des Tests, ist durch den Anwender eine Validierung der analytischen Testleistung gemäß aktuell gültiger Richtlinien empfohlen.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse werden mittels der erhaltenen A450 berechnet.

Bei Verwendung anderer als der vorgegebenen Verdünnungen (1:20 Zweistufen- bzw. 1:10 Einstufenmethode) muss der erhaltene Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.

Beispiel für eine Kalibrationskurve:



Einschränkungen:

- Um eine optimale Leistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sollten die technischen Anweisungen sorgsam beachtet werden.
- Jedes Reagenz mit Anzeichen für Kontamination ist zu verwerfen.
- Jede auffällige Probe ist zu verwerfen.
- Wird ein Waschschrift nicht korrekt ausgeführt, kann dies einen zu hohen Extinktionswert hervorrufen.
- Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, Modifikationen in Bezug auf diese Gebrauchsanleitung oder die Verwendung der Reagenzien zu validieren.
- Fehlerhafte Ergebnisse können durch bakterielle Kontamination der Reagenzien, unzureichende Inkubationszeiten, unzureichende Reinigung der Vertiefungen der Mikrotiterplatte, nicht ausreichenden Schutz des Substrats vor Sonnenlicht, Auslassen von Testreagenzien, Abweichen von den vorgeschriebenen Temperaturen oder durch Auslassen von Testschritten hervorgerufen werden.

Testeigenschaften:

Messbereich: 0,05 bis ca. 1,20 IE/mL ADAMTS-13 im Plasma (d.h. 0,0025 bis 0,060 IE/mL in der getesteten 20-fachen Verdünnung)

Intra-Assay VK: C1 (0,87 IE/mL) 5,77%; C2 (0,47 IE/mL): 4,79%

Inter-Assay VK: C1 (0,87 IE/mL) 5,32%; C2 (0,47 IE/mL): 5,92%

Wiederfindung: 90-110 % bei mit gereinigtem ADAMTS-13 versetzten Citratplasma.

Normalkonzentration in Plasma:

0,60 bis 1,30 IE/mL (3)

Ergänzende Information:

ADAMTS-13 steht für "A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin-1-like domains 13". Die Protease spaltet große vWF-Multimere an der Oberfläche von Endothelzellen. Eine verringerte Konzentration oder Aktivität von ADAMTS-13 führt zu großen vWF-Multimeren im Blutkreislauf und damit zu einem erhöhten Risiko für arterielle Thrombosen und einer starken Tendenz zur Thrombozytenaggregation. ADAMTS-13 wird von Leber- und Endothelzellen gebildet. Das Protein enthält 1427 Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 145 kDa.

Referenzen:

- Hubbard AR, Heath AB, Kremer Hovinga JA; Subcommittee on von Willebrand Factor. Establishment of the WHO 1st International Standard ADAMTS13, plasma (12/252): communication from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2015 Jun;13(6):1151-3.
- Zheng XL. Structure-function and regulation of ADAMTS-13 protease. J Thromb Haemost. 2013 Jun;11 Suppl 1(0 1):11-23.
- Bazzan M, Montaruli B, Sciascia S, Cosseddu D, Norbiato C, Roccatello D. Low ADAMTS 13 plasma levels are predictors of mortality in COVID-19 patients. Intern Emerg Med. 2020 Aug;15(5):861-863.

5-Diagnostics AG, Heuberg 7, CH-4051 Basel, Switzerland
info@5-diagnostics.com, www.5-diagnostics.com

SH, 5 rue Philippe Seguin, F-95130 Franconville, France