

# ACTIFLUOR™ ADAMTS13 Activity Assay\*

REF 812



EC REP american diagnostica GmbH  
Kaplaneigasse 35, D-64319 Pfungstadt, Germany

## ENGLISH

### 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.<sup>1</sup> Studies have shown that low levels of ADAMTS13 activity are associated with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP), a life-threatening hematological condition characterized by low platelet count, microvascular thrombi, red cell fragmentation, CNS and renal complications.<sup>2,3</sup> An ADAMTS13 activity level below 5% of normal leads to an accumulation of UL-vWF multimers in plasma.<sup>4</sup> The UL-vWF multimers bind to receptors on platelets inducing platelet aggregation and formation of intravascular thrombi.

Congenital TTP is a rare inheritable disease caused by mutations within the ADAMTS13 gene which result in the production of non-functional ADAMTS13 protein.<sup>5,6</sup> The acquired form of TTP is an autoimmune-like disorder caused by the development of autoantibodies to ADAMTS13 that inhibit enzyme activity.<sup>7</sup> Quantitation 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).<sup>8</sup>

Assays for measuring ADAMTS13 activity including multimer analysis, collagen binding and vWF ELISAs are 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.*<sup>9</sup> Recently, Zhang, *et al.*, developed a novel recombinant VWF86 FRET substrate based upon autoquenching of fluorescein.<sup>10</sup>

### 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 ALEXA488-VWF86 FRET substrate. Proteolytic cleavage of the ALEXA488-VWF86 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 nm; Em=535 nm). A standard curve is constructed using a 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.

**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)

#### WARNING

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

#### REAGENT RECONSTITUTION AND STORAGE

##### R2 ADAMTS13 Standard

Add 250 µL of filtered deionized or distilled water to a vial. Mix gently and let stand for 10 minutes at room temperature (18°-25°C). See the vial label for the lot specific standard concentration “C”. Discard unused reconstituted ADAMTS13 Standard after performing the assay.

##### R3 Positive Control

Add 150 µL of filtered deionized or distilled water to the vial. Mix gently and let stand for 10 minutes at room temperature (18°-25°C). The Positive Control is stable for up to one year when stored frozen at –80°C.

##### R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrate

Dilute R4, the DMSO 1:4 with filtered deionized water to prepare a 25% DMSO solution. Add 300 µL of the 25% DMSO solution to the vial. Do not vortex and let stand for 5 minutes. Mix briefly. NOTE: Protect from light. ALEXA488-VWF86 FRET Substrate is stable for up to one year when stored in the dark at –20°C.

##### R6 Assay Buffer

Add 10 mL of distilled water to a vial and let stand for 5 minutes; vortex briefly. A vial contains sufficient Assay Buffer to perform 24 assays. Assay Buffer is stable for up to one month when stored at -20°C.

##### R7 ADAMTS13 Inactivated Plasma

Add 500 µL of distilled water to a vial. Gently mix and let stand for 10 minutes at room temperature (18°-25°C). ADAMTS13 Inactivated Plasma is stable for 4 hours when stored at room temperature or for up to 6 months when stored at –80°C.

#### SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only citrate collected platelet poor plasma may be used for this assay. Do Not Use EDTA. See "Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-based Coagulation Assays; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003. Plasma collection should be performed as follows:

1. Collect 9 parts of blood into 1 part of 3.2% (0.109 M) trisodium citrate anticoagulant solution.
2. Centrifuge the blood sample at 10,000 x g for 15 minutes.
3. Plasma should be stored at room temperature and assayed within 2 hours. Alternatively, plasma may be stored at –80°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

- 0.22 µm filtered deionized H<sub>2</sub>O or distilled water
- 8-channel pipette covering 50-200 µL
- 1-channel pipette covering 10-200 µL
- microfuge 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

Prior to assay, sample plasma and Positive Control are diluted 1: 2 with ADAMTS13 Inactivated Plasma. In a plastic tube, add 50 µL of citrated plasma or reconstituted

Positive Control to 50  $\mu\text{L}$  of ADAMTS13 Inactivated Plasma and mix gently. Keep at room temperature.

### C. Preparation of ALEXA488-VWF86 FRET Substrate

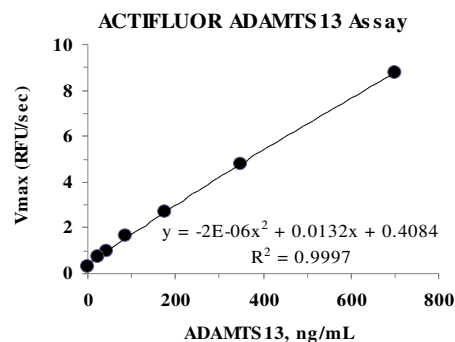
Prewarm Assay Buffer to 37°C prior to performing the assay. Dilute reconstituted Substrate 1:25 with the prewarmed Buffer just before use in Step 5. Note: The assay requires 1.6 mL of prepared substrate for every 16 microwells used.

#### Assay Procedure (kinetic method)

1. Add 80  $\mu\text{L}$  of Assay Buffer to each microwell to be used.
2. Add 20  $\mu\text{L}$  of each ADAMTS13 Standard from Step A to wells A1-A2 through G1-G2 respectively. Add 20  $\mu\text{L}$  of 1:2 diluted Positive Control from Step B to wells H1-H2.
3. Add 20  $\mu\text{L}$  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. For readers using filters, use your FITC filter combination set. Allow the standards and samples to warm for 3 minutes.
5. Add reconstituted ALEXA488-VWF86 Substrate at 1:25 dilution to the prewarmed Assay Buffer from Step C (e.g. add 0.2 mL of Substrate to 4.8 mL of Assay Buffer).
6. Add 100  $\mu\text{L}$  of the 1:25 diluted ALEXA488-VWF86 FRET Substrate to each microwell. Mix plate briefly before making fluorescence readings.
7. Measure the increase in fluorescence for 20 minutes, collecting data at 20 second intervals. Calculate the rate of change in fluorescence, RFU/sec or  $V_{\text{max}}$ .

### RESULTS

A standard curve is constructed by plotting the RFU/sec or  $V_{\text{max}}$  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 assayed sample or Positive Control directly from the standard curve via the RFU/sec or  $V_{\text{max}}$ . Multiply this concentration by 2 to obtain the ADAMTS13 concentration in the sample or Positive Control. If the RFU/sec or  $V_{\text{max}}$  of the sample falls above the range of the standard curve, dilute the plasma further with ADAMTS13 Inactivated Plasma and repeat the assay.

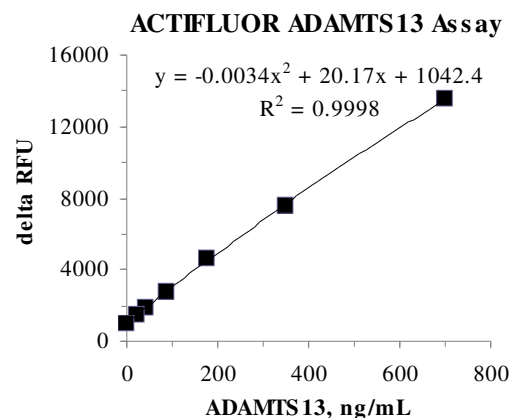
#### Alternative Assay Procedure (Endpoint Method)

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

1. Add 80  $\mu\text{L}$  of Assay Buffer to each microwell to be used.
2. Add 20  $\mu\text{L}$  of each ADAMTS13 Standard from Step A to wells A1-A2 through G1-G2 respectively. Add 20  $\mu\text{L}$  of 1:2 diluted Positive Control from Step B to wells H1-H2.
3. Add 20  $\mu\text{L}$  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. For readers using filters, use your FITC filter combination set. Allow the standards and samples to warm for 3 minutes.
5. Add reconstituted ALEXA488-VWF86 Substrate at 1:25 dilution to the prewarmed Assay buffer from Step C (e.g. add 0.2 mL of reconstituted Substrate to 4.8 mL of Assay Buffer).
6. Add 100  $\mu\text{L}$  of the 1:25 diluted ALEXA488-VWF86 FRET Substrate to each microwell. Mix plate briefly before making fluorescence readings.
7. Immediately read the fluorescence at the start of the reaction ( $T=0$ ).
8. Let the plate incubate for 20 minutes at 37°C, mix and read again ( $T=20\text{min}$ ). Calculate the delta RFU ( $\text{delta RFU} = \text{RFU}_{T=20\text{min}} - \text{RFU}_{T=0}$ ).

### RESULTS

A standard curve is constructed by plotting the delta RFU 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 assayed sample directly from the standard curve via the delta RFU of the sample or Positive Control. Multiply this concentration by 2 to obtain the ADAMTS13 concentration in the sample or Positive Control. If the delta RFU 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 ADAMTS13 activity level was found to be  $666 \pm 135$  ng/mL.

#### QUALITY CONTROL

The Positive Control should be included whenever the assay is performed. If the Positive Control fails to be measured within the specified range, the run should be repeated. Contact American Diagnostica if the control repeatedly fails to be measured within the specified range.

#### TRACEABILITY OF CALIBRATORS AND CONTROL MATERIAL

Information on traceability of calibrators and control material 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 American Diagnostica Inc.
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.<sup>1</sup> 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.<sup>2,3</sup> Ein ADAMTS13 Aktivitätslevel unter 5% des Normalniveaus führt zu einer Anhäufung von UL-vWF Multimeren im Plasma.<sup>4</sup> 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.<sup>5,6</sup> Die erworbene TTP-Form ist eine Autoimmun-Krankheit die durch inhibitorische ADAMTS13 Autoantikörper, die die Enzymaktivität hemmen, hervorgerufen wird.<sup>7</sup> 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.<sup>8</sup>

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.<sup>9</sup> Kürzlich haben Zhang, *et al*. ein neues rekombinantes VWF86 FRET Substrat entwickelt welches auf dem Autoquenching von Fluorescein beruht.<sup>10</sup>

## 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 rekombinanten 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 Spektrofluorometers ( $E_x=485$  nm;  $E_m=535$  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** mit Rahmen, 48 wells (weiss)

**R2 ADAMTS13 Standard**, 250 µL, 2 Fläschchen (lyophilisiert)

**R3 ADAMTS13 Positivkontrolle**, 150 µL (lyophilisiert)

**R4 DMSO**, 0.5 mL

**R5 ALEXA488-VWF86 FRET Substrat**, 300 µL (lyophilisiert)

**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 zugelassener 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.

## REKONSTITUTION DER REAGENZIEN UND LAGERUNG

### R2 ADAMTS13 Standard

250 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. Vorsichtig mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen. Die chargenspezifische Standardkonzentration „C“ ist auf dem Etikett des Fläschchens angegeben. Unbenutzten rekonstituierten ADAMTS13 Standard nach Lagerung im Dunklen bei -80°C bis zu einem Jahr haltbar.

### R3 Positiv Control

150 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. Vorsichtig mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen. Die Positivkontrolle ist bei Lagerung bei -80°C bis zu einem Jahr haltbar.

### 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 5 min stehen lassen und dann vorsichtig mischen. BEACHTEN: Vor Licht schützen. Das ALEXA488-VWF86 FRET Substrat ist bei Lagerung im Dunklen bei -20°C bis zu einem Jahr haltbar.

### R6 Assaybuffer

10 mL destilliertes Wasser in das Fläschchen, 5 min stehen lassen und dann kurz vortexen. Ein Fläschchen enthält genügend Testpuffer um 24 Tests durchzuführen. Bei Lagerung bei -20°C ist der Assaypuffer bis zu einem Monat haltbar.

### R7 ADAMTS13 Inaktiviertes Plasma

500 µL gefiltertes deionisiertes oder destilliertes Wasser in das Fläschchen geben. Vorsichtig mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18°-25°C) stehen lassen. ADAMTS13 inaktiviertes Plasma ist bei Lagerung bei Raumtemperatur bis zu 4 h stabil oder bei -80°C bis zu 6 Monate haltbar.

## 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; Approved Guidelines-Fourth Edition", NCCLS

Document H21-A4, Vol. 23, No. 35, December 2003. Die Vorbereitung der Blutproben sollte wie folgt durchgeführt werden:

1. 9 Teile Blut in 1 Teil 3.2% (0.109 M) Trinatrium-Zitrat Antikoagulans Lösung geben.
2. Blut Proben bei 10,000 x g für 15 Minuten zentrifugieren.
3. Das Plasma sollte bei Raumtemperatur gelagert werden und innerhalb von 2 h bestimmt werden. Alternativ kann das Plasma bei -80°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 H<sub>2</sub>O  
8 - Kanalpipette für Volumenbereich von 50-200 µL  
1 - Kanalpipette für Volumenbereich von 10-200 µL  
Mikrozentrifugen Röhren, 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 Mikroröhren 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. In ein Plastikröhrchen 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

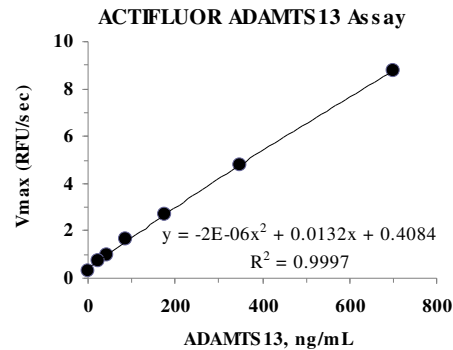
Assaybuffer auf 37°C vorwärmen bevor der Test durchgeführt wird. Bei Schritt 5 (s.u.) wird rekonstituiertes FRET Substrat 1:25 mit dem vorgewärmten Assaypuffer verdünnt (z.B. 0.2 mL des Substrats zu 4.8 mL Assaypuffer geben). Pro Microwell Streifen (16 wells) werden 1.6 mL des vorbereiteten Substrats benötigt.

### 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<sub>max</sub>.

## ERGEBNISSE

Es wird eine Standardkurve erstellt indem der RFU/sec oder V<sub>max</sub> 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)

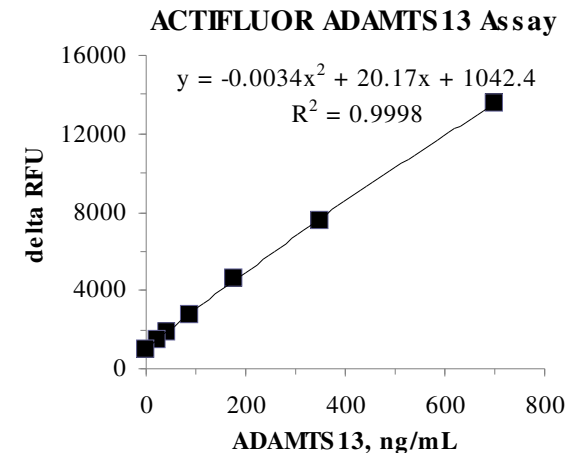
Wenn der Fluoreszenz-Reader nicht für kinetische Messungen geeignet ist, dann kann die Endpunkt Methode verwendet werden.

1. Je 80  $\mu$ L Assaybuffer in die Vertiefungen geben.
2. Je 20  $\mu$ L der ADAMTS13 Standards aus A in die Vertiefungen A1-A2 bis G1-G2 geben. Je 20  $\mu$ L der 1:2 verdünnten Positivkontrolle (aus Schritt B) in die Vertiefungen H1-H2 geben.
3. Je 20  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sub>T=20min</sub> - RFU<sub>T=0</sub>).

### 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  $666 \pm 135$  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 American Diagnostica, wenn die Positivkontrolle wiederholt nicht im Zielbereich liegt.

## RÜCKFÜHRBARKEIT DES KALIBRATOR- UND KONTROLLMATERIALS

Informationen zur Rückführbarkeit sind bei American Diagnostica 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 American Diagnostica Inc.
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.

**\*United States Patent No. 7,270,976**