

# ADAMTS-13 Activity Assay (ATS-13<sup>®</sup>)

## EINSATZ

Zur quantitativen Messung der ADAMTS-13 Protease Aktivität.

*Nur für Forschungszwecke.*

## Zusammenfassung und Erläuterungen

ADAMTS-13 die von Willebrand Faktor (vWF) spaltende Protease; der Mangel an ADAMTS-13 Aktivität wurde im Plasma von Patienten mit Thrombotisch- Thrombozytopenischer Purpura (TTP) nachgewiesen. Der Mangel an ADAMTS-13 Aktivität resultiert aus der Akkumulation von Multimeren des von Willebrand Faktors im Plasma und letztendlich zu intravaskulärer Plättchenaggregation, die zu den klinischen Symptomen, die mit einer TTP verbunden sind, führen.<sup>4,5</sup> Schwache oder gering verringerte Level der ADAMTS-13 Aktivität werden auch mit anderen Krankheitsbildern und Zuständen in Zusammenhang gebracht.<sup>2-5</sup>

## Testprinzip

Der ATS-13<sup>®</sup> basiert auf der Fluoreszenz Resonance Energy Transfer (FRET) Technologie. Ein synthetisches Fragment des von Willebrand Faktor Protein wird als Substrat verwendet. Die Spaltung dieses Substrats zwischen zwei modifizierten Fragmenten führt zum Anstieg der Fluoreszenz.

Dieser Test basiert auf der Quantifizierung der Spaltung eines kleinen Fragment des von Willebrand Faktors durch die ADAMTS-13 Protease. Die Spaltung dieses synthetischen Substrats wird nachgewiesen, indem die Fluoreszenz gemessen wird, die entsteht, wenn sich das Substrat spaltet.

## Reagenzien

Maximale Anzahl an Tests/Packung: 40

Alle Reagenzien sollten entsprechend den Angaben auf den Etiketten gelagert werden.

- |                      |  |
|----------------------|--|
| <b>ATS-<br/>MS</b>   | 1. Schwarze Mikrowell-Streifen: nach Entnahme aus dem Beutel bitte trocken und staubfrei bei Raumtemperatur lagern. Gebrauchsfertig.   |
| <b>ATS-<br/>SUB</b>  | 2. Substrat, lyophilisiert: Vor Licht schützen. Lagern Sie das lyophilisierte Substrat bei –15 bis –30°C. Das rehydrierte Substrat im original Vial mit Parafilm gut verschlossen bei –15 bis –30°C im Gefrierschrank ohne Abtauautomatik (No-Frost) dunkel lagern.  |
| <b>ATS-<br/>SD</b>   | 3. Probenverdünnungspuffer: gebrauchsfertig. Lagerung bei 2° bis 8°C.  |
| <b>ATS-<br/>SB</b>   | 4. Substratpuffer: gebrauchsfertig. Lagerung bei 2° bis 8°C.   |
| <b>ATS-<br/>PCH</b>  | 5. Positive Kontrolle - High: Lagerung bei –15 bis –30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen. |
| <b>ATS-<br/>PCL</b>  | 6. Positive Kontrolle - Low: Lagerung bei –15 bis –30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen.  |
| <b>ATS-<br/>CALA</b> | 7. Kalibrator A: Lagerung bei –15 bis –30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen.              |

- |                 |  |
|-----------------|--|
| <b>ATS-CALB</b> | 8. Kalibrator B: Lagerung bei –15 bis – 30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen.     |
| <b>ATS-CALC</b> | 9. Kalibrator C: Lagerung bei –15 bis – 30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen.     |
| <b>ATS-CALD</b> | 10. Kalibrator D: Lagerung bei –15 bis – 30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen.    |
| <b>ATS-CALE</b> | 11. Kalibrator E: Lagerung bei –15 bis – 30°C. Enthält Material humanen Ursprungs. Vor dem Einsatz im auftauen und gut mischen. Gebrauchsfertig. Die Werte finden Sie auf dem Label des Fläschchen und dem Kontroll-Protokollbogen. Nach Gebrauch verwerfen. |

### **Vorsichtsmaßnahmen**

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen der Kalibratoren und Sustrate. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Plasma führt zum Ausfall der Kalibratoren.
- Ungeöffnete und lyophilisierte Reagenzien sind bis zu den aufgedruckten Verfallsdaten bei entsprechender Lagerung haltbar.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die benutzten Sets Kalibratoren und Kontrollen und die benutzten Streifen.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion ist temperaturabhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Verwenden Sie nur Plasma im Test. Serum führt zu ungenauen Ergebnissen.

### **Warnhinweis**

- Alle eingesetzten humanen Plasmen in den Kalibratoren und positiven Kontrollen wurden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB<sub>s</sub>-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

### **Probengewinnung**

#### **Probengewinnung und Probenvorbereitung**

*Hinweis: Verwenden Sie für diesen Test nur plättchenarmes Plasma entnommen in 3,2% Natrium-Citrat. Verwenden Sie keine EDTA-Plasmen! Entnehmen Sie weitere Details zur Entnahme, Lagerung und Durchführung von Blutproben für Gerinnungsparameter und der allgemeinen Durchführung von Gerinnungstesten der Approved Guideline H21-A4 NCCLS, Volume 23, Nummer 35, Dezember 2003.*

Entnahme des Plasma:

1. Entnehmen Sie das Blut in Natrium-Citrat (3,2%) Entnahmeröhrchen (mit hellblauer Kappe) .

*Hinweis: Entnehmen Sie immer die vollständige Menge Blut für das Entnahmeröhrchen, um das Verhältnis Blut zu Antikoagulants von 1:9 sicherzustellen.*

2. Lagern Sie das Röhrchen nach Entnahme bei Raumtemperatur bis zur Zentrifugation.

*Hinweis: Um optimale Ergebnisse zu erhalten, sollten die Proben zwischen 15 Minuten und 2 Stunden nach Entnahme abzentrifugiert werden.*

- Mischen Sie die Proben vor dem Zentrifugieren, indem Sie die Röhrchen vorsichtig 8 – 10 mal wenden.
- Zentrifugieren Sie die Proben bei Raumtemperatur in einem horizontalen Rotor (swing-out rotor) für 15 – 20 Minuten bei 1500 – 1800 rcf (Relative Centrifugal Force) ohne Bremse.

**Warnhinweis:** Zu hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten ( ber 2000 rcf) können zum Bruch der Röhrchen führen, was zum Kontakt mit Blut führen kann oder auch zu Verletzungen.

- Pipettieren Sie nach der Zentrifugation 2/3 des Plasma-Layer in ein Plastikröhrchen.
- Zentifugieren Sie das Plasma für 5 Minuten bei 1500 - 1800 rcf, um alle Erythrozyten- und Thrombozytenreste zu entfernen.
-  berf hren Sie 2/3 des Plasmat berstandes in ein neues Plastikröhrchen, und vermeiden sie dabei den Kontakt mit den Zellen am Boden.

### **Probenlagerung**

- Das Plasma muss bei 2 bis 8  C gelagert und innerhalb von 4 Stunden getestet werden **oder** aliquotiert und bei –70 C oder kälter bis zu 6 Monaten eingefroren werden.
- Gefrorenes Plasma sollte bei 37 C im Wasserbad schnell aufgetaut werden. Aufgetautes Plasma bei 2 bis 8  C lagern und innerhalb von 4 Stunden einsetzen.

### **Durchführung**

#### **Mitgelieferte Materialien:**

*Box A:*

- 6 x 130 l positive Kontrolle (hoch-High)
- 6 x 130 l positive Kontrolle (Niedrig-Low)
- 6 Sets der 5 Kalibratoren zu je 130 l: Kalibrator A, B, C, D, E
- 1 x 0,12mg Substrat

*Box B:*

- 2 Rahmen mit je 6 – 2 x 8 schwarzen, unbeschichteten Mikrowell-Teststreifen
- 1 x 14ml Probenverdünnungspuffer
- 1 x 14ml Sustratpuffer

#### **Zusätzlich benötigte Materialien:**

- Polypropylenröhrchen
- Transferpipetten
- Pr zisionspipetten mit verstellbarem Volumen 10-100 l und 100-1000 l
- Pipettenspitzen
- DMSO (Reagent Grade)
- Fluororeader: Anregungswellenlänge (Ex) 340 - 350 nm und Emissionswellenlänge (Em) 440 - 450nm
- Timer
- Zentrifuge
- Alufolie

### **Testdurchführung**

- Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.

*Hinweis:* Pro Ansatz wird nur ein Satz Kontrollen und Kalibratoren angesetzt.

- Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogen/Recording Sheet jeder Probe horizontal in Doppelbestimmung ihre Positionen zu und dokumentieren Sie die Proben-ID-Nummer.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Streifen und verschließen Sie den Beutel sofort wieder nach Entnahme. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

4. Verdünnen Sie die Patienten-Plasmen in einem Polypropylenröhrchen , indem Sie 18µl Plasma mit 132µl Probenverdünnungs-puffer verdünnen.
5. Pipettieren Sie 50µl jedes Kalibrators **unverdünnt** in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrowell-Streifen (siehe Protokollbogen).
6. Pipettieren Sie 50µl der positiven Kontrolle Low **unverdünnt** in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrowell-Streifen (siehe Protokollbogen).
7. Pipettieren Sie 50µl der positiven Kontrolle High **unverdünnt** in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrowell-Streifen (siehe Protokollbogen).
8. Pipettieren Sie 50µl jedes verdünnten Patientenplasmas in Doppelbestimmung in die entsprechenden Vertiefungen der Mikrowell-Streifen (siehe Protokollbogen).

*Hinweis: Pro Ansatz wird nur ein Satz Kontrollen und Kalibratoren benötigt.*

9. Vorbereitung der Substrat-Stock-Lösung. Rehydrieren Sie das lyophilisierte Substat, indem Sie 37µl DMSO in das Substrat-fläschchen pipettieren. Gut mischen und anschließend 113µl destilliertes Wasser zugeben. Setzen Sie die Verschußkappe wieder ein und mischen Sie gut durch, um alle Bestandteile vollständig zu lösen.
10. Herstellung der Substratlösung (3%) in einem Polypropylenplastikröhrchen für den Testansatz:

# Patientenproben	Menge Substrat-Stock-Lösung (µl)	Menge Substratpuffer (µl)
1	25	795
5	37	1193
10	53	1714
40*	150	4850

\* Für diesen Ansatz können Sie den Substratpuffer direkt zur Substrat-Stock-Lösung geben.

*Hinweis: Verwenden Sie **keine** Multipipette.*

11. Mischen Sie die Gebrauchslösung gut durch und pipettieren Sie sofort 50µl der Substratlösung in jede Vertiefung mit Patientenproben , Kontrollen und Kalibratoren. Klopfen Sie leicht gegen den Rahmen, damit sich das Substrat besser verteilt.

*Hinweis: Die verbleibende Substrat-Stock-Lösung wird in der Originalflasche mit dem Originalverschluss verschlossen, mit Parafilm versiegelt und bei -20 C in No-Frost-Gefrierschränken im Dunkeln gelagert. Die Stock-Lösung kann bis zu 6 Monaten nach Rehydrierung gelagert und verwendet werden.*

12. Sie bei Raumtemperatur mit 340-350 nm Anregung (Ex=340-350) und 440-450 nm Emission (Em=440-450) zum Zeitpunkt 0 (Null). Dokumentieren Sie die Ergebnisse.

*Hinweis: Die Ablesung muss innerhalb von 5 Minuten nach Zugabe des Substrats erfolgen.*

13. Stellen Sie den Timer auf 25 Minuten und starten sie ihn.
14. Entnehmen Sie den Rahmen dem Reader und lagern Sie ihn bei Raumtemperatur 25-35 Minuten im Dunkeln. Decken Sie den Rahmen mit einer Alufoie ab.

*Hinweis: Rahmen nicht mit Papier abdecken. Verwenden Sie Alufoleie.*

15. Stellen Sie abschließend den Rahmen nach 25-35 Minuten wieder in den Reader und messen Sie die Extinktionen bei Raumtemperatur mit 340-350 nm Anregung (Ex=340-350) und 440-450 nm Emission (Em=440-450). Dokumentieren Sie die Ergebnisse.

## Ergebnisse

Subtrahieren Sie die Extinktionen des Zeitpunkt 0 (Null) von den Extinktionen der Messung nach 25-35 Minuten. Erstellen Sie eine Kalibrationskurve, indem Sie die Mittelwerte (n=2) der 5 Kalibratoren auf dem Auswertebogen eintragen, die Punkte verbinden und gegen diese Kurve die Extinktionen der Patientenprobe eintragen. Die Standardkurve muss für jeden Ansatz erstellt werden.

## Auswertung

Erstellen Sie die Kalibrationskurve und bestimmen Sie die ADAMTS-13 Aktivität (%) der Proben und Kontrollen, indem Sie auf das Microsoft® Excel Spreadsheet auf der mitgelieferten CD-ROM zurückgreifen. Die Erklärungen finden Sie auf der ersten Seite des ATS-13 Analysis Worksheet. Tragen Sie Ihre Werte ein und das Programm berechnet Ihnen die Ergebnisse (% Normal ADAMTS-13 Aktivität) für Ihre Proben und Kontrollen und erstellt Ihnen die Kurve.

Plasmaproben mit einer ADAMTS-13 Aktivität größer als 100% sollten als >100% Normal ADAMTS-13 Aktivität bewertet und dokumentiert werden.

## Bibliografie

1. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays. Approved Guideline H21-A4 NCCLS, Volume 23, Number 35, December 2003.
2. K. Kokame, M. Matsumoto, Y. Fudjimura and T. Miyata, Blood, 103607 (2004).
3. K. Kokame, Y. Nobe, Y. Kokubo, A. Okayama and T. Miyata, Br J. Haematol., 192, 93 (2005).
4. Bernhard Lämmle and James N. George Seminars in Hematology, 41, 1, 1 (2004).
5. Lämmle B, Kremer Hovings JA, Alberio L., J Thromb Haemost. 3, 1663 (2005).



**GTi DIAGNOSTICS®**

Good science starts with people.®

### **ADAMTS-13 Activity Assay (ATS-13®)**

- *Nur für wissenschaftliche Zwecke*
- Lagerung Box A bei -15 bis -30°C
- Lagerung Box B bei 2 bis 8°C

20925 Crossroads Circle, Suite 200  
Waukesha, WI 53186-4054 USA  
(262) 754-1000 OR 1-800-233-1843

REF ATS-13

Rev. 2010-08-11 (de)



Qarad b.v.b.a.  
Volmolenheide 13  
B-2400 Mol  
Belgium

[www.gtidiagnostics.com](http://www.gtidiagnostics.com)