

M65 EpiDeath[®] ELISA

REF 10040

Instructions for Use

Bruksanvisning

Gebrauchsanweisung

Mode d'emploi

Istruzioni per l'uso

Instrucciones de uso

In USA, Canada and Japan

For research and laboratory use only.

Not for human or diagnostic use.

M65 EpiDeath® ELISA

Instructions for Use

English:

page 5 – 15

En

Bruksanvisning

Svenska:

sida 17 – 27

Sv

Gebrauchsanweisung

Deutsch:

Seite 29 – 39

De

Mode d'emploi

Français:

pages 41 – 51

Fr

Istruzioni per l'uso

Italiano:

pagina 53 – 63

It

Instrucciones de uso

Español:

página 65 – 75

Es

Instructions for Use of the M65 EpiDeath® ELISA

Contents

Explanation of Symbols Used on Labels	6
Trademarks	6
Shipping and Storage	6
Assay Description	7
Intended Purpose	7
Summary and Explanation of the Test	7
Principle of the Method	7
Materials Provided for 96 Determinations	8
Materials Required but not Provided	9
Assay Protocol	9
Warnings and Precautions	9
Collection and Preparation of Blood Samples	9
Collection and Preparation of <i>in vitro</i> Samples for Research Use Only	10
Component Preparation	10
Storage and Shelf Life After First Opening	11
Assay Procedure	12
Flow Chart	13
Calculation of Analytical Results	13
Assay Performance	14
Performance Characteristics	14
Traceability of Standard	14
Internal Quality Control	14
Limitations of the Method	15
Literature References	15
Warranty	15

Explanation of Symbols Used on Labels



Catalogue number



Contains sufficient for <n> tests



Batch code



Manufacturer



Temperature limitation



Use by



Consult Instructions for Use

Trademarks

M30[®], M30 Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] and PEVIVA[®] are registered trademarks of VLVbio AB.

Shipping and Storage

The M65 EpiDeath[®] ELISA is shipped in cooled conditions and should be stored at 2–8 °C. *Note!* Do not freeze!

Assay Description

Intended Purpose

The M65 EpiDeath® ELISA is a one-step *in vitro* immunoassay for the quantitative determination of soluble keratin 18 (K18) in serum and plasma.

En

Summary and Explanation of the Test

Extracellular K18 can be used as a marker for epithelial cell death. During necrosis, loss of cell membrane integrity will result in the release of intracellular proteins, including K18, into the extracellular compartment. Apoptosis represents an active form of cell death that initially preserves plasma membrane integrity but which is commonly followed by secondary necrosis where intracellular components are released. The M65 EpiDeath® ELISA assay measures total soluble K18 released from dead cells (necrotic and apoptotic). Measurements from cell culture supernatants or human serum/plasma samples by the M65 EpiDeath® ELISA will therefore represent the total epithelial cell death by any cause (ref. 1).

K18 is cleaved by caspases during apoptosis. The M30 Apoptosense® ELISA assay (PEVIVA prod. no. 10011; ref. 2) specifically measures the level of caspase-cleaved K18 fragments (ccK18) containing the K18Asp396 neo-epitope. The combination of the M30 Apoptosense® ELISA and the M65 EpiDeath® ELISA therefore facilitates the determination of cell death mode *in vitro* and in serum or plasma from patients or experimental animals with human tumour xenografts (ref. 1, 3, 4).

The M65 EpiDeath® ELISA uses two mouse monoclonal antibodies (clone M5, IgG2b, and M6, IgG2a) specific for conventional epitopes of K18. The M5 antibody detects human K18, but does not react to mouse K18 (ref. 4). The M65 EpiDeath® ELISA will specifically detect tumour cell death in mice carrying human tumour xenografts (ref. 4).

M65 EpiDeath® ELISA is intended for use in research and clinical trials in the fields of oncology, hepatology, transplantation and sepsis.

Principle of the Method

The M65 EpiDeath® ELISA is a solid-phase sandwich enzyme immunoassay. Standards, controls and samples react with a solid phase capture antibody M5 directed against K18 and the HRP- (Horseradish Peroxidase) conjugated M6 antibody directed against a different epitope of K18. Unbound

conjugate is removed by a washing step. TMB Substrate is added. The colour development is stopped and the absorbance is read. The resulting colour is directly proportional to the concentration of the analyte.

By plotting a standard curve from known concentrations versus measured absorbance, the amount of antigen in the sample can be calculated. The concentration of the antigen is expressed as units per litre (U/L).

Materials Provided for 96 Determinations

M5 Coated Microstrips: One microplate, 12 strips with 8 wells each, 96 dry wells in total. The wells are coated with mouse monoclonal K18 antibody M5. The microplate is sealed in an aluminium bag, which contains a desiccating device. If not all the strips are used, reseal the bag and keep the desiccating device inside. *Ready for use!*

M65 EpiDeath Conjugate: Concentrate (24 × conc.). One vial containing 0.4 mL of mouse monoclonal M6 antibody (anti-K18) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in a phosphate buffer with protein stabilizers. Preservative added. Should be diluted with M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. *Note!* Do not expose to light!

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer: One vial containing 12 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M65 EpiDeath Conjugate. Preservative added. Blue coloured.

M65 EpiDeath Standard A–H: Standard A containing 2.5 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standard B–H, 0.6 mL each, containing standard material in phosphate buffer with FCS. The values of Standard A–H are 0, 200, 400, 800, 1 200, 2 000, 3 000, and 5 000 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!* Standard A can be used for dilutions of samples > 5 000 U/L.

M65 EpiDeath Control Low & High: Two vials containing 0.6 mL of reactive components in phosphate buffer with FCS. The values of M65 EpiDeath Control Low and M65 EpiDeath Control High are 300 ± 60 U/L and 2500 ± 500 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!*

Wash Tablet: One tablet for 500 mL of prepared wash solution. Dissolve the Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

TMB Substrate: One bottle containing 22 mL of TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) Solution. *Note!* Do not expose to light! *Ready for use!*

Stop Solution: One vial containing 8 mL of 1.0 M sulphuric acid. *Ready for use!*

Sealing Tape: One (1) sheet.

Instructions for Use.

Certificate of Analysis.

Materials Required but not Provided

- Microplate reader (wavelength: 450 nm; linear 0–3 OD)
- Microplate shaker (oscillation: 600 rpm; orbit: 1.5–4 mm)
- 96-well microtiter plate washer or multichannel pipette (volume 250 µL)
- Vortex mixer
- Precision pipettes: 25, 50, 75 and 200 µL
- Cylinder (500 mL)
- Deionised water

Assay Protocol

Warnings and Precautions

1. The M65 EpiDeath® ELISA kit is intended for *in vitro* use only.
2. Do not mix reagents from different kit lots.
3. All patient specimens should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
4. Do not use samples that are contaminated.
5. The Stop Solution contains 1.0 M sulphuric acid, which will cause irritation of the skin and is harmful to the eyes. In case of contact, flush with plenty of water and seek medical advice.
6. Safety Data Sheets (SDS) are available on www.VLVbio.com or by request.

Collection and Preparation of Blood Samples

The sample volume should be sufficient for measuring each sample in duplicate (test volume $2 \times 25 \mu\text{L}$). Donors do not need to be fasting prior to blood collection.

Serum: Collect blood by venipuncture, avoiding haemolysis, into plain tubes (without anti-coagulant), allow blood to clot and collect serum after centrifugation.

Plasma: The M65 EpiDeath® ELISA can also be used for plasma samples (EDTA, heparin or citrate).

Note! The same type of material, i.e. serum or plasma collected by one method, should be used for a specific project. For further information on the performance of the M65 EpiDeath® ELISA using different types of samples, please consult www.VLVbio.com.

Store samples at 2–8 °C up to 4 hours. For longer periods, store samples frozen at -20 °C or lower. Samples can be freeze-thawed without loss

of activity (ref. 3, 5), but it is recommended that repeated freeze-thawing should be avoided. For dilution of samples see sections "Component Preparation" and "Performance Characteristics".

Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only

Calculation of M30:M65 ratios is only recommended for samples ≥ 300 U/L.

Day 1: Seed the cells. The seeding density needs to be determined for the specific cell type and the type of cytotoxic agent; 5 000–10 000 cells per well in a 96-well plate is usually adequate.

Day 2: Wash the cells once with PBS and add fresh medium (200 μ L/well). Expose the cells to the desired agent(s).

Day 2–4: Collect the sample medium from each well. To avoid drying effects, collecting multiple samples from the same well is not recommended. Centrifuge the medium and collect the cell-free supernatant. *Note!* Avoid collecting cells. 2 \times 25 μ L of cell-free supernatant samples are used for each assay.

If the assay is to be performed the same day, the samples can be stored at 2–8 °C. Samples to be analysed later should be stored at -20 °C or lower. Avoid repeated freeze-thawing.

Component Preparation

Dilution of M65 EpiDeath Conjugate

Dilute the M65 EpiDeath Conjugate with M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. The M65 EpiDeath Conjugate vial contains exactly 0.4 mL. Add 9.2 mL of the M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer directly to the M65 EpiDeath Conjugate vial and mix.

Dissolving of Wash Tablet

Dissolve one Wash Tablet in 500 mL of fresh deionised water.

Dilution of Samples

Samples higher than Standard H (5 000 U/L) should be diluted with Standard A or blood donor serum. Since dilution in the assay is linear, the original concentration is calculated by multiplying the measured concentration with the dilution factor. In case blood donor serum/plasma was used as sample diluent, its concentration (U/L) must be accounted for.

Storage and Shelf Life After First Opening

If the entire kit is not used, store reagents in their original containers at 2–8 °C. If not all strips are used, reseal the microstrips bag. Remember to include the desiccating device.

The TMB Substrate and the M65 EpiDeath Conjugate are sensitive to light and metal ions and should be stored in the original amber bottles at 2–8 °C at all times between uses. If a new container is used it has to be protected from light! TMB Substrate cannot be used after exposure to light.

If the kit is used on several occasions, store the diluted M65 EpiDeath Conjugate in the vial at 2–8 °C. Do not expose to light. The diluted M65 EpiDeath Conjugate solution is stable for 1 week when stored at 2–8 °C, or for 4 weeks when stored at -20 °C or below.

The Wash Tablet solution is stable for 5 weeks when stored at 2–8 °C.

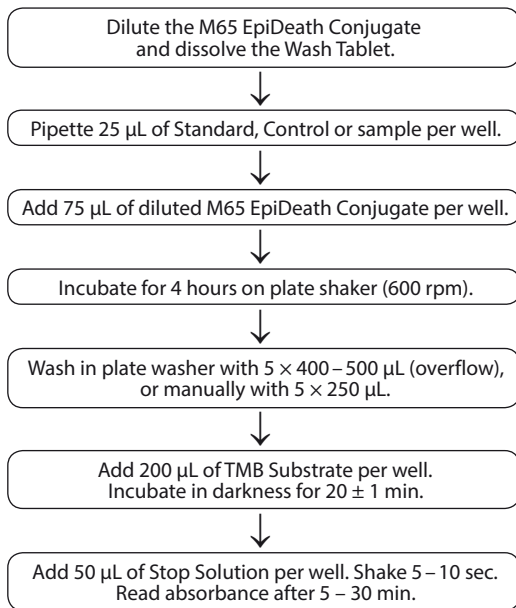
Assay Procedure

The M65 EpiDeath® ELISA should be performed at room temperature (24 ± 3 °C).

1. Allow all reagents to reach room temperature before performing the assay. Vortex all reagents prior to use.
2. Dissolve the Wash Tablet in fresh deionised water (see "Component Preparation").
3. Dilute the M65 EpiDeath Conjugate with M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer (see "Component Preparation") and mix.
4. Pipette 25 µL of M65 EpiDeath Standard (A–H), M65 EpiDeath Control Low, M65 EpiDeath Control High or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75 µL of the diluted M65 EpiDeath Conjugate solution to each well. *Note! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption within 20 minutes.*
6. Cover the wells with sealing tape or a microtiter plate lid.
7. Incubate on shaker for four (4) hours. Speed setting: 600 rpm.
8. Wash the plate in a plate washer five (5) times with 400–500 µL/well of Wash Tablet solution (overflow wash)
or
Wash the plate manually, discarding the incubation solution and washing the wells five (5) times with 250 µL of Wash Tablet solution. Avoid contamination between wells.
9. Add 200 µL of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for 20 ± 1 minutes.
10. Add 50 µL of Stop Solution to each well. To ensure complete mixing of the TMB Substrate and the Stop Solution, shake the microplate for 5–10 seconds. Leave the microplate for 5 minutes before reading the absorbance.
11. Determine the absorbance at 450 nm in a microplate reader within 30 minutes and record the results.
12. Calculate the results as described in section "Calculation of Analytical Results".

Note! The incubation time in the M65 EpiDeath® ELISA is **4 hours!**

Flow Chart



En

Calculation of Analytical Results

The M65 EpiDeath® ELISA results are calculated using computer-assisted methods. Evaluate the values of controls and samples using a suitable program for handling ELISA-type data. Fitting algorithm: Cubic Spline. x-axis: concentration (U/L); y-axis: absorbance at 450 nm (A450).

Note! If samples have been diluted, the observed concentration must be multiplied by the dilution factor, and in case blood donor serum/plasma was used as sample diluent, its concentration (U/L) must be accounted for.

Assay Performance

Performance Characteristics

Measuring range: The measuring range is 0–5 000 U/L;

High Dose Effect: No High Dose effect occurs until 200 000 U/L.

Reproducibility: Within assay (WA % CV) variation is $\leq 10\%$, between assay (BA % CV) variation is $\leq 10\%$ and total variation is $\leq 10\%$ for samples over 300 U/L.

Sensitivity: The minimum detectable concentration of K18 in the M65 EpiDeath® ELISA is 25 U/L, defined as the concentration of K18 that corresponds to the absorbance being two standard deviations from the absorbance of the Standard A (0 U/L).

Spiking recovery: Recovery of high standard when spiked into human blood samples: 105 % (average) and 91–122 % (range).

Linearity/Dilution: Recovery of human sera when diluted in M65 EpiDeath Standard A (0 U/L): 95 % (average) and 88–101 % (range). Recovery of human sera when diluted in blood donor serum: 93 % (average) and 82–101 % (range).

Reference range: In serum from 200 Swedish blood donors, the median was 62 U/L and the 95th percentile was 266 U/L. It is recommended that each laboratory establish its own reference range.

Traceability of Standard

The units measured by the M65 EpiDeath® ELISA are defined against native antigen spiked into serum. Native antigen is calibrated against a recombinant protein standard. *Note!* Due to different assay buffers, standard material cannot be exchanged between different Peviva kits.

Internal Quality Control

The supplied M65 EpiDeath Control Low and High with their given concentrations should be sufficient to secure the assay performance and should be used, at least, in duplicate each time the assay is performed.

If this procedure is not sufficient, each laboratory needs to establish its own controls by the guidelines in section "Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only" or by individual laboratory routine. These controls should be frozen in aliquots and treated in the same way each time the assay is performed.

Limitations of the Method

The clinical utility of K18 measurement in human blood samples as a prognostic indicator and in the management of patients on therapy regimens has not been fully established.

Grossly lipemic ($\leq 1\,250$ mg/dL), icteric (≤ 12.5 mg/dL) or haemolysed (≤ 50 mg/dL) samples do not interfere in the assay.

Literature References

1. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, *Cancer Biomarkers* 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, *Ann Oncol* 19, 2008, 990.

For further references, please consult www.VLVbio.com/literature.

Warranty

The performance data presented here were obtained using the procedure indicated. Any change or modification in this procedure as recommended by the manufacturer may affect the results. In such event, the manufacturer disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and the fitness for use. The manufacturer and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Bruksanvisning för M65 EpiDeath® ELISA

Innehållsförteckning

Förklaring av symbolerna som används på etiketterna	18
Varumärken	18
Leverans och förvaring	18
Beskrivning av testet	19
Avsedd användning	19
Sammanfattning och metodens princip	19
Testprincip	19
Material för 96 bestämningar	20
Material som krävs men inte tillhandahålls	21
Testförfarande	21
Varningar och försiktighetsåtgärder	21
Provtagning och hantering av blodprover	21
Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål	22
Spädning av komponenter	22
Förvaring av komponenter efter första öppnandet	23
Testprocedur	24
Flödesschema	25
Beräkning av resultat	25
Mätmetodens prestanda	26
Metodens karaktäristik	26
Kalibrering	26
Intern kvalitetskontroll	26
Metodens begränsningar	27
Litteratur och referenser	27
Garanti	27

Förklaring av symbolerna som används på etiketterna



Artikelnummer



Räcker till "n" antal tester



Lot nummer



Tillverkare



Temperaturbegränsning



Använd före



Se handhavandebeskrivningen

Varumärken

M30[®], M30 Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] och PEVIVA[®] är varumärken registrerade av VLVbio AB.

Leverans och förvaring

M65 EpiDeath[®] ELISA skickas kyld och ska förvaras vid 2 – 8 °C. *Obs!* Får ej frysas!

Beskrivning av testet

Avsedd användning

M65 EpiDeath® ELISA är ett *in vitro*-enstegsimmunotest för kvantitativ bestämning av lösligt keratin 18 (K18) i serum och plasma.

Sv

Sammanfattning och metodens princip

Extracellulärt K18 kan användas som en markör för att mäta epitelial celldöd. Under nekros kommer disintegration av cellens plasmamembran att leda till att intracellulära proteiner, inklusive K18, frisätts från cellen. Apoptos är en aktiv form av celldöd där plasmamembranet initialt är intakt. Därefter sker vanligtvis s.k. sekundär nekros där intracellulära proteiner frisätts. M65 EpiDeath® ELISA mäter totalt lösligt K18 som frisätts från döda celler (nekrotiska och apoptotiska). Mätningar av prover från vävnadsodlingsmedium eller mänskligt serum/plasma med M65® EpiDeath ELISA kommer därför att spegla epitelial celldöd, oberoende av mekanism (ref. 1).

K18 klyvs av kaspaser under apoptos. M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA prod.-nr 10011; ref. 2) mäter specifikt nivåerna av caspasklyvda K18-fragment (ccK18) innehållande neo-epitopen K18Asp396. Kombinationen av M30 Apoptosense® ELISA och M65® ELISA innebär en unik möjlighet för både kvalitativ (nekros eller apoptos) och kvantitativ bestämning av celldöd. Vävnadsodlingsmedium och serum eller plasma från patienter kan användas för sådana mätningar (ref. 1, 3, 4).

M65 EpiDeath® ELISA baseras på två monoklonala musantikroppar (klon M5, typ IgG2b, och M6, typ IgG2a), som är specifika för olika epitoper på K18. M5-antikroppen binder till humant K18, men reagerar inte med K18 från möss (ref. 4). Därför ger M65 EpiDeath® ELISA ett värde som är specifikt för tumörapoptosen i möss som bär mänskliga xenografftumörer (ref. 5).

Den avsedda användningen för M65 EpiDeath® ELISA är forskning och kliniska studier inom områdena onkologi, hepatologi, transplantation och sepsis.

Testprincip

M65 EpiDeath® ELISA är en fastfas-”sandwich”-enzymimmunotest. Standarder, kontroller och prover reagerar med fastfas-”capture”-antikroppen M5 och HRP- (pepparrotsperoxid) konjugerad M6-antikropp, som är riktade mot två olika epitoper på K18. Obunden konjugerad

antikropp avlägsnas genom upprepade tvättar. TMB-substrat tillsätts. Färgreaktionen stoppas och absorbans läses av. Färgintensiteten är direkt proportionell mot analytens koncentration.

Genom att konstruera en standardkurva med kända koncentrationer mot uppmätt absorbans kan mängden antigen i provet avläsas. Antigenkoncentration anges i enheter per liter (U/l).

Material för 96 bestämningar

M5 Coated Microstrips: En platta innehållande 96 torra brunnar (12 strips \times 8 brunnar). Brunnarna är belagda med monoklonal musantikropp M5 (anti-K18). Mikrotiterplattan förvaras i en aluminiumpåse innehållande torkmedel. Återförslut aluminiumpåsen inklusive torkmedel om inte alla strips används direkt. *Färdig för användning!*

M65 EpiDeath Conjugate: Koncentrat (24 \times konc.). En flaska innehållande 0,4 ml monoklonal M6-musantikropp (anti-K18) konjugerad med pepparrotsoxid (HRP) i fosfatbuffert med proteinstabilisatorer. Konserveringsmedel tillsatt. Ska spädas med M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. *Obs!* Undvik exponering för ljus!

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer: En flaska innehållande 12 ml fosfatbuffert med proteinstabilisatorer för spädning av M65 EpiDeath Conjugate. Konserveringsmedel tillsatt. Blåfärgad.

M65 EpiDeath Standard A – H: Standard A innehållande 2,5 ml fosfatbuffert med fetalkalvserum (FKS). Standard B – H innehållande vardera 0,6 ml standardmaterial i fosfatbuffert med FKS. Koncentrationerna för Standard A – H är 0, 200, 400, 800, 1 200, 2 000, 3 000 och 5 000 U/l. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. *Färdig för användning!* Prover $>$ 5 000 U/l kan spädas med Standard A.

M65 EpiDeath Control Low & High: Två flaskor, 0,6 ml vardera, med reaktiva komponenter i fosfatbuffert med fetalkalvserum. Koncentrationen för M65 EpiDeath Control Low och High är 300 ± 60 U/L respektive 2500 ± 500 U/L. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. *Färdig för användning!*

Wash Tablet: En tablett för 500 ml spädd tvättlösning. Lös upp tabletten i 500 ml färskt avjoniserat vatten.

TMB Substrate: En flaska innehållande 22 ml TMB-lösning (3,3',5,5'-tetrametylbenzidin). *Obs!* Undvik exponering för ljus! *Färdig för användning!*

Stop Solution: En flaska innehållande 8 ml 1,0 M svavelsyra. *Färdig för användning!*

Sealing Tape: Ett (1) ark.

Bruksanvisning.

Analyscertifikat.

Material som krävs men inte tillhandahålls

- Mikrotiterplattläsare (våglängd: 450 nm, linjär 0 – 3 OD)
- Plattskak för mikrotiterplattor (rotationshastighet: 600 varv/min, amplitud: 1,5-4 mm)
- Plattvätt för 96-brunnsplattor eller flerkanalspipett (volym: 250 µl)
- Vortex
- Pipetter för 25; 50; 75 och 200 µl
- Mätglas (500 ml)
- Avjonsierat vatten

Sv

Testförfarande

Varningar och försiktighetsåtgärder

1. M65 EpiDeath® ELISA är endast avsedd för *in vitro*-användning.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Patientprover skall hanteras som om de vore smittbärande och skall hanteras enligt gällande bestämmelser.
4. Använd inte kontaminerade prover.
5. Stop Solution innehåller 1,0 M svavelsyra som kan orsaka hudirritationer och är skadlig för ögonen. Tvätta med stora mängder vatten efter exponering och kontakta läkare.
6. Säkerhetsdatablad (SDS) är tillgängliga på www.VLVbio.com eller vid förfrågan.

Provtagning och hantering av blodprover

Provolymen bör vara tillräcklig för att analysera varje prov i duplikat (testvolym $2 \times 25 \mu\text{l}$). Patienten behöver inte vara fastande före provtagning.

Serum: Blod samlas genom venpunktion i vakuümör (utan antikoagulant). Undvik hemolys. Låt blodet koagulera. Centrifugera och separera serum från celler/koagel.

Plasma: M65 EpiDeath® ELISA kan även användas för plasmaprover (rör som innehåller EDTA, heparin eller citrat).

OBS! Samma typ av provmaterial bör användas under ett specifikt projekt, d.v.s. serum eller plasma insamlat med samma metod. Konsultera www.VLVbio.com för ytterligare information angående användning av olika typer av prover.

Förvara prover vid 2 – 8 °C upp till 4 timmar. För längre tid förvara prover vid -20 °C eller lägre. Prover kan frystinas utan att de förlorar aktivitet men upprepade frystiningar bör undvikas (ref. 5).

För spädning av prover se styckena "Spädning av komponenter" och "Metodens karaktäristik".

Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål

Beräkning av M30:M65-kvoten rekommenderas endast för prover ≥ 300 U/l.

Dag 1: Så ut cellerna. Celltätheten måste bestämmas för varje celltyp och cytotoxiskt ämne; 5 000 till 10 000 celler per brunn i en 96-brunnsplatta är normalt tillräckligt.

Dag 2: Tvätta cellerna en gång med PBS och tillsätt färskt medium (200 μ l/brunn). Behandla cellerna med önskade ämnen.

Dag 2 – 4: Sug upp ett prov från varje brunn. För att undvika uttorkning av brunnar rekommenderas att flera prover inte tas ur samma brunn. Centrifugera mediet och samla upp den vätska som inte innehåller celler. **OBS!** Undvik att få med celler. Använd 2×25 μ l av denna vätska vid varje test.

Förvara prover vid 2 – 8 °C om testet utförs under samma dag. Förvara prover som ska analyseras vid ett senare tillfälle vid -20 °C eller lägre. Undvik upprepade frystiningar.

Spädning av komponenter

Spädning av M65 EpiDeath Conjugate

Späd M65 EpiDeath Conjugate med M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. Flaskan med M65 EpiDeath Conjugate innehåller exakt 0,4 ml konjugerad antikropps lösning. Tillsätt 9,2 ml M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer direkt till flaskan med M65 EpiDeath Conjugate och blanda.

Spädning av Wash Tablet

Lös upp Wash Tablet i 500 ml färskt avjoniserat vatten och blanda.

Spädning av prover

Prover över Standard H (5 000 U/l) bör spädas med Standard A (0 U/l) eller med blodgivarserum. Om prover späds, multiplicera den erhållna koncentrationen med spädningsfaktorn och om blodgivarserum/-plasma används för spädning, ta hänsyn till koncentrationen av denna.

Förvaring av komponenter efter första öppnandet

Förvara reagens i sina respektive originalflaskor vid 2 – 8 °C om inte allt material används vid ett tillfälle. Återförslut påsen med M5 Coated Microstrips om inte alla strips används på en gång. Kom ihåg att inkludera torkmedlet.

TMB Substrate och M65 EpiDeath Conjugate är känsliga för exponering av ljus och metalljoner och bör förvaras i de bruna originalflaskorna vid 2 – 8 °C mellan användningstillfällena. Vid användning av nya flaskor ska lösningarna skyddas från ljus. TMB Substrate kan inte användas om det utsatts för ljus.

Förvara den spädda M65 EpiDeath Conjugate-lösningen i flaskan vid 2 – 8 °C om kittet används vid flera tillfällen. Skydda lösningen från ljus. Spädd M65 EpiDeath Conjugate-lösning är hållbar i 1 vecka om den förvaras vid 2 – 8 °C och 4 veckor om den förvaras vid -20 °C eller kallare.

Upplöst Wash Tablet är hållbar i 5 veckor om den förvaras vid 2 – 8 °C.

Sv

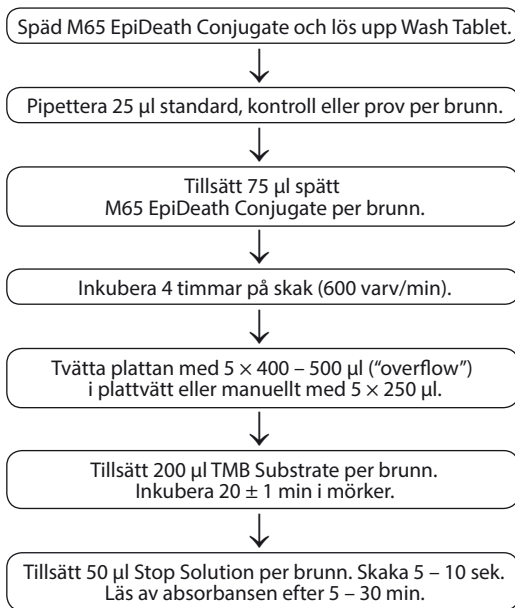
Testprocedur

M65 EpiDeath® ELISA ska utföras vid rumstemperatur (24 ± 3 °C).

1. Rumstemperera alla komponenter och prover före testsättning. Blanda på vortex före användning.
2. Lös upp Wash Tablet i färskt avjoniserat vatten (se "Spädning av komponenter").
3. Späd M65 EpiDeath Conjugate med M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer och blanda ordentligt (se "Spädning av komponenter").
4. Pipettera 25 µl M65 EpiDeath Standard (A – H), M65 EpiDeath Control Low eller High eller prov per brunn (duplikat rekommenderas).
5. Tillsätt 75 µl av spädd M65 EpiDeath Conjugate-lösning till varje brunn. *OBS! Steg 4 och 5 ska utföras utan avbrott inom 20 minuter.*
6. Täck brunnarna med Sealing Tape eller med ett lock för mikrotiterplattor.
7. Inkubera på skak i 4 timmar. Skakhastighet: 600 varv/min.
8. Tvätta plattan i en plattvätt: 5 tvättcykler om 400 – 500 µl/brunn ("overflow"-tvätt).
eller
Tvätta plattan manuellt: töm och tvätta plattan 5 gånger med 250 µl spädd tvättlösning. Undvik kontamination mellan brunnarna.
9. Tillsätt 200 µl TMB Substrate i alla brunnar. Inkubera i mörker vid rumstemperatur i 20 ± 1 minuter.
10. Tillsätt 50 µl Stop Solution till alla brunnar. Skaka mikrotiterplattan i 5 – 10 sekunder för att säkerställa att TMB Substrate och Stop Solution är väl blandade. Låt mikrotiterplattan stå i 5 minuter innan avläsning av absorbans.
11. Mät absorbansen i en plattläsare vid 450 nm inom 30 minuter.
12. Beräkna resultaten enligt beskrivning under stycket "Beräkning av resultat".

OBS! Inkubationstiden för M65 EpiDeath® ELISA är 4 timmar!

Flödesschema



Sv

Beräkning av resultat

Testresultat från mätningen i M65 EpiDeath® ELISA beräknas med hjälp av ett datorprogram. Utvärdera mätvärden för kontroller och prover med hjälp av ett lämpligt program för hantering av denna typ av data. Anpassningsalgoritm: kubisk spline; x-axeln: koncentration i U/l; y-axeln: absorbans vid 450 nm ("A450").

Obs! Om prover har späts, multiplicera den erhållna koncentrationen med spädningsfaktorn och om blodgivarserum/-plasma har använts för spädning, ta hänsyn till koncentrationen av denna.

Mätmetodens prestanda

Metodens karaktäristik

Mätområde: Mätområdet är 0 – 5 000 U/l.

High dose-effekt: Metoden har ingen high dose-effekt upp till 200 000 U/l.

Reproducerbarhet: Spridningen av mätvärden inom test ("WA % CV") är $\leq 10\%$, spridningen av mätvärden mellan test ("BA % CV") är $\leq 10\%$ och spridningen av alla mätvärden ("total % CV") är $\leq 10\%$ för prover > 300 U/l.

Känslighet: Den lägsta detekterbara koncentrationen av K18-antigen som kan mätas med M65 EpiDeath® ELISA är 25 U/l, vilket motsvarar den absorbans som ligger 2 standardavvikelser från absorbansen för Standard A (0 U/l).

Spiking recovery: När en hög standard tillsätts till ett mänskligt blodgivarprov erhålls i medel 105 % av förväntat koncentration inom spannet 91 – 122 %.

Parallellism/Spädbarhet: Vid spädning av patientsera i M65 EpiDeath Standard A (0 U/l) erhålls i medel 95 % av förväntat värde inom spannet 88 – 101 %. Vid spädning av patientsera i blodgivarserum erhålls i medel 93 % av förväntat värde inom spannet 82 – 101 %.

Referensområde: I serum från 200 svenska blodgivare har medianen bestämts till 62 U/l och den 95:te percentilen till 266 U/l. Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sitt eget referensområde.

Kalibrering

Enheten i M65 EpiDeath® ELISA är definierad mot humanserum innehållande nativt antigen. Det nativa antigenet är kalibrerat mot en rekombinant proteinstandard. *Obs!* På grund av skillnader i reaktionsbuffertar kan standarder inte utbytas mellan olika Peviva-produkter.

Intern kvalitetskontroll

Att mätvärdena för kontrollerna M65 EpiDeath Control Low och High överensstämmer med deras angivna koncentrationer bör vara tillräckligt för att säkerställa testets prestanda och bör användas vid varje testtillfälle (duplikat rekommenderas).

Om denna procedur inte är tillräcklig rekommenderas att varje laboratorium upprättar egna interna kontroller enligt vad som anges under stycket "Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål" eller

enligt interna laboratorierutiner. Dessa kontroller bör frysas i alikvoter och hanteras likadant vid varje testtillfälle.

Metodens begränsningar

Det kliniska värdet av serummätningar av K18 som prognostisk markör eller för monitorering av behandlingssvar är ännu ej fullt klarlagt.

Lipemiska ($\leq 1\,250$ mg/dl), ikteriska ($\leq 12,5$ mg/dl) eller hemolyserade (≤ 50 mg/dl) prover påverkar inte testresultaten.

Sv

Litteratur och referenser

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
- 6.

För ytterligare referenser, se www.VLVbio.com/literature.

Garanti

Prestanda för testet har erhållits genom att använda det testförfarande som redovisas ovan. Varje ändring eller modifiering av de testprocedurer som rekommenderas av tillverkaren kan påverka testresultaten. I dessa fall frånsäger sig tillverkaren allt juridiskt ansvar inklusive säljbarhets- och användargaranti. Tillverkaren och dess auktoriserade distributörer ska i dessa fall inte hållas ansvariga för skador som orsakats indirekt eller som en konsekvens.

Gebrauchsanweisung für M65 EpiDeath® ELISA

Inhalt

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen	30
Handelsmarken	30
Lagerung und Versand	30
Testdurchführung	31
Verwendungszweck	31
Zusammenfassung und Erklärung des Tests	31
Testprinzip	31
Reagenzien für 96 Bestimmungen	32
Zusätzlich benötigtes Material	33
Testprotokoll	33
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	33
Blutentnahme und Handhabung der Proben	33
Gewinnung und Handhabung von <i>in vitro</i> -Proben nur für die Forschung	34
Verdünnung der Komponenten	35
Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen	35
Testdurchführung	36
Flussdiagramm	37
Berechnung der Analysenergebnisse	37
Eigenschaften des Tests	38
Testcharakterisierung	38
Rückverfolgbarkeit des Standards	38
Interne Qualitätskontrolle	38
Grenzen der Methode	39
Literaturhinweise	39
Haftung	39

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen



Bestellnummer



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Hersteller



Temperaturbegrenzung



Verwendbar bis



Gebrauchsanweisung beachten

Handelsmarken

M30®, M30 Apoptosense®, M65®, EpiDeath® und PEVIVA® sind eingetragene Handelsmarken von VLVbio AB.

Lagerung und Versand

M65 EpiDeath® ELISA wird gekühlt versendet und muss zwischen 2 und 8 °C gelagert werden. **Achtung!** Nicht Einfrieren!

Testdurchführung

Verwendungszweck

M65 EpiDeath® ELISA ist ein einstufiger *in vitro*-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des löslichen Keratins 18 (K18) in Serum und Plasma.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Extrazelluläres K18 kann als Marker für den epithelialen Zelltod verwendet werden. Während der Nekrose führt der Verlust der Zellmembranintegrität zur Freisetzung intrazellulärer Proteine, einschließlich K18, in den extrazellulären Bereich. Apoptose ist eine aktive Form des Zelltods, die am Anfang die Plasmamembranintegrität schützt, der aber häufig eine sekundäre Nekrose folgt, welche die intrazellulären Komponenten freisetzt. Der M65 EpiDeath® ELISA-Test misst das gesamte aus den toten Zellen freigesetzte, lösliche K18 (nekrotischer und apoptotischer Herkunft). Messungen von Zellkulturüberständen oder Proben von menschlichem Serum/Plasma mit dem M65 EpiDeath® ELISA repräsentieren daher den gesamten epithelialen Zelltod jeglicher Ursache (Ref. 1).

K18 wird im Verlauf der Apoptose durch Kaspasen gespalten. Der M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA Prod.-Nr. 10011; Ref. 2) misst speziell den Gehalt an Kaspase-gespaltenen K18-Fragmenten (cck18), die das K18Asp396-Neopepitop enthalten. Die Kombination von M30 Apoptosense® ELISA und M65 EpiDeath® ELISA erleichtert daher die Bestimmung der Art des Zelltodes *in vitro* und im Serum oder Plasma von Patienten (Ref. 1, 3, 4).

Der M65 EpiDeath® ELISA verwendet zwei monoklonale Mausantikörper (M5, IgG2b, und M6, IgG2a), die spezifisch mit konventionellen Epitopen des K18 reagieren. Der M5-Antikörper erkennt menschliches K18, reagiert aber nicht mit K18 von Mäusen (Ref. 4). Daher misst der M65 EpiDeath® ELISA spezifisch den Tumorzelltod bei Mäusen mit menschlichen Tumorentransplantaten (Ref. 4).

M65 EpiDeath® ELISA ist für die Forschung und für klinische Studien in den Bereichen Onkologie, Hepatologie, Transplantation und Sepsis vorgesehen.

Testprinzip

Der M65 EpiDeath® ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. Standards, Kontrollen und Proben reagieren mit einem immobilisierten Fängerantikörper M5, der auf K18 gerichtet ist, und mit dem HRP- (Meerrettich-

peroxidase) konjugierten Antikörper M6, der auf ein anderes Epitop von K18 gerichtet ist. Ungebundenes Konjugat wird durch einen Waschprozess entfernt. TMB-Substrat wird zugegeben. Die Farbentwicklung wird beendet und die Absorption gemessen. Die resultierende Färbung ist direkt proportional zur Konzentration des Antigengehalts.

Durch Aufzeichnung einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen gegen die gemessene Absorption kann der Antigengehalt in der Probe berechnet werden. Die Konzentration des Antigens wird in Einheiten per Liter (U/l) angegeben.

Reagenzien für 96 Bestimmungen

M5 Coated Microstrips: Eine Mikrotiterplatte, 12 Streifen mit je 8 Testmulden, insgesamt 96 trockene Testmulden. Die Mulden sind mit monoklonalem K18-Mausantikörper M5 beschichtet. Die Mikrotiterplatte befindet sich in einem versiegelten Aluminiumbeutel, der einen Trockenmittelbeutel enthält. Eventuell nicht benötigte Streifen müssen im verschlossenen Beutel zusammen mit dem Trockenmittel aufbewahrt werden. *Gebrauchsfertig!*

M65 EpiDeath Conjugate: Konzentrat (24 × konz.). Ein Fläschchen mit 0,4 ml monoklonalem Mausantikörper M6 konjugiert mit Meerrettichperoxidase (HRP) in Phosphatpuffer mit Protein stabilisator. Enthält Konservierungsmittel. Mit M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer verdünnen. *Achtung!* Vor Licht schützen!

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer: Ein Fläschchen mit 12 ml Phosphatpuffer mit Protein stabilisator zur Verdünnung des M65 EpiDeath Conjugates. Enthält Konservierungsmittel. Blaue Lösung.

M65 EpiDeath Standard A – H: Standard A bestehend aus 2,5 ml Phosphatpuffer mit fötalem Kälberserum (FKS). Standard B – H, jeweils 0,6 ml, die das Standardmaterial in Phosphatpuffer mit FKS enthalten. Die Konzentrationen der Standard A – H sind 0, 200, 400, 800, 1.200, 2.000 3.000 und 5.000 U/l. Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. *Gebrauchsfertig!* Standard A kann für Verdünnungen von Proben > 5.000 U/l verwendet werden.

M65 Control Low & High: Zwei 0,6 ml-Fläschchen, die die reaktiven Bestandteile in Phosphatpuffer mit FKS enthalten. Die Konzentrationen der M65 EpiDeath Control Low und High sind 300 ± 60 U/L und 2500 ± 500 U/L. Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. *Gebrauchsfertig!*

Wash Tablet: Eine Tablette für 500 ml zubereiteter Waschlösung. Die Wash Tablet in 500 ml frisch deionisiertem Wasser auflösen.

TMB Substrate: Eine Flasche mit 22 ml TMB-Lösung (3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin). *Achtung!* Vor Licht schützen! *Gebrauchsfertig!*

Stop Solution: Ein Fläschchen mit 8 ml 1,0 M Schwefelsäure. *Gebrauchsfertig!*

Sealing Tape: Eine (1) Lage.

Gebrauchsanweisung.

Analysenzertifikat.

Zusätzlich benötigtes Material

- Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten (Wellenlänge 450 nm, linear 0 – 3 OD)
- Mikrotiterplattenschüttler (Drehzahl: 600 U/min; Orbit: 1,5-4 mm)
- Mikrotiterplattenwascher (für 96 Testmulden) oder Mehrkanalpipette (Volumen 250 µl)
- Wirbelmischer
- Präzisionspipetten: 25, 50, 75 und 200 µl
- Messzylinder (500 ml)
- Deionisiertes Wasser

De

Testprotokoll

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Der M65 EpiDeath® ELISA ist nur für den *in vitro*-Gebrauch.
2. Reagenzien aus unterschiedlichen Kitchargen dürfen nicht vermischt werden.
3. Alle Patientenproben sind als infektiös anzusehen und vorschriftsgemäß zu behandeln und zu entsorgen.
4. Kontaminierte Proben dürfen nicht verwendet werden.
5. Die Stop Solution enthält 1,0 M Schwefelsäure, die Hautreizungen und Schäden an den Augen verursacht. Bei Kontakt mit reichlich Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen.
6. Sicherheitsdatenblätter (SDS) sind unter www.VLVbio.com oder auf Anfrage erhältlich.

Blutentnahme und Handhabung der Proben

Das Probevolumen sollte so bemessen sein, dass mit jeder Probe jeweils zwei Messungen durchgeführt werden können (Testvolumen: 2 × 25 µl). Spender müssen vor der Blutentnahme nicht nüchtern sein.

Serum: Blutgewinnung durch Venenpunktion in einfachen Röhrchen (ohne Antikoagulans) unter Vermeidung von Hämolyse. Blut gerinnen lassen und Serum nach dem Zentrifugieren aufnehmen.

Plasma: Der M65 EpiDeath® ELISA kann auch für Plasmaproben (EDTA, Heparin oder Citrat) verwendet werden.

Achtung! Im Rahmen eines Projekts sollte immer die gleiche Probenart verwendet werden, also entweder Serum oder Plasma (mit gleichem Antikoagulans). Für weitere Informationen über die Leistung von M65 EpiDeath® ELISA bei Verwendung unterschiedlicher Probenarten wenden Sie sich bitte an www.VLVbio.com.

Bewahren Sie die Proben bis zu 4 Stunden bei 2 – 8 °C auf. Bei längerer Lagerung müssen die Proben bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Das Einfrieren und Auftauen der Proben beeinträchtigt zwar deren Reaktivität nicht (Ref. 3, 5), doch sollte es nicht unnötig erfolgen. Bezüglich der Verdünnung der Proben siehe Abschnitte "Handhabung der Bestandteile" und „Testcharakterisierung“.

Gewinnung und Handhabung von *in vitro*-Proben nur für die Forschung

Die Berechnung des M30:M65-Verhältnisses wird nur für Proben ≥ 300 U/I empfohlen.

Tag 1: Aussäen der Zellen. Die Saattiefe richtet sich nach der spezifischen Zellart und dem jeweiligen zytotoxischen Mittel; 5.000 – 10.000 Zellen pro Mulde in einer 96-Testmuldenplatte sind im Allgemeinen ausreichend.

Tag 2: Zellen einmal mit PBS waschen und frisches Medium (200 μ l/Mulde) zugeben. Die Zellen mit der/den gewünschten Testsubstanz(en) versetzen.

Tag 2 – 4: Das Zellkulturmedium von jeder Probenmulde aufnehmen. Um Austrocknung zu vermeiden, nicht mehrere Proben aus der gleichen Mulde entnehmen. Das Medium zentrifugieren und den zellfreien Überstand für die Analyse verwenden. **Achtung!** Aufnahme von Zellen vermeiden.

Je Analyse werden 2×25 μ l zellfreien Überstands verwendet. Falls die Messung am gleichen Tag durchgeführt wird, können die Proben bei 2 – 8 °C aufbewahrt werden. Für spätere Analysen müssen die Proben bei mindestens -20 °C gelagert werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

Verdünnung der Komponenten

Verdünnung des M65 EpiDeath Conjugates

Das M65 EpiDeath Conjugate muss mit M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer verdünnt werden. Das Fläschchen mit M65 EpiDeath Conjugate enthält genau 0,4 ml. 9,2 ml des M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer

direkt in das Fläschchen mit M65 EpiDeath Conjugate zugeben und mischen.

Auflösen der Wash Tablet

Eine Wash Tablet in 500 ml frisch deionisiertem Wasser auflösen.

Verdünnen der Proben

Proben, deren Konzentration den Standard H (5.000 U/l) überschreiten, können mit dem Standard A (0 U/l) oder Blutspenderserum verdünnt werden. Da die Verdünnung im Test linear ist, wird die Originalkonzentration durch Multiplizieren der gemessenen Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor berechnet. Falls Blutspenderserum/-plasma für die Verdünnung der Probe verwendet wurde, muss deren Konzentration (U/l) berücksichtigt werden.

De

Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen

Falls nicht der gesamte Kit verwendet wird, müssen die Reagenzien in ihren Originalbehältern bei 2 – 8 °C gelagert werden. Falls nicht alle Mikrotiterstreifen benötigt werden, diese zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in den Aluminiumbeutel geben und diesen wieder verschließen.

TMB Substrate und M65 EpiDeath Conjugate sind lichtempfindlich und empfindlich gegenüber Metallionen. Sie müssen bei Nichtgebrauch immer in den originalen Braunglasflaschen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Bei Verwendung eines neuen Behälters ist für Lichtschutz zu sorgen! TMB Substrate kann nach Lichteinwirkung nicht mehr benutzt werden.

Falls die Verwendung des Kits auf mehrere Male verteilt wird, muss das verdünnte M65 EpiDeath Conjugate im Fläschchen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Vor Licht schützen. Die verdünnte M65 EpiDeath Conjugate-Lösung ist 3 Wochen lang haltbar. Bei Lagerung bei 2 – 8 °C ist die verdünnte M65 EpiDeath Conjugate-Lösung 1 Woche lang haltbar; bei Lagerung bei -20 °C oder kälter ist die Lösung 4 Wochen lang haltbar.

Die Lösung mit der aufgelösten Wash Tablet ist bei Lagerung bei 2 – 8 °C 5 Wochen lang haltbar.

Testdurchführung

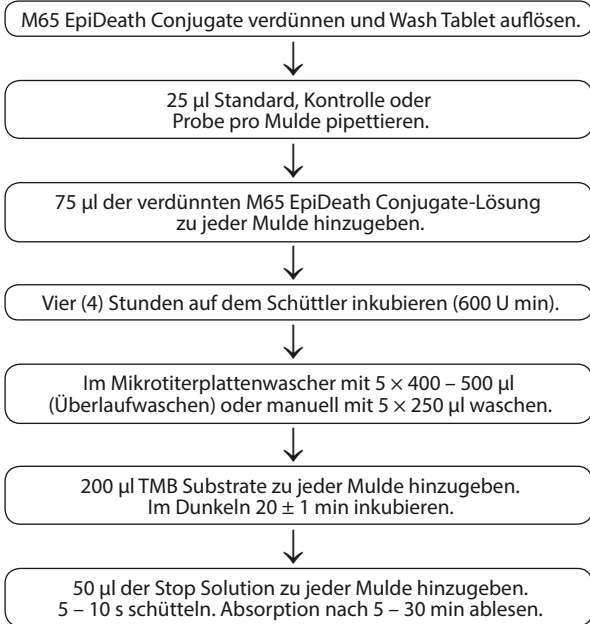
M65 EpiDeath® ELISA muss bei Raumtemperatur (24 ± 3 °C) durchgeführt werden.

1. Vor der Testdurchführung alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Alle Reagenzien vor Gebrauch vortexen.

2. Wash Tablet in frisch deionisiertem Wasser auflösen (Siehe „Verdünnung der Komponenten“).
3. M65 EpiDeath Conjugate mit M65 Conjugate Dilution Buffer verdünnen (siehe „Verdünnung der Komponenten“) und mischen.
4. 25 µl M65 EpiDeath Standard (A – G), M65 EpiDeath Control Low, M65 EpiDeath Control High oder Probe pro Mulde pipettieren (Doppelbestimmungen werden empfohlen).
5. 75 µl der verdünnten M65 EpiDeath Conjugate-Lösung zu jeder Mulde hinzugeben. *Achtung! Die Schritte 4 und 5 müssen aufeinander folgend, ohne Unterbrechung, innerhalb von 20 Minuten ausgeführt werden.*
6. Mulden mit dem Sealing Tape oder einem Deckel für Mikrotiterplatten abdecken.
7. 4 Stunden auf dem Schüttler inkubieren (Geschwindigkeitseinstellung: 600 U/min).
8. Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenwascher 5 Mal mit 400 – 500 µl Waschlösung pro Mulde waschen (Überlaufwaschen) *oder*
Die Mikrotiterplatte von Hand waschen: Inkubationslösung verwerfen und die Mulden 5 Mal mit 250 µl Waschlösung waschen. Kreuzkontamination zwischen den Mulden vermeiden.
9. 200 µl TMB Substrate zu jeder Mulde hinzugeben. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 ± 1 Minuten inkubieren.
10. 50 µl der Stop Solution zu jeder Mulde hinzugeben. Mikrotiterplatte 5 – 10 Sekunden schütteln, um TMB Substrate und Stop Solution vollständig zu vermischen. Mikrotiterplatte vor der Absorptionsmessung 5 Minuten stehen lassen.
11. Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsmessgerät für Mikrotiterplatten innerhalb von 30 Minuten bestimmen und Ergebnisse aufzeichnen.
12. Berechnen der Ergebnisse wie im Abschnitt „Berechnung der Analysenergebnisse“ beschrieben.

Achtung! Die Inkubationszeit beim M65 EpiDeath® ELISA beträgt **4 Stunden!**

Flussdiagramm



De

Berechnung der Analyseergebnisse

Die M65 EpiDeath® ELISA Ergebnisse werden mit computerunterstützten Methoden berechnet. Auswerten der Messergebnisse der Kontrollen und Proben mit einem geeigneten Programm für den Umgang mit Daten vom Typ ELISA. Geeigneter Algorithmus: Kubische Splines. x-Achse: Konzentration (U/l); y-Achse: Absorption bei 450 nm (A450).

Achtung! Falls Proben verdünnt wurden, muss die abgelesene Konzentration mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, und falls dazu Blutspenderserum/-plasma verwendet wurde, muss dessen Konzentration (U/l) berücksichtigt werden.

Eigenschaften des Tests

Testcharakterisierung

Messbereich: Der Messbereich liegt zwischen 0 und 5.000 U/l.

Hochdosiseffekt: Unterhalb von 200.000 U/l tritt kein Hochdosiseffekt auf.

Reproduzierbarkeit: Für Proben über 300 U/l beträgt die Intra-Assay-Abweichung (Intra-Assay % VK) $\leq 10\%$, die Inter-Assay-Abweichung (Inter-Assay % VK) beträgt $\leq 10\%$ und die Gesamtabweichung beträgt $\leq 10\%$.

Empfindlichkeit: Die nachweisbare Mindestkonzentration von K18 in M65 EpiDeath® ELISA liegt bei 25 U/l. Sie ist definiert als die K18-Konzentration, die dem Absorptionswert der zweifachen Standardabweichung vom Absorptionswert des Standard A (0 U/l) entspricht.

Wiederfindung: Wiederfindung vom hohem Standard in menschlichen Blutproben: 105 % (Durchschnitt) und 91 – 122 % (Bereich).

Linearität/Verdünnung: Wiederfindung von menschlichem Serum bei einer Verdünnung im M65 EpiDeath Standard A (0 U/l): 95 % (Durchschnitt) und 88 – 101 % (Bereich). Wiederfindung von menschlichem Serum bei Verdünnung im Blutspenderserum: 93 % (Durchschnitt) und 82 – 101 % (Bereich).

Referenzbereich: Im Serum von 200 schwedischen Blutspendern lagen der Medianwert bei 62 U/l und das 95. Perzentil bei 266 U/l. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich festlegt.

Rückverfolgbarkeit des Standards

Die mit M65 EpiDeath® ELISA gemessenen Einheiten sind in Bezug auf Serumproben definiert, zu denen natives Antigen zugegeben wurde. Das native Antigen wird in Bezug auf einen rekombinanten Proteinstandard kalibriert. **Achtung!** Infolge der unterschiedlichen Testpuffer kann Standardmaterial nicht zwischen unterschiedlichen Peviva-Kits ausgetauscht werden.

Interne Qualitätskontrolle

Die mitgelieferten M65 EpiDeath Control Low und High mit ihren jeweiligen Konzentrationen sollten für die Gewährleistung der Funktionalität des Tests ausreichen. Bei jeder Messung sind zwei Kontrollen mitzuführen.

Ist diese Vorgehensweise nicht ausreichend, muss das Labor seine eigenen Kontrollen an Hand der Richtlinien in Abschnitt „Gewinnung und Handhabung von *in vitro*-Proben nur für die Forschung“ oder durch individuelle

Laborroutinen herstellen. Diese Kontrollen müssen in aliquoten Mengen eingefroren werden und sind bei jeder Messung gleich zu behandeln.

Grenzen der Methode

Der klinische Nutzen der Messung von K18 in menschlichen Blutproben als prognostischer Indikator und in der Patientenbetreuung während der Therapie ist nicht vollständig verifiziert.

Stark lipämische (≤ 1.250 mg/dl), ikterische ($\leq 12,5$ mg/dl) oder hämolytische (≤ 50 mg/dl) Proben beeinflussen die Messung nicht.

Literaturhinweise

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.

Weitere Literaturhinweise finden Sie auf unserer Webseite unter www.VLVbio.com/literature.

Haftung

Die hier beschriebenen Leistungsangaben wurden mit dem oben genannten Verfahren erhalten. Jede Abweichung oder Modifikation von diesem durch den Hersteller empfohlenen Verfahren kann die Ergebnisse beeinflussen. In diesem Fall lehnt der Hersteller die Haftung aller ausdrücklichen, implizierten oder gesetzlichen Gewährleistungen ab, einschließlich der gesetzlichen Gewährleistung der Marktfähigkeit und der Gebrauchstauglichkeit. In diesem Fall können der Hersteller und seine autorisierten Vertriebshändler nicht für indirekte oder Folgeschäden haftbar gemacht werden.

Mode d'emploi du test M65 EpiDeath® ELISA

Sommaire

Explication des symboles utilisés sur les étiquettes	42
Marques déposées	42
Transport et conservation	42
Description du test	43
Utilisation prévue	43
Résumé et concept du test	43
Principe de la méthode	44
Matériel fourni pour 96 mesures	44
Matériel requis mais non fourni	45
Protocole du test	45
Avertissements et précautions	45
Collecte et préparation des spécimens sanguins	46
Collecte et préparation des échantillons <i>in vitro</i> uniquement à usage de recherche	46
Préparation des composants	47
Conservation et durée de vie après première ouverture.	47
Méthode d'analyse	48
Schéma	49
Calcul des résultats du test	49
Performance du test	50
Caractéristiques de performance	50
Traçabilité de l'étalon	50
Contrôle interne de qualité	50
Limites de la procédure	51
Références	51
Garantie	51

Fr

Explication des symboles utilisés sur les étiquettes



Référence du catalogue



Contenu suffisant pour "n" tests



Code du lot



Fabricant



Limites de température



Utiliser jusque



Consulter les instructions d'utilisation

Marques déposées

M30[®], M30 Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] et PEVIVA[®] sont des marques déposées de VLVbio AB.

Transport et conservation

M65 EpiDeath[®] ELISA doit être transporté au froid et conservé entre 2 et 8 °C.
Remarque ! Ne pas congeler !

Description du test

Utilisation prévue

M65 EpiDeath® ELISA est un test immunologique *in vitro* en une seule étape permettant de mesurer le taux de kératine 18 (K18) sérique ou plasmatique.

Résumé et concept du test

La K18 extracellulaire peut être utilisée comme marqueur de mort cellulaire pour les cellules épithéliales. Au cours de la nécrose, la perte d'intégrité de la membrane cellulaire se traduit par la libération de protéines intracellulaires, y compris K18, dans le compartiment extracellulaire. L'apoptose représente une forme active de mort cellulaire qui préserve initialement l'intégrité de la membrane plasmique mais souvent suivie de nécrose secondaire à l'endroit où sont libérées les composantes intracellulaires. Le test M65 EpiDeath® ELISA mesure l'ensemble de la K18 soluble libérée par les cellules mortes (par nécrose et apoptose). Les mesures faites par le test M65 EpiDeath® ELISA à partir du surnageant de cultures cellulaires ou d'échantillons sériques/plasmatiques humains représenteront par conséquent le taux global de mort cellulaire de cellules épithéliales, toutes causes confondues (réf. 1).

Au cours de l'apoptose, K18 est clivée par des caspases. Le test M30 Apoptosense® ELISA (PEVIVA no. prod. 10011 ; réf. 2) permet de mesurer spécifiquement le taux de fragments de K18 clivés par les caspases (cck18) et contenant le néo-épitope K18Asp396. L'association des tests M30 Apoptosense® ELISA et M65 EpiDeath® ELISA facilite par conséquent la détermination du type de mort cellulaire *in vitro* et dans le sérum ou le plasma de patients (réf. 1, 3, 4).

M65 EpiDeath® ELISA fait appel à deux anticorps monoclonaux murins (les clones M5, IgG2b, et M6, IgG2a) spécifiques pour des épitopes conventionnels de K18. L'anticorps M5 détecte la K18 humaine, mais ne réagit pas avec la K18 de souris (réf. 4). M65 EpiDeath® ELISA détectera spécifiquement la mort de cellules tumorales chez des souris porteuses de xénogreffes de tumeurs humaines (réf. 4).

M65 EpiDeath® ELISA est utilisé pour la recherche et dans le cadre d'études cliniques dans les domaines de l'oncologie, de l'hépatologie, de la transplantation et en cas de sepsie.

Fr

Principe de la méthode

M65 EpiDeath® ELISA est un test immunologique enzymatique de type sandwich sur phase solide. Les étalons, les témoins et les échantillons réagissent avec l'anticorps de capture M5 sur phase solide, dirigé contre K18, et l'anticorps M6 conjugué au HRP (peroxidase de raifort) dirigé contre un autre épitope de K18. Tout conjugué non lié est éliminé par une étape de lavage. Le TMB Substrate est ajouté. Le développement de la couleur est arrêté et l'absorbance est alors mesurée. La couleur obtenue est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte.

La courbe de référence obtenue à partir de concentrations connues et des mesures d'absorbance correspondantes permet de calculer la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. La concentration d'antigène est exprimée en unités par litre (U/l).

Matériel fourni pour 96 mesures

M65 Coated Microstrips : Une microplaque, 12 barrettes de 8 puits chacune, soit un total de 96 puits secs. Les puits sont tapissés d'anticorps monoclonal de souris anti-K18 "M5". La microplaque est hermétiquement enveloppée dans un sachet d'aluminium contenant un desséchant. Si toutes les barrettes ne sont pas utilisées, refermer le sachet hermétiquement en gardant le desséchant à l'intérieur. *Prêt à l'emploi !*

M65 EpiDeath Conjugate : Concentré (24 x conc.). Un flacon contenant 0,4 ml d'anticorps monoclonal de souris "M6" conjugué à de la peroxidase de raifort (HRP) dans un tampon phosphate additionné de protéines stabilisantes. Conservateur ajouté. Doit être dilué avec le tampon M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. *Remarque !* Ne pas exposer à la lumière !

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer : Une ampoule contenant 12 ml de tampon phosphate additionné de protéines stabilisantes pour la dilution du M65 EpiDeath Conjugate. Conservateur ajouté. De couleur bleue.

M65 EpiDeath Standard A – H : Standard A contenant 2,5 ml de tampon phosphate additionné de sérum de veau fœtal (SVF). Standard B – H, 0,6 ml chacun, contenant un échantillon étalon dans du tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des Standard A – H sont de 0, 200, 400, 800, 1 200, 2 000, 3 000 et 5 000 U/l, respectivement. Conservateur ajouté. De couleur jaune. *Prêt à l'emploi !* Le Standard A peut être utilisé pour la dilution d'échantillons > 5 000 U/l.

M65 EpiDeath Control Low & High : Deux ampoules contenant 0,6 ml de réactifs dans du tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des M65 EpiDeath Control Low & High sont 300 ± 60 U/L et 2500 ± 500 U/L, respectivement. Conservateur ajouté. De couleur jaune. *Prêt à l'emploi !*

Wash Tablet : Une pastille pour 500 ml de solution de lavage préparée. Dissoudre la Wash Tablet dans 500 ml d'eau fraîche déionisée.

TMB Substrate : Un flacon contenant 22 ml de solution de TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine). *Remarque !* Ne pas exposer à la lumière ! *Prêt à l'emploi !*

Stop Solution : Un flacon contenant 8 ml d'acide sulfurique à 1,0 M. *Prêt à l'emploi !*

Ruban adhésif : Une (1) feuille.

Mode d'emploi

Certificat d'analyse

Matériel requis mais non fourni

- Lecteur de microplaques (longueur d'onde de 450 nm ; linéarité de 0 – 3 OD)
- Agitateur de microplaques (oscillation : 600 rpm ; orbite : 1,5-4 mm)
- Laveur de microplaques 96 puits ou pipette multicanaux (volume 250 µl)
- Mixer Vortex
- Pipettes de précision : 25, 50, 75 et 200 µl
- Éprouvette graduée (500 ml)
- Eau déionisée

Fr

Protocole du test

Avertissements et précautions

1. Le kit M65 EpiDeath® ELISA est uniquement destiné à un usage *in vitro*.
2. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kit.
3. Tous les échantillons de patients doivent être considérés comme contagieux et donc manipulés et éliminés conformément à la réglementation applicable.
4. Ne pas utiliser d'échantillons contaminés.
5. La Stop Solution contient de l'acide sulfurique à 1,0 M, susceptible de provoquer une irritation de la peau et néfaste pour les yeux. En cas de contact, laver abondamment avec de l'eau et demander l'avis d'un médecin.
6. Les feuilles de sécurité (SDS) sont disponibles sur le site www.VLVbio.com ou sur demande.

Collecte et préparation des spécimens sanguins

Le volume de l'échantillon doit être suffisant pour mesurer chaque échantillon en duplicat (volume d'analyse : $2 \times 25 \mu\text{l}$). Les donneurs ne sont pas tenus d'être à jeun pour la prise de sang.

Sérum : Prélever le sang par ponction veineuse, dans des tubes secs (sans anti-coagulant), en prenant soin d'éviter toute hémolyse, puis laisser coaguler et recueillir le sérum après centrifugation.

Plasma : M65 EpiDeath® ELISA peut aussi être utilisé pour des échantillons de plasma (EDTA, héparine ou citrate).

Remarque ! Le même type d'échantillon (sérum ou plasma recueilli par une méthode donnée) doit être utilisé pour un projet donné. Pour plus d'informations sur la performance du test M65 EpiDeath® ELISA à partir de différents types d'échantillons, veuillez consulter le site www.VLVbio.com.

Les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant un maximum de 4 heures. Pour conserver les échantillons plus longtemps, congeler à une température inférieure ou égale à -20 °C. Les échantillons peuvent être congelés-décongelés sans perte d'activité (réf. 3, 5) mais il est recommandé d'éviter toute congélation-décongélation répétée. Pour la dilution des échantillons, voir les sections "Préparation des composants" et "Caractéristiques de performance".

Collecte et préparation des échantillons *in vitro* uniquement à usage de recherche

Le calcul des rapports M30:M65 n'est recommandé que pour les échantillons $\geq 300 \text{ U/l}$.

Jour 1 : Semer les cellules. La densité d'ensemencement doit être déterminée pour le type de cellules en question et pour le type d'agent cytotoxique ; 5 000 – 10 000 cellules par puits donnent en général une densité adaptée pour une microplaque 96 puits.

Jour 2 : Laver les cellules une fois avec du PBS et ajouter du milieu frais (200 μl /puits). Exposer les cellules à l'agent ou aux agents de votre choix.

Jour 2 – 4 : Recueillir le milieu de l'échantillon dans chaque puits. Afin d'éviter les effets de dessèchement, il est recommandé de ne pas faire plusieurs prélèvements à partir d'un même puits. Centrifuger le milieu et recueillir le surnageant sans cellules. *Remarque !* Éviter de recueillir des cellules. Utiliser deux échantillons de 25 μl chacun de surnageant sans cellules pour chaque test.

Si le test doit être effectué le même jour, les échantillons peuvent être conservés entre 2 et 8 °C. Les échantillons à analyser ultérieurement devront

être conservés à une température inférieure ou égale à -20 °C. Eviter toute congélation-décongélation répétée.

Préparation des composants

Dilution du M65 EpiDeath Conjugate

Diluer le M65 EpiDeath Conjugate avec le tampon M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. Le flacon de M65 EpiDeath Conjugate contient exactement 0,4 ml. Ajouter 9,2 ml de M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer directement au flacon de M65 EpiDeath Conjugate, puis mélanger.

Dissolution de la pastille Wash Tablet

Dissoudre une pastille Wash Tablet dans 500 ml d'eau fraîche déionisée.

Dilution des échantillons

Les échantillons plus concentrés que le Standard H (5 000 U/l) devront être dilués avec le Standard A ou du sérum de donneurs. Puisque la dilution est linéaire dans le test, la concentration d'origine est calculée en multipliant la concentration mesurée par le facteur de dilution. Au cas où du sérum ou du plasma de donneurs aurait été utilisé pour diluer l'échantillon, leur taux devra être pris en compte.

Fr

Conservation et durée de vie après première ouverture.

Si le kit n'est pas entièrement utilisé, conserver les réactifs dans leur emballage d'origine entre 2 et 8 °C. Si toutes les barrettes n'ont pas été utilisées, refermer hermétiquement le sachet de barrettes de microtitration. Ne pas oublier d'inclure le desséchant.

Le TMB Substrate et le M65 EpiDeath Conjugate sont sensibles à la lumière et aux ions métaux et doivent toujours être conservés dans les bouteilles ambrées d'origine à 2 – 8 °C entre deux utilisations. Si un autre récipient est utilisé, celui-ci devra être protégé de la lumière ! Le TMB Substrate ne peut plus être utilisé après avoir été exposé à la lumière.

Si le kit est utilisé à plusieurs reprises, conserver le M65 EpiDeath Conjugate dilué dans le flacon à 2 – 8 °C. Ne pas exposer à la lumière. La solution diluée de M65 EpiDeath Conjugate est stable pendant 1 semaine si conservée à 2 – 8 °C ou pendant 4 semaines si congelée à une température inférieure ou égale à -20 °C.

Conservée à 2 – 8 °C, la solution de la pastille Wash Tablet reste stable pendant 5 semaines.

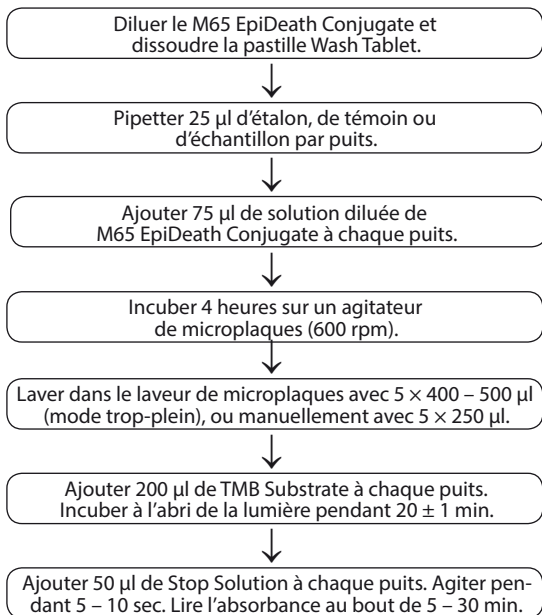
Méthode d'analyse

Le test M65 EpiDeath® ELISA doit être effectué à température ambiante (24 ± 3 °C).

1. Laisser les réactifs atteindre la température ambiante avant d'effectuer le test. Mélanger tous les réactifs au Vortex avant utilisation.
2. Diluer la Wash Tablet avec de l'eau fraîche déionisée (voir "Préparation des composants").
3. Diluer le M65 EpiDeath Conjugate avec le tampon M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer (voir "Préparation des composants") puis mélanger.
4. Pipetter 25 µl de M65 EpiDeath Standard (A – G), de M65 EpiDeath Control Low, de M65 EpiDeath Control High ou d'échantillon par puits (il est recommandé de faire des duplicats).
5. Ajouter 75 µl de la solution diluée de M65 EpiDeath Conjugate à chaque puits. *Remarque ! Les étapes 4 et 5 doivent être exécutées de manière séquentielle sans interruption, dans un délai de 20 minutes.*
6. Couvrir les puits avec du film adhésif ou un couvercle de microplaque.
7. Incuber 4 heures sur un agitateur. Réglage de la vitesse : 600 rpm.
8. Laver la plaque cinq fois dans un laveur de microplaques avec 400 – 500 µl de solution de lavage préparée par puits (lavage en mode trop-plein)
ou
Laver la plaque manuellement, en éliminant la solution d'incubation puis en lavant les puits 5 fois avec 250 µl de solution de lavage préparée. Eviter toute contamination entre les puits.
9. Ajouter 200 µl de TMB Substrate à chaque puits. Incuber à l'abri de la lumière à température ambiante pendant 20 ± 1 minutes.
10. Ajouter 50 µl de Stop Solution à chaque puits. Afin de s'assurer que le TMB Substrate et la Stop Solution sont bien mélangés, agiter la microplaque pendant 5 – 10 secondes. Laisser reposer la microplaque pendant 5 minutes avant de lire l'absorbance.
11. Déterminer l'absorbance à 450 nm dans un lecteur de microplaques, dans un délai de 30 minutes, et enregistrer les résultats.
12. Calculer les résultats comme indiqué dans la section "Calcul des résultats du test".

Remarque ! Le temps d'incubation pour le test M65 EpiDeath® ELISA est de **4 heures !**

Schéma



Fr

Calcul des résultats du test

Les résultats du test M65 EpiDeath® ELISA sont calculés à l'aide d'une méthode assistée par ordinateur. Mesurer les valeurs des témoins et des échantillons à l'aide d'un programme adapté à la manipulation de données de type ELISA. Algorithme d'ajustement : Fonction cubic spline. Abscisse : concentration (U/l) ; Ordonnée : absorbance à 450 nm (A450).

Remarque ! Si les échantillons ont été dilués, la concentration mesurée doit être multipliée par le facteur de dilution. Dans le cas où du sérum/plasma de donneurs aurait été utilisé comme diluant, leur taux doit être pris en compte.

Performance du test

Caractéristiques de performance

Plage de mesure : La plage de mesure est de 0 – 5 000 U/l.

Effet de concentration élevée : Aucun effet de concentration élevée n'est observé jusqu'à 200 000 U/l.

Reproductibilité : La variation intra essai (% CV intra essai) est $\leq 10\%$, la variation inter essai (% CV inter essai) est $\leq 10\%$ et la variation totale est $\leq 10\%$ pour les échantillons > 300 U/l.

Sensibilité : La concentration minimale détectable de K18 dans le test M65 EpiDeath® ELISA est de 25 U/l, définie comme étant la concentration de K18 correspondant à l'absorbance à deux écarts-types supérieur de l'absorbance du Standard A (0 U/l).

Recouvrement d'échantillons dopés : Recouvrement d'étalon de concentration élevée utilisé pour doper des échantillons de sang humain : 105 % (moyenne) et 91 – 122 % (plage).

Linéarité/Dilution : Recouvrement de sérums humains dilués dans l'étalon M65 EpiDeath Standard A (0 U/l) : 95 % (moyenne) et 88 – 101 % (plage). Recouvrement de sérums humains dilués avec du sérum de donneurs : 93 % (moyenne) et 82 – 101 % (plage).

Plage de référence : Pour le sérum de 200 donneurs suédois, la médiane était de 62 U/l et le 95^{ème} centile était de 266 U/l. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de référence.

Traçabilité de l'étalon

Les unités mesurées par le test M65 EpiDeath® ELISA sont définies par rapport à l'antigène natif utilisé pour doper du sérum. L'antigène natif est calibré par rapport à un échantillon étalon de protéine recombinante. **Remarque !** En raison des différences de tampons, les étalons ne peuvent pas être échangés entre les différents kits de tests Peviva.

Contrôle interne de qualité

Le M65 EpiDeath Control Low et High fournis avec leurs concentrations devraient suffire pour assurer la bonne performance du test et devront être utilisés en duplicats chaque fois qu'un test est effectué.

Si cette procédure ne suffit pas, chaque laboratoire devra établir ses propres témoins selon les recommandations de la section "Collecte et préparation des échantillons *in vitro* uniquement à usage de recherche" ou en fonction des habitudes de chaque laboratoire. Ces témoins doivent être congelés en aliquotes et traités de la même manière chaque fois que le test est effectué.

Limites de la procédure

L'utilité clinique des mesures de K18 dans des échantillons de sang humain en tant qu'indicateurs de pronostic et pour la prise en charge de patients sous protocoles thérapeutiques n'a pas été pleinement établie.

Les échantillons extrêmement lipémiques ($\leq 1\,250$ mg/dl), ictériques ($\leq 12,5$ mg/dl) ou hémolysés (≤ 50 mg/dl) ne causent pas d'interférence dans ce test.

Références

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.

Pour de plus amples références, veuillez consulter www.VLVbio.com/literature.

Garantie

Les données de performance présentées ici ont été obtenues par la procédure indiquée. Tout changement ou toute modification de la procédure recommandée par le fabricant est susceptible d'affecter les résultats. Dans cette éventualité, le fabricant renonce à toute garantie explicite, implicite ou statutaire, y compris la garantie implicite à la commercialisation et l'adéquation à une utilisation donnée. Dans cette éventualité, le fabricant et ses distributeurs agréés ne sauront être tenus pour responsables de dommages directs ou indirects.

Istruzioni per l'uso di ELISA M65 EpiDeath®

Indice

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette	54
Marchi	54
Trasporto e conservazione	54
Descrizione del test	55
Scopo proposto	55
Sommaro e spiegazione del test	55
Principio del procedimento	56
Reagenti forniti per 96 determinazioni	56
Materiale occorrente non incluso	57
Procedimento del test	57
Precauzioni e avvertenze	57
Prelievo e preparazione dei campioni di sangue	58
Prelievo e preparazione dei campioni <i>in vitro</i> solo per uso ricerca	58
Preparazione del componente	59
Conservazione e durata dopo la prima apertura	59
Procedimento del test	60
Schema del procedimento	61
Calcolo dei risultati analitici	61
Prestazioni del test	62
Caratteristiche delle prestazioni	62
Tracciabilità dello standard	62
Controllo di qualità interno	62
Limitazioni del procedimento	63
Letteratura di riferimento	63
Garanzia	63

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette



Numero di catalogo



Contenuto sufficiente per "n" saggi



Codice del lotto



Fabbricante



Limiti di temperatura



Utilizzare entro



Consultare le istruzioni per l'uso

Marchi

M30®, M30 Apoptosense®, M65®, EpiDeath® e PEVIVA® sono marchi registrati di VLVbio AB.

Trasporto e conservazione

Il kit ELISA M65 EpiDeath® viene spedito in condizioni di raffreddamento e deve essere conservato ad una temperatura tra i 2 – 8 °C. *Nota!* Non congelare!

Descrizione del test

Scopo proposto

ELISA M65 EpiDeath® è un metodo immunologico diretto *in vitro* per la determinazione quantitativa della cheratina solubile 18 (K18) nel siero e nel plasma.

Sommario e spiegazione del test

La K18 extracellulare può essere utilizzata come marcatore della morte delle cellule epiteliali. Durante la necrosi, la perdita dell'integrità della membrana cellulare avrà come conseguenza il rilascio di proteine intracellulari, compresa la K18, nel compartimento extracellulare. L'apoptosi rappresenta una forma attiva di morte cellulare che inizialmente conserva l'integrità della membrana del plasma, ma che è generalmente seguita da una necrosi secondaria nella quale vengono rilasciati componenti intracellulari. Il test ELISA M65 EpiDeath® quantifica la K18 solubile totale rilasciata dalle cellule morte (necrotiche e apoptotiche). Le misurazioni dei campioni da sovrinatanti di colture cellulari o da siero/plasma umano con il kit ELISA M65 EpiDeath® illustrano dunque la morte totale delle cellule epiteliali per qualsiasi causa (ref. 1).

La K18 viene scissa dalle caspasi durante l'apoptosi. Il test ELISA M30 Apoptosense® (n. prod. PEVIVA 10011; ref.2) misura in modo specifico il livello dei frammenti solubili tagliati dalla caspasi della K18 (ccK18) contenenti il neoepitopo K18Asp396. La combinazione di ELISA M30 Apoptosense® e ELISA M65 EpiDeath® di facilita dunque la determinazione della modalità di morte cellulare *in vitro* e in siero o plasma di pazienti (ref. 1, 3, 4).

ELISA M65 EpiDeath® utilizza due anticorpi monoclonali di topo (clone M5, IgG2b e M6, IgG2a) specifici per epitopi convenzionali della K18. L'anticorpo M5 rileva la K18 umana, ma non reagisce con la K18 del topo (ref. 4). ELISA M65 EpiDeath® rileverà in modo specifico la morte delle cellule tumorali nei topi portatori di tumore umano xeno trapiantato (ref. 4).

ELISA M65 EpiDeath® è previsto per la ricerca e la sperimentazione clinica nei campi dell'oncologia, epatologia, trapianti e sepsi.

Principio del procedimento

ELISA M65 EpiDeath® è un test immunoenzimatico tipo 'sandwich' in fase solida. Gli standard, i controlli e i campioni reagiscono con un anticorpo di cattura "M5" in fase solida, diretto contro K18, e con l'anticorpo M6 coniugato con HRP (perossidasi di rafano), diretto contro un epitopo diverso della K18. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge il substrato TMB. Si blocca lo sviluppo del colore e si legge l'assorbanza. Il colore risultante è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita.

La quantità di antigene nel campione può essere calcolata da una curva standard sulla quale sono riportate concentrazioni note in funzione dell'assorbanza misurata. La concentrazione dell'antigene è espressa in unità per litro (U/l).

Reagenti forniti per 96 determinazioni

M5 Coated Microstrips: Una micropiastra, 12 strisce con 8 pozzetti ciascuna, 96 pozzetti asciutti in tutto. I pozzetti sono rivestiti di anticorpo monoclonale K18 di topo, "M5". La micropiastra è chiusa ermeticamente in una busta di alluminio, contenente un essiccante. Se non si usano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta, senza rimuovere l'agente essiccante.
Pronto per l'uso!

M65 EpiDeath Conjugate: Concentrato (24 × conc.). Una fiala contenente 0,4 ml di anticorpo monoclonale M6 di topo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) in tampone fosfato con stabilizzante di proteine. Conservanti aggiunti. Deve essere diluito con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer.
Nota! Non esporre alla luce!

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer: Una fiala contenente 12 ml di tampone fosfato con stabilizzanti di proteine per la diluizione di M65 EpiDeath Conjugate. Conservanti aggiunti. Di colore blu.

M65 EpiDeath Standard A – H: Lo Standard A contenente 2,5 ml di tampone fosfato con siero fetale bovino. Gli Standard B – H, 0,6 ml ciascuno, contengono materiale standard in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori degli Standard A – H sono 0, 200, 400, 800, 1.200, 2.000, 3.000 e 5.000 U/l, rispettivamente. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!* Lo Standard A può essere utilizzato per diluizioni dei campioni > 5.000 U/l.

M65 EpiDeath Control Low & High: Due fiale contenenti 0,6 ml di componenti reattivi in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori dei M65 EpiDeath Control Low e M65 EpiDeath Control High sono 300 ± 60 U/L e 2500 ± 500 U/L, rispettivamente. Conservanti aggiunti. Di colore giallo.
Pronto per l'uso!

Wash Tablet : Una pastiglia per 500 ml di wash solution preparata. Dissolvere la Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

TMB Substrate: Una bottiglia contenente 22 ml di soluzione TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). *Nota!* Non esporre alla luce! *Pronto per l'uso!*

Stop Solution: Una fiala contenente 8 ml di 1,0 M acido solforico. *Pronto per l'uso!*

Sealing Tape: Un (1) foglio.

Istruzioni per l'uso.

Certificato di analisi.

Materiale occorrente non incluso

- Lettore di micropiastre (lunghezza d'onda 450 nm, densità ottica lineare da 0 – 3)
- Agitatore per micropiastre (oscillazioni: 600 rpm; orbita: 2 mm)
- Dispositivo per il lavaggio di micropiastre a 96 pozzetti o pipetta multicanale (volume 250 µl)
- Scuotitore Vortex
- Pipette di precisione: 25, 50, 75 e 200 µl
- Cilindro graduato (500 ml)
- Acqua deionizzata

It

Procedimento del test

Precauzioni e avvertenze

1. Il kit ELISA M65 EpiDeath® è previsto unicamente per l'uso *in vitro*.
2. Non mescolare i reagenti di differenti lotti del kit.
3. Tutti i campioni prelevati da pazienti devono essere considerati come contagiosi e quindi manipolati ed eliminati in modo appropriato.
4. Non usare campioni contaminati.
5. La Stop Solution contiene acido solforico 1,0 M che causa irritazione alla pelle ed è dannoso per gli occhi. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
6. Le schede di sicurezza (SDS) sono disponibili al sito www.VLVbio.com o su richiesta.

Prelievo e preparazione dei campioni di sangue

Il volume del campione dovrebbe essere sufficiente per misurare ogni campione in duplicato (volume del test $2 \times 25 \mu\text{l}$). I donatori non devono essere a digiuno prima del prelievo di sangue.

Siero: Conservare il sangue venoso prelevato, evitando l'emolisi, in provette normali (senza anticoagulante), consentire al sangue di coagularsi e prelevare il siero dopo la centrifugazione.

Plasma: ELISA M65 EpiDeath® può essere usato anche per campioni di plasma (EDTA, eparina o citrato).

Nota! Lo stesso tipo di materiale, per esempio siero o plasma prelevato con lo stesso metodo, dovrebbe essere usato per un progetto specifico. Per ulteriori informazioni sulle prestazioni di ELISA M65 EpiDeath® con diversi tipi di campione, si prega di consultare www.VLVbio.com.

Conservare i campioni a $2 - 8^\circ\text{C}$ fino a 4 ore. Per periodi più lunghi, conservare i campioni congelati a -20°C o a temperature inferiori. I campioni possono essere congelati-scongelati senza perdita di attività (ref. 3, 5), ma si raccomanda di evitare cicli ripetuti e non necessari di ricongelamento-scongelamento. Per la diluizione dei campioni, si vedano le sezioni "Preparazione del componente" e "Caratteristiche delle prestazioni".

Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca

Il calcolo del rapporto M30:M65 è consigliato solo per campioni $\geq 300 \text{ U/l}$.

Giorno 1: Piastrare le cellule. La densità iniziale deve essere determinata per ogni tipo di cellula e agente citotossico; solitamente, sono sufficienti 5.000 – 10.000 cellule per pozzetto in una piastra da 96 pozzetti.

Giorno 2: Lavare le cellule una sola volta con PBS e aggiungere mezzo fresco (200 μl /pozzetto). Esporre le cellule all'agente (o agli agenti) desiderato (i).

Giorno 2 – 4: Prelevare il mezzo del campione da ogni pozzetto. Per evitare che il pozzetto vada a secco, si sconsiglia di prelevare più campioni dallo stesso pozzetto. Centrifugare il mezzo e prelevare il sovranatante privo di cellule. *Nota!* Evitare di prelevare cellule. Per ogni test si usano campioni di $2 \times 25 \mu\text{l}$ di sovranatante privo di cellule.

Se il saggio viene eseguito lo stesso giorno, i campioni possono essere conservati a $2 - 8^\circ\text{C}$. I campioni che verranno analizzati in un secondo tempo devono essere conservati a -20°C o a temperature inferiori. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.

Preparazione del componente

Diluizione di M65 EpiDeath Conjugate

Diluire M65 EpiDeath Conjugate con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. Una fiala di M65 EpiDeath Conjugate contiene esattamente 0,4 ml di prodotto. Aggiungere 9,2 ml di M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer direttamente alla fiala di M65 EpiDeath Conjugate, quindi miscelare.

Dissoluzione della Wash Tablet

Dissolvere una Wash Tablet in 500 ml di acqua fresca deionizzata.

Diluizione dei campioni

I campioni superiori allo Standard H (5 000 U/l) devono essere diluiti con lo Standard A o con il siero di un donatore. Siccome la diluizione nel test è lineare, la concentrazione originale viene calcolata moltiplicando la concentrazione misurata per il fattore di diluizione. Nel caso sia stato utilizzato siero/plasma di un donatore, bisogna tener conto della concentrazione del donatore.

Conservazione e durata dopo la prima apertura

Se non si utilizza l'intero kit, conservare i reagenti nei loro contenitori originali a 2 – 8 °C. Se non si utilizzano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta di microstrisce. Ricordarsi di includere l'essiccante.

TMB Substrate e M65 EpiDeath Conjugate sono sensibili alla luce e agli ioni metallici e devono essere costantemente conservati nelle bottiglie ambrate originali a 2 – 8 °C, quando non sono usati. Se si utilizza un nuovo contenitore, questo deve essere protetto dalla luce! TMB Substrate non può essere utilizzato dopo l'esposizione alla luce.

Se il kit viene utilizzato più volte, conservare M65 EpiDeath Conjugate diluito nella fiala a 2 – 8 °C. Non esporre alla luce. La soluzione diluita di M65 EpiDeath Conjugate è stabile per 1 settimana su conservare a 2 – 8 °C o per 4 settimane su congelati a -20 °C o a temperature inferiori.

La soluzione preparata della Wash Tablet rimane stabile per 5 settimane se conservata a 2 – 8 °C.

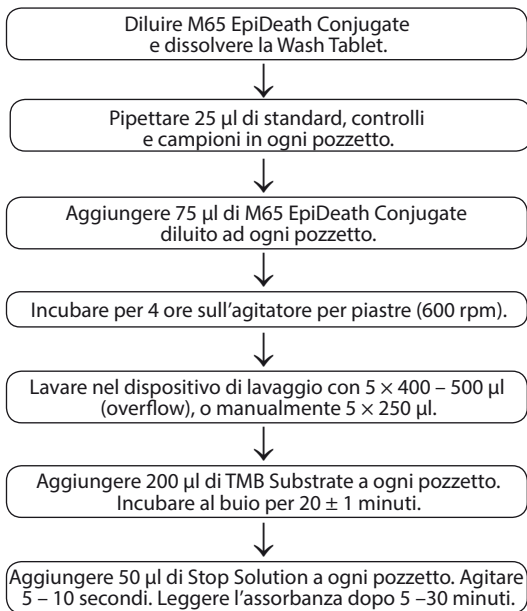
Procedimento del test

Il test con ELISA M65 EpiDeath® deve essere eseguito a temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Tutti i reagenti devono essere a temperatura ambiente prima di eseguire il test. Agitare tutti i reagenti con scuotitore Vortex prima dell'uso.
2. Dissolvere la Wash Tablet in acqua fresca deionizzata (vedi "Preparazione del componente").
3. Diluire M65 EpiDeath Conjugate con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer e mescolare (vedi "Preparazione del componente").
4. Pipettare 25 μ l di M65 EpiDeath Standard (A – H), M65 EpiDeath Control Low, M65 EpiDeath Control High e campione per pozzetto (si raccomandano duplicati).
5. Aggiungere 75 μ l della soluzione diluita di M65 EpiDeath Conjugate a ogni pozzetto. *Nota! I passaggi 4 e 5 dovrebbero essere eseguiti sequenzialmente senza interruzioni, entro 20 minuti.*
6. Coprire i pozzetti con del nastro sigillante o un coperchio apposito per micropiastre.
7. Incubare sull'agitatore per quattro (4) ore. Velocità di agitazione: ~ 600 rpm.
8. Lavare cinque volte la piastra nell'apposito dispositivo di lavaggio delle micropiastre con 400 – 500 μ l di wash solution per pozzetto (lavaggio overflow)
oppure
Lavare la piastra manualmente, scartando la soluzione di incubazione e lavando i pozzetti cinque volte con 250 μ l di wash solution preparata. Evitare contaminazioni tra i pozzetti.
9. Aggiungere 200 μ l di TMB Substrate a ogni pozzetto. Incubare al buio e a temperatura ambiente per 20 ± 1 minuti.
10. Aggiungere 50 μ l di Stop Solution a ogni pozzetto. Per consentire la miscelazione completa di TMB Substrate con Stop Solution, agitare la micropiastra per 5 – 10 secondi. Attendere 5 minuti prima di procedere alla lettura dell'assorbanza.
11. Entro 30 minuti, determinare l'assorbanza a 450 nm mediante un lettore di micropiastre e prendere nota dei risultati.
12. Calcolare i risultati come descritto nella sezione "Calcolo dei risultati analitici".

Nota! Il tempo di incubazione in ELISA M65 EpiDeath® è 4 ore!

Schema del procedimento



It

Calcolo dei risultati analitici

I risultati del test ELISA M65 EpiDeath® vengono calcolati utilizzando dei metodi computerizzati. Calcolare i valori dei controlli e dei campioni con un programma adatto all'elaborazione dei dati del test ELISA. Algoritmo di approssimazione: Cubic Spline. Asse-x: concentrazione (U/l). Asse-y: assorbanza a 450 nm (A450).

Nota! Se i campioni sono stati diluiti, la concentrazione determinata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione e, nel caso sia stato utilizzato siero/plasma di un donatore, bisogna tener conto della concentrazione del donatore.

Prestazioni del test

Caratteristiche delle prestazioni

Intervallo di determinazione: L'intervallo di determinazione è 0 – 5.000 U/l.

Effetto dovuto a dose alta: Non è stato riscontrato alcun effetto da dose alta fino a 200.000 U/l.

Riproducibilità: La variazione all'interno di un test è $\leq 10\%$ (CV), la variazione tra test è $\leq 10\%$ (CV) e la variazione totale è $\leq 10\%$ per campioni > 300 U/l.

Sensibilità: La concentrazione minima misurabile di neoepitopo K18 con ELISA M65 EpiDeath® è 25 U/l, definita come la concentrazione di K18 corrispondente a un'assorbanza superiore di due deviazioni standard all'assorbanza dello Standard A (0 U/l).

Spiking recovery: Recupero dello standard alto quando introdotto nei campioni di sangue umano: 105 % (media) e 91 – 122 % (intervallo).

Linearità/Diluizione: Recupero da sieri umani diluiti in M65 EpiDeath Standard A (0 U/l): 95 % (media) e 88 – 101% (intervallo). Recupero da sieri umani diluiti in siero di donatori: 93 % (media) e 82 – 101 % (intervallo).

Intervallo di riferimento: Nel siero di 200 donatori svedesi, la mediana era di 62 U/l e il 95° percentile era 266 U/l. Si consiglia che ogni laboratorio definisca il proprio intervallo di riferimento.

Tracciabilità dello standard

Le unità determinate da ELISA M65 EpiDeath® sono definite contro antigene nativo introdotto nel siero. L'antigene nativo è calibrato contro uno standard di proteina ricombinante. *Nota!* A causa di buffer di test diversi, il materiale standard non può essere scambiato tra kit Peviva diversi.

Controllo di qualità interno

I M65 EpiDeath Control Low e High inclusi con le loro concentrazioni dovrebbero essere sufficienti per garantire la prestazione del test e dovrebbero essere impiegati in duplicato ogni volta che si esegue il test.

Se questo procedimento non fosse sufficiente, ciascun laboratorio deve stabilire i propri controlli, secondo quanto indicato alla sezione "Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca" o secondo le tecniche di routine del laboratorio. Tali controlli dovrebbero essere congelati in aliquote e trattati nello stesso modo ogni volta che si esegue il test.

Limitazioni del procedimento

L'utilità clinica della misurazione di K18 in campioni di sangue umano come indicatore prognostico e nella cura dei pazienti sottoposti a regimi di terapia non è stata completamente stabilita.

I campioni fortemente lipemici ($\leq 1\,250$ mg/dl), itterici ($\leq 12,5$ mg/dl) o emolizzati (≤ 50 mg/dl) non interferiscono con il test.

Letteratura di riferimento

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.

Per ulteriori informazioni, consultare il sito www.VLVbio.com/literature (in lingua inglese e tedesca).

Garanzia

I dati di prestazione presentati sono stati ottenuti usando il procedimento qui descritto. Qualsiasi cambiamento o modifica rispetto al procedimento raccomandato dal produttore potrebbe alterare i risultati. In tal caso, il produttore annulla qualsiasi garanzia esplicita, implicita o prevista per legge, inclusa la garanzia della commerciabilità e dell'idoneità del prodotto all'uso. In tale eventualità, il produttore e i suoi distributori autorizzati declinano ogni responsabilità per danni diretti o indiretti.

It

Instrucciones de uso del M65 EpiDeath® ELISA

Contenidos

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas	66
Marcas comerciales	66
Envío y almacenamiento	66
Descripción del análisis	67
Objetivo previsto	67
Resumen y explicación de la prueba	67
Principio del método	68
Materiales suministrados para 96 determinaciones	68
Materiales necesarios pero no incluidos	69
Protocolo del ensayo	69
Advertencias y precauciones	69
Obtención y preparación de muestras de sangre	70
Obtención y preparación de muestras <i>in vitro</i> para el uso en investigaciones exclusivamente	70
Preparación de los componentes	71
Almacenamiento y periodo de validez después de abrirlo por primera vez	71
Procedimiento de análisis	72
Flujograma	73
Cálculo de resultados analíticos	73
Funcionamiento del análisis	74
Características del rendimiento	74
Trazabilidad del estándar	74
Control de calidad interno	74
Limitaciones del método	75
Referencias bibliográficas	75
Garantía	75

Es

Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas



Número de catálogo



Contenido suficiente para <n> ensayos



Código del lote



Fabricante



Límite de temperatura



Fecha de caducidad



Consulte las instrucciones de uso

Marcas comerciales

M30®, M30 Apoptosense®, M65®, EpiDeath® y PEVIVA® son marcas comerciales registradas de VLVbio AB.

Envío y almacenamiento

El M65 EpiDeath® ELISA se envía en condiciones refrigeradas y debe almacenarse a entre 2 y 8 °C. *Nota:* ¡No congelar!

Descripción del análisis

Objetivo previsto

El M65 EpiDeath® ELISA es un inmunoanálisis *in vitro* de un paso para la determinación cuantitativa en suero y plasma de queratina 18 (K18) soluble.

Resumen y explicación de la prueba

La K18 extracelular se puede usar como marcador de la muerte celular epitelial. Durante la necrosis, la pérdida de la integridad de la membrana celular dará lugar a la liberación de proteínas intracelulares, incluyendo K18, en el compartimento extracelular. La apoptosis representa una forma activa de muerte celular que preserva inicialmente la integridad de la membrana plasmática, pero que va seguida normalmente de necrosis secundaria donde los componentes intracelulares son liberados. El análisis M65 EpiDeath® ELISA mide la K18 soluble total liberada de las células muertas (necróticas y apoptóticas). Las mediciones de sobrenadantes de cultivos celulares o las muestras séricas/plasmáticas humanas mediante M65 EpiDeath® ELISA representarán, por lo tanto, la muerte celular epitelial total por cualquier causa (ref. 1).

K18 es degradada por las caspasas durante la apoptosis. El análisis M30 Apoptosense® ELISA (producto de PEVIVA n.º 10011; ref. 2) mide específicamente el nivel de fragmentos de K18 degradada por caspasa (ccK18) que contienen el neoepítipo K18Asp396. La combinación de M30 Apoptosense® ELISA y M65 EpiDeath® ELISA facilita así la determinación del modo de muerte celular *in vitro* y en el suero o el plasma de los pacientes (ref. 1, 3, 4).

M65 EpiDeath® ELISA utiliza dos anticuerpos monoclonales murinos (clon M5, IgG2b y M6, IgG2a) específicos para los epítipos convencionales de K18. El anticuerpo M5 detecta la K18 humana, pero no reacciona a la K18 murina (ref. 4). M65 EpiDeath® ELISA detecta específicamente la muerte celular tumoral en ratones portadores de xenoinjertos tumorales humanos (ref. 4).

M65 EpiDeath® ELISA está concebido para el uso en ensayos de investigación y clínicos en los campos de la oncología, hepatología, trasplantes y sepsis.

Es

Principio del método

M65 EpiDeath® ELISA es un ensayo inmunoenzimático de tipo sándwich en fase sólida. Los estándares, los controles y las muestras reaccionan con M5, un anticuerpo receptor en fase sólida contra K18, y con el anticuerpo M5 contra un epítipo diferente de K18 conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante). El conjugado no unido se elimina en un paso de lavado. Se añade sustrato TMB. El desarrollo del color se detiene y se lee la absorbancia. El color resultante es directamente proporcional a la concentración del analito.

Representando una curva estándar a partir de las concentraciones conocidas frente a la absorbancia medida, se puede calcular la cantidad de antígeno que hay en la muestra. La concentración del antígeno se expresa en unidades por litro (U/l).

Materiales suministrados para 96 determinaciones

M5 Coated Microstrips: Una microplaca, 12 tiras con 8 pocillos cada una, 96 pocillos secos en total. Los pocillos están recubiertos con anticuerpo monoclonal K18 de ratón M5. La microplaca viene sellada dentro de una bolsa de aluminio que contiene un desecante. Si no se usan todas las tiras, vuelva a sellar la bolsa con el desecante dentro. *Listo para usar.*

M65 EpiDeath Conjugate: Concentrado (24 × conc). Un vial que contiene 0,4 ml de anticuerpo monoclonal M6 de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos. Conservante añadido. Debe diluirse con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. *Nota: ¡No exponer a la luz!*

M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer: Un vial que contiene 12 ml de amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos para la dilución del M65 EpiDeath Conjugate. Conservante añadido. De color azul.

M65 EpiDeath Standard A – H: El Standard A contiene 2,5 ml de tampón de fosfato con suero bovino fetal (SBF). Los Standard B – H, de 0,6 ml cada uno, contienen material estándar en suero bovino fetal con tampón de fosfato. Los valores de los Standard A – H son 0, 200, 400, 800, 1.200, 2.000, 3.000 y 5.000 U/l, respectivamente. Conservante añadido. De color amarillo. *Listo para usar.* El Standard A se puede usar para diluciones de muestras > 5.000 U/l.

M65 EpiDeath Control Low & High: Dos viales de 0,6 ml que contienen reactivos en amortiguador fosfato con suero bovino fetal. Los valores de los M65 EpiDeath Control Low y M65 EpiDeath Control High son 300 ± 60 U/L y 2500 ± 500 U/L, respectivamente. Conservante añadido. De color amarillo. *Listo para usar.*

Wash Tablet: Un comprimido para 500 ml de solución de lavado preparada. Disolver Wash Tablet en 500 ml de agua desionizada fresca.

TMB Substrate: Un frasco que contiene 22 ml de solución TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina). *Nota:* ;No exponer a la luz! *Listo para usar.*

Stop Solution: Un vial que contiene 8 ml de ácido sulfúrico 1,0 M. *Listo para usar.*

Sealing Tape: Una (1) lámina de cinta para sellar.

Instrucciones de uso.

Certificado de análisis.

Materiales necesarios pero no incluidos

- Lector de microplacas (longitud de onda: 450 nm; lineal 0 – 3 de diámetro externo)
- Agitador de microplacas (oscilación: 600 rpm; órbita: 2 mm)
- Limpiador de placa de microvaloración de 96 pocillos o pipeta multicanal (volumen: 250 µl)
- Agitador vortex
- Pipetas de precisión: 25, 50, 75 y 200 µl
- Cilindro de medición (500 ml)
- Agua desionizada

Protocolo del ensayo

Es

Advertencias y precauciones

1. El kit M65 EpiDeath® ELISA está destinado exclusivamente para el uso *in vitro*.
2. No mezcle reactivos de kits de distintos lotes.
3. Todas las muestras de pacientes deben considerarse contagiosas y manipularse y desecharse de acuerdo con las normativas correspondientes.
4. No use muestras contaminadas.
5. La solución Stop Solution contiene ácido sulfúrico 1,0 M, el cual provoca irritación de la piel y es nocivo para los ojos. En caso de contacto, lávese con agua abundante y solicite atención médica.
6. Las hojas de datos de seguridad (SDS) están disponibles en www.VLVbio.com o se pueden solicitar.

Obtención y preparación de muestras de sangre

El volumen de la muestra debe ser suficiente para hacer el análisis por duplicado (volumen del test $2 \times 25 \mu\text{l}$). Los donantes no tienen que ayunar antes de la extracción de sangre.

Suero: Extraiga sangre mediante venopunción, evitando la hemólisis, en tubos secos (sin anticoagulante), deje coagular la sangre y recoja el suero después de la centrifugación.

Plasma: M65 EpiDeath® ELISA también se puede usar para muestras de plasma (tubos con EDTA, heparina o citrato).

Nota: para un proyecto concreto se debe utilizar el mismo tipo de material, es decir, suero o plasma obtenido por el mismo método. Para obtener información adicional sobre el funcionamiento de M65 EpiDeath® ELISA con distintos tipos de muestras, consulte www.VLVbio.com.

Guarde las muestras a $2 - 8^\circ\text{C}$ hasta un máximo de 4 horas. Para períodos más largos, guárdelas congeladas a temperaturas de -20°C o inferiores. Las muestras se pueden congelar y descongelar sin pérdida de la actividad (ref. 3, 5), pero se recomienda evitar congelar y descongelarlas repetidas veces. Para la dilución de las muestras, consulte las secciones "Preparación de los componentes" y "Características del funcionamiento".

Obtención y preparación de muestras *in vitro* para el uso en investigaciones exclusivamente

El cálculo de la relación M30:M65 sólo se recomienda para muestras $\geq 300 \text{ U/l}$.

Día 1: siembre las células. La densidad de siembra deberá determinarse con respecto al tipo de célula y al agente citotóxico; suele ser suficiente una densidad de 5.000 – 10.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos.

Día 2: lave las células una vez con PBS y añada medio fresco (200 μl /pocillo). Exponga las células al agente o a los agentes deseados.

Día 2 – 4: recoja las muestras de medio de cada pocillo. Para evitar efectos de secado, no se recomienda recoger varias muestras del mismo pocillo. Centrifugue el medio y obtenga el sobrenadante sin células. **Nota:** evite recoger células. Se usan $2 \times 25 \mu\text{l}$ de muestras de sobrenadante sin células para cada análisis.

Si el análisis se va a realizar el mismo día, las muestras se pueden guardar a $2 - 8^\circ\text{C}$. Las muestras que se van a analizar posteriormente deben almacenarse a temperaturas de -20°C o inferiores. Evite congelar y descongelar las muestras repetidas veces.

Preparación de los componentes

Dilución de M65 EpiDeath Conjugate

Diluya M65 EpiDeath Conjugate con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer. El vial de M65 EpiDeath Conjugate contiene exactamente 0,4 ml. Añada 9,2 ml de M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer directamente al vial de M65 EpiDeath Conjugate y mézclelos.

Disolución de Wash Tablet

Disolver un comprimido Wash Tablet en 500 ml de agua desionizada fresca.

Dilución de las muestras

Las muestras mayores que Standard H (5.000 U/l) deben diluirse con Standard A o con suero de donantes de sangre. Como la dilución en el análisis es lineal, la concentración original se calcula multiplicando la concentración medida por el factor de dilución. En caso de utilizar suero/plasma de donantes de sangre como diluyente de las muestras, hay que tener en cuenta su concentración.

Almacenamiento y periodo de validez después de abrirlo por primera vez

Si no se usa todo el kit, guarde los reactivos en sus recipientes originales a entre 2 y 8 °C. Si no se usan todas las tiras, vuelva a sellar la bolsa de microtiras. No se olvide de incluir el desecante.

TMB Substrate y M65 EpiDeath Conjugate son sensibles a la luz y a los iones metálicos y deben guardarse en sus frascos de ámbar originales a 2 – 8 °C en todo momento entre un uso y otro. Si se utiliza un nuevo recipiente, tiene que estar protegido de la luz. TMB Sustrate no se puede utilizar después de haber estado expuesto a la luz.

Si el kit se usa en varias ocasiones, guarde M65 EpiDeath Conjugate en el vial a 2 – 8 °C. No exponer a la luz. La solución diluida de M65 EpiDeath Conjugatees estable cuando guardarse a 2 – 8 °C durante 1 semana o a temperaturas de -20 °C o inferiores durante 4 semanas.

La solución de lavado preparada es estable durante 5 semanas cuando se guarda a 2 – 8 °C.

Es

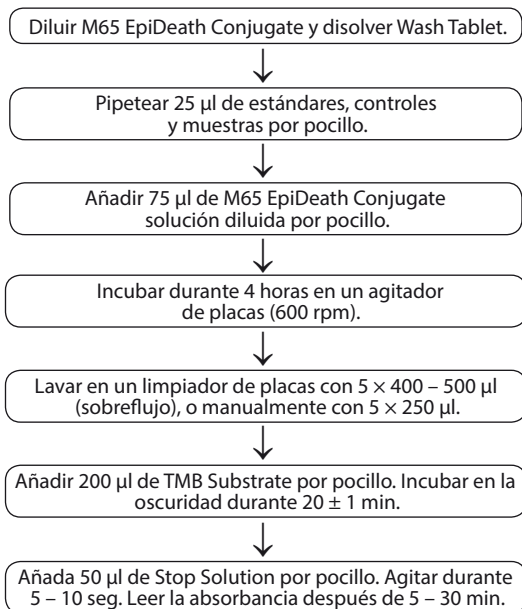
Procedimiento de análisis

El test M65 EpiDeath® ELISA deberá llevarse a cabo a temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Saque los reactivos y las muestras con tiempo para que estén a temperatura ambiente cuando sea la hora de realizar el análisis. Antes de usarlos, pase todos los reactivos por el agitador tipo vortex.
2. Disuelva la Wash Tablet en agua desionizada fresca (consulte "Preparación de los componentes").
3. Diluya M65 EpiDeath Conjugate con M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer y mézclelos (consulte "Preparación de los componentes").
4. Pipetee 25 µl por pocillo de M65 EpiDeath Standard (A–H), de M65 EpiDeath Control Low y M65 EpiDeath Control High o de las muestras (se recomienda tener duplicados).
5. Añada 75 µl de la solución diluida de M65 EpiDeath Conjugate en cada pocillo. *Nota: los pasos 4 y 5 se deben hacer secuencialmente sin interrupción en un plazo de 20 minutos.*
6. Cubra los pocillos con cinta para sellar o una tapa de una placa de microvaloración.
7. Incube durante 4 horas en el agitador. Ajuste de velocidad: 600 rpm.
8. Lave la placa en un limpiador de placas 5 veces con 400 – 500 µl de solución de lavado preparada por pocillo (lavado de sobreflujo)
o
Lave la placa manualmente, descartando la solución de incubación y lavando los pocillos 5 veces con 250 µl de solución de lavado preparada. Evite la contaminación entre los pocillos.
9. Añada 200 µl de TMB Substrate a cada pocillo. Incúbelos en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 ± 1 minutos.
10. Añada 50 µl de Stop Solution a cada pocillo. Para garantizar la mezcla completa de TMB Substrate y Stop Solution, agite la microplaca de 5 a 10 segundos. Espere 5 minutos antes de leer la absorbancia.
11. Determine la absorbancia a 450 nm antes de los 30 minutos en un lector de microplacas y anote los resultados.
12. Calcule los resultados como se describe en la Sección "Cálculo de resultados analíticos".

Nota: ¡El tiempo de incubación en M65 EpiDeath® ELISA es de 4 horas!

Flujograma



Es

Cálculo de resultados analíticos

Los resultados de M65 EpiDeath® ELISA se calculan usando métodos asistidos por ordenador. Evalúe los valores de los controles y las muestras usando un programa adecuado para la manipulación de datos tipo ELISA. Algoritmo de ajuste: Función Cubic Spline. eje x: concentración (U/l); eje y: absorbancia a 450 nm (A450).

Nota: si las muestras se han diluido, la concentración observada deberá multiplicarse por el factor de dilución y si se usó suero/plasma de donantes de sangre, habrá que tomarse en cuenta la concentración.

Funcionamiento del análisis

Características del rendimiento

Intervalo de medición: El intervalo de medición es 0 – 5.000 U/l.

Efecto de dosis alta: No se produce un efecto de dosis alta hasta las 200.000 U/l.

Reproducibilidad: La variación intraanalítica (WA % CV) es $\leq 10\%$, la variación interanalítica (BA % CV) es $\leq 10\%$ y la variación total es $\leq 10\%$ para muestras > 300 U/l.

Sensibilidad: La concentración mínima detectable de K18 en M65 EpiDeath® ELISA es de 25 U/l, definida como la concentración de K18 que corresponde a la absorbancia a dos desviaciones estándar con respecto a la absorbancia del Standard A (0 U/l).

Ensayo de recuperación: Recuperación de High Standard en muestras de sangre humana: 105 % (promedio) y 91 – 122 % (intervalo).

Linealidad/dilución: Recuperación en suero humano cuando se diluye en M65 EpiDeath Standard A (0 U/l): 95 % (promedio) y 88 – 101% (intervalo). Recuperación en suero humano cuando se diluye en suero de donantes de sangre: 93 % (promedio) y 82 – 101 % (intervalo).

Intervalo de referencia: En suero de 200 donantes de sangre suecos, la mediana fue de 62 U/l y el percentil 95 fue de 266 U/l. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

Trazabilidad del estándar

Las unidades medidas por M65 EpiDeath® ELISA se definen frente a un antígeno nativo en el suero. El antígeno nativo se calibra frente a un estándar proteico recombinante. **Nota:** Debido a los distintos amortiguadores del ensayo, el material estándar no se puede intercambiar entre los distintos kits de Peviva.

Control de calidad interno

Los M65 EpiDeath Control Low y High suministrados con sus concentraciones dadas son suficientes para garantizar el funcionamiento de los análisis.

sis y se recomienda que se empleen por duplicado cada vez que se realice el análisis.

Si este procedimiento no es suficiente, cada laboratorio tiene que establecer sus propios controles según lo previsto en la sección "Obtención y preparación de muestras *in vitro* para el uso en investigaciones exclusivamente" o las prácticas rutinarias del laboratorio. Los controles se deberán congelar en alícuotas y manipular de la misma forma cada vez que se lleva a cabo el análisis.

Limitaciones del método

No se ha establecido plenamente la utilidad clínica de la medición de K18 como indicador pronóstico ni para el tratamiento de pacientes sometidos a regímenes de terapia.

Las muestras muy lipémicas (≤ 1.250 mg/dl), ictéricas ($\leq 12,5$ mg/dl) o hemolizadas (≤ 50 mg/dl) no interfieren en el análisis.

Referencias bibliográficas

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.

Para ver otras referencias, consulte www.VLVbio.com/literature.

Garantía

Los datos de rendimiento presentados aquí fueron obtenidos usando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación del procedimiento recomendado por el fabricante podría afectar los resultados. En tal caso, el fabricante renuncia a todas las garantías explícitas, implícitas o reglamentarias; entre otras, las garantías implícitas de comerciabilidad e idoneidad para el uso. El fabricante y sus distribuidores autorizados, en dicho caso, no serán responsables por daños indirectos o consecuentes.



VLVbio

VLVbio AB, Hästholmsvägen 32, 131 30 Nacka, Sweden
Phone: +46 8 122 053 00 • www.vlvbio.com • info@vlvbio.com