

M30 Apoptosense[®] ELISA

REF 10011

Instructions for Use

Bruksanvisning

Gebrauchsanweisung

Mode d'emploi

Istruzioni per l'uso

Instrucciones de uso

Instruções de utilização

In USA, Canada and Japan

For research and laboratory use only.

Not for human or diagnostic use.

M30 Apoptosense® ELISA

Instructions for Use	English:	page 5 – 15
Bruksanvisning	Svenska:	sida 17 – 27
Gebrauchsanweisung	Deutsch:	Seite 29 – 39
Mode d'emploi	Français:	pages 41 – 51
Istruzioni per l'uso	Italiano:	pagina 53 – 63
Instrucciones de uso	Español:	página 65 – 75
Instruções de utilização	Português	páginas 77 – 87

En

Sv

De

Fr

It

Es

Pt

Instructions for Use of the M30 Apoptosense® ELISA

Contents

Explanation of Symbols Used on Labels	6
Trademarks	6
Patents	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	11
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[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] and PEVIVA[®] are registered trademarks of VLVbio (Vivalavida AB).

Patents

European patent number EP 1 019 438.

U.S. patents number 6,296,850 and 6,716,968 and 6,706,488.

Canadian patent number 2305681.

Japanese patent number 4372340.

Shipping and Storage

The M30 Apoptosense[®] ELISA is shipped in cooled conditions and should be stored at 2–8 °C. *Note!* Do not freeze!

Assay Description

Intended Purpose

The M30 Apoptosense® ELISA is a one-step *in vitro* immunoassay for the quantitative determination of the apoptosis-associated caspase-cleaved keratin 18 (ccK18, K18Asp396 or M30 neo-epitope) in serum and plasma.

Summary and Explanation of the Test

Caspases cleave various cellular proteins during apoptosis. In epithelial cells, one of those substrates is the intermediate filament protein keratin 18 (K18). The M30 antibody recognises a neo-epitope exposed after caspase cleavage of K18 after the aspartic acid residue 396 (ref. 1). Cleavage at this position occurs early during apoptosis by caspase 9 and during the execution phase by caspase 3 and caspase 7 (ref. 2).

The M30 Apoptosense ELISA measures the levels of soluble caspase-cleaved K18 (ccK18) fragments containing the K18Asp396 neo-epitope. After induction of apoptosis of epithelial cells, ccK18 increases are first observed in cell extracts. Release of antigen into the extracellular compartment occurs later and is due to secondary necrosis of apoptotic bodies. The ccK18 increase during apoptosis is inhibited by the caspase-inhibitor zVAD-fmk (ref. 3).

The M30 Apoptosense ELISA can be used in combination with the M65® ELISA (PEVIVA Prod. No. 10020) which measures total K18. Combining the two assays is useful for assessment of cell death mode (ref. 4).

The M30 Apoptosense ELISA detects human caspase-cleaved K18, but does not detect caspase-cleaved mouse, rat or canine K18 (ref. 5). The M30 Apoptosense ELISA will specifically detect tumour apoptosis in mice or rats carrying human tumour xenografts (ref. 5).

M30 Apoptosense ELISA is intended for use in research, clinical diagnostics and clinical trials in the fields of oncology, hepatology and transplantation.

Principle of the Method

The M30 Apoptosense 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 M30 antibody directed against the K18Asp396 neo-epitope. 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!

M30 Conjugate: Concentrate (24 × conc). One vial containing 0.4 mL of mouse monoclonal M30 antibody (anti-K18Asp396 neo-epitope) conjugated with horseradish peroxidase (HRP) in phosphate buffer with protein stabilizers. Preservative added. Should be diluted with M30 Conjugate Dilution Buffer.
Note! Do not expose to light!

M30 Conjugate Dilution Buffer: One vial containing 11 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M30 Conjugate. Preservative added. Blue coloured.

M30 Standard A – G: Standard A containing 2 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standard B–G, 0.5 mL each, containing standard material in phosphate buffer with FCS. The values of Standard A – G are 0, 75, 150, 250, 500, 750 and 1 000 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!* Standard A can be used for dilutions of samples > 1 000 U/L.

M30 Control Low & High: Two vials containing 0.5 mL of reactive components in phosphate buffer with FCS. The values of M30 Control Low and M30 Control High are stated on the respective vials. 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 7 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. M30 Apoptosense 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. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on www.peviva.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 M30 Apoptosense ELISA can also be used for plasma samples (EDTA or heparin).

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 M30 Apoptosense ELISA using different types of samples, please consult www.peviva.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. 6, 7), 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

M30 Apoptosense ELISA has been used for cell-culture applications in a number of published studies (see www.peviva.com for references). Peviva has developed a specific product for *in vitro* cell cultures, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA Prod. No. 10900). This product has a dynamic range and sensitivity suitable for *in vitro* work.

The following protocols can be used for detection of apoptosis of cultured epithelially derived cells using the M30 Apoptosense ELISA.

Sample preparation from cell cultures

For many applications, it is advantageous to measure total M30 reactivity (cck18) at a single, late time point. Such measurements reflect an integrated assessment of apoptosis. To assay total cck18 fragments in cell culture media and cell extracts, add non-ionic detergent directly to the cells in the tissue culture medium.

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 µL/well). Expose the cells to the desired agent(s).

Day 2–4: For 96-well plates containing 200 µL of medium per well, add 10 µL of 10% NP 40 per well. Allow lysis to occur on a rotatory shaker for 5 minutes at room temperature. Mix gently by pipetting up and down, careful not to create air bubbles, and transfer 2 × 25 µL of the medium/lysate to the wells of M5 Coated Microstrips.

Sample preparation from cell culture supernatants

The M30 Apoptosense ELISA and M65® ELISA can be used to assess cell death mode by calculation of an M30:M65 ratio (ref. 3). Such measurements should be performed using medium supernatants! The ratio should be calibrated for each carcinoma cell line using appropriate controls, i.e. agents known to induce apoptosis (e.g. genotoxic agents, staurosporine) and/or mainly necrosis (e.g. oligomycin/glucose starvation or hydrogen peroxide).

Day 1/Day 2: Seed the cells, wash and add agents as described above.

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 × 25 µL 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 M30 Conjugate

Dilute the M30 Conjugate with M30 Conjugate Dilution Buffer. The M30 Conjugate vial contains exactly 0.4 mL. Add 9.2 mL of the M30 Conjugate Dilution Buffer directly to the M30 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 G (1 000 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 M30 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 at several occasions, store the diluted M30 Conjugate in the vial at 2–8 °C. Do not expose to light. The diluted M30 Conjugate solution is stable for 3 weeks.

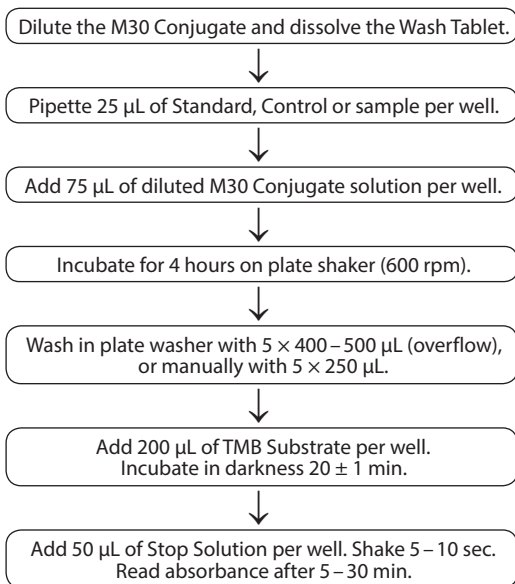
The Wash Tablet solution is stable for 5 weeks when stored at 2–8 °C.

Assay Procedure

The M30 Apoptosense 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 M30 Conjugate with M30 Conjugate Dilution Buffer (see “Component Preparation”) and mix.
4. Pipette 25 μ L of M30 Standard (A–G), M30 Control Low, M30 Control High or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75 μ L of the diluted M30 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 μ L/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 μ L of Wash Tablet solution. Avoid contamination between wells.
9. Add 200 μ L of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for 20 ± 1 minutes.
10. Add 50 μ L 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”.

Flow Chart



Calculation of Analytical Results

The M30 Apoptosense 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 0–1 000 U/L.

High Dose Effect: No High Dose effect occurs until 195 000 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 200 U/L.

Sensitivity: The minimum detectable concentration of K18Asp396 neo-epitope in the M30 Apoptosense ELISA is 20 U/L, defined as the concentration of cck18 that corresponds to the absorbance being two standard deviations from the absorbance of the Standard A (0 U/L).

Lower Limit of Quantification: The lowest concentration at which an analyte in the sample matrix can be measured with acceptable level of accuracy and precision is 40 U/L.

Spiking Recovery: Recovery of high standard when spiked into human blood samples: 109 % (average) and 98–120 % (range).

Linearity/Dilution: Recovery of human sera when diluted in M30 Standard A (0 U/L): 107 % (average) and 99–122 % (range).

Reference range: In serum from 200 Swedish blood donors, the median was 94 U/L and the 95th percentile was 251 U/L. It is recommended that each laboratory establishes its own reference range.

Traceability of Standard

The units measured by the M30 Apoptosense ELISA are defined against native antigen spiked into serum. Native antigen is calibrated against a recombinant protein standard. 1 U/L = 1.24 pM. *Note!* Due to different assay buffers, standard material cannot be exchanged between different Peviva kits.

Internal Quality Control

The supplied M30 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 cck18 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. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, Exp Cell Res. 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

For further references, please consult www.peviva.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 M30 Apoptosense® ELISA

Innehållsförteckning

Förklaring av symbolerna som används på etiketterna	18
Varumärken	18
Patent	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	23
Förvaring av komponenter efter första öppnandet	23
Testprocedur	24
Flödesschema	25
Beräkning av resultaten	25
Mätmetodens prestanda	26
Metodens karakteristik	26
Kalibrering	26
Intern kvalitetskontroll	26
Metodens begränsningar	27
Litteratur och referenser	27
Garanti	27

Förklaring av symbolerna som används på etiketterna



Katalognummer



Räcker till "n" antal tester



Lot nummer



Tillverkare



Temperaturbegränsning



Använd före



Se handhavandebeskrivningen

Varumärken

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

Patent

Europeiskt patent EP 1 019 438.

U.S.-patent 6,296,850 och 6,716,968 och 6,706,488.

Japanskt patent 4372340.

Kanadensiskt patent 2305681.

Leverans och förvaring

M30 Apoptosense[®] ELISA-kit skickas kylt och ska förvaras i 2–8 °C. *Obs!* Får ej frysas!

Beskrivning av testet

Avsedd användning

M30 Apoptosense® ELISA är en enstegs *in vitro*-immunotest för kvantitativ bestämning av apoptos-associerat caspasklyvt keratin 18 (ccK18, K18Asp396-neoepitop eller M30-antigen) i serum och plasma.

Sv

Sammanfattning och metodens princip

Caspaser klyver olika proteiner under apoptos. I epiteliala celler utgörs ett av dessa substrat av det intermediära filamentproteinet keratin 18 (K18). M30-antikroppen känner igen en neoepitop som exponeras efter caspasklyvning av K18 efter asparaginsyra 396 (ref. 1). Tidigt under apoptosprocessen klyver caspas 9 vid denna position, för att därefter huvudsakligen klyvas av caspas 3 och caspas 7 i utförandefasen (ref. 2).

M30 Apoptosense ELISA mäter nivåerna av lösliga caspasklyvda K18-fragment (ccK18) med K18Asp396-neoepitop. Efter induktion av apoptos av epiteliala celler observeras först ökning av ccK18-nivåerna i cellextrakt. Frisättningen av antigen till den extracellulära miljön sker senare och beror på sekundär nekros av apoptotiska kroppar. Ökningen av ccK18-nivåerna under apoptos hämmas av bredspektrum-caspasinhibitorer som zVAD-fmk (ref. 3).

M30 Apoptosense ELISA kan användas i kombination med M65® ELISA (PEVIVA prod. nr 10020) vilken mäter totalt K18. Kombinerad användning av de två testerna möjliggör bestämning av huruvida celler har dött genom apoptos eller nekros (ref. 4).

M30 Apoptosense ELISA mäter humant ccK18, men känner inte igen caspasklyvt K18 från möss, råttor eller hundar (ref. 5). Därför ger M30 Apoptosense ELISA ett värde som är specifikt för tumörapoptosen i möss eller råttor som bär en human xenograftumör (ref. 5).

M30 Apoptosense ELISA är avsedd för forskning och kliniska studier samt klinisk diagnos inom områden onkologi, hepatologi och transplantation.

Testprincip

M30 Apoptosense ELISA är en fastfas-”sandwich”-enzymimmunotest. Standarder, kontroller och prover reagerar med fastfas-”capture”-antikroppen M5 (riktad mot K18) och HRP- (pepparrotsperoxidase-) konjugerad M30-antikropp riktad mot K18Asp396-neoepitop. Obunden konjugerad M30-antikropp avlägsnas genom upprepade tvättar. TMB-substrat tillsätts.

Färgreaktionen stoppas och absorbansen läses av. Färgintensiteten är direkt proportionell mot analytens koncentration.

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

Material för 96 bestämningar

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

M30 Conjugate: Koncentrat (24 × konc.). En flaska innehållande 0,4 ml monoklonal M30-musantikropp (anti-K18Asp396-neoepitop) konjugerad med pepparotsperoxidas (HRP) i fosfatbuffer med proteinstabilisatorer. Ska spädas med M30 Conjugate Dilution Buffer. Konserveringsmedel tillsatt. *Obs!* Undvik exponering för ljus!

M30 Conjugate Dilution Buffer: En flaska innehållande 11 ml fosfatbuffer med proteinstabilisatorer för spädning av M30 Conjugate. Konserveringsmedel tillsatt. Blåfärgad. *Färdig för användning!*

M30 Standards A–G: Standard A innehållande 2 ml fosfatbuffert med fetalkalvserum. Standard B–G innehållande vardera 0,5 ml standardmaterial i fosfatbuffer med fetalt kalvserum. Standardernas koncentrationer är 0, 75, 150, 250, 500, 750 och 1 000 U/l. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. *Färdig för användning!* Prover över 1 000 U/l kan spädas med Standard A.

M30 Control Low & High: Två flaskor, 0,5 ml vardera, med reaktiva komponenter i fosfatbuffert med fetalt kalvserum. Koncentration för M30 Control Low och High anges på respektive flasketikett. Konserveringsmedel tillsatt. Gulfärgad. *Färdig för användning!*

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

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

Stop Solution: En flaska innehållande 7 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)
- Vortexskak
- Pipetter för 25, 50, 75 och 200 µl
- Mätglas (500 ml)
- Avjoniserad vatten

Sv

Testförfarande

Varningar och försiktighetsåtgärder

1. M30 Apoptosense ELISA är endast avsett för *in vitro*-användning.
2. Blanda inte komponenter från kit med olika satsnummer.
3. Patientprover ska hanteras som om de vore smittbärande och ska hanteras enligt gällande bestämmelser.
4. Använd inte kontaminerade prover.
5. Stop Solution innehåller 1,0 M svavelsyra som kan orsaka hudirritation och är skadlig för ögonen. Tvätta med stora mängder vatten efter exponering och kontakta läkare.
6. Säkerhetsdatablad (MSDS) är tillgängliga på www.peviva.com eller vid förfrågan.

Provtagning och hantering av blodprover

Provvolyten 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 och separera serum från celler/koagel.

Plasma: M30 Apoptosense ELISA kan även användas för plasmaprover (rör innehållande EDTA eller heparin).

OBS! Samma typ av provmaterial bör användas under ett specifikt projekt dvs serum eller plasma insamlat med samma metod. Konsultera www.peviva.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 proverna vid -20 °C eller lägre. Prover kan frystinas utan att de förlorar aktivitet, men upprepade frystiningar bör undvikas.

För spädning av prover, se stycket "Metodens karakteristik".

Provtagning och hantering av prover för utvecklingsändamål

M30 Apoptosense ELISA har använts för mätningar i cellkulturer i flera publicerade studier (se www.peviva.com för referenser). Peviva har utvecklat en specifik produkt för *in vitro*-cellkulturer, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA prod. nr 10900). Denna produkt har ett dynamiskt spann och en känslighet anpassad för *in vitro*-arbete.

Följande protokoll kan användas för att mäta apoptos i cellkulturer av epitelialt ursprung med M30 Apoptosense ELISA.

Preparering av prover från cellsuspension

För många användningsområden är det en fördel att mäta den totala M30-aktiviteten (cck18) vid en enda tidpunkt efter tillsats av ett apoptosframkallande stimulus. Genom att välja en sen tidpunkt kommer sådana mätningar att återspegla en integrerad uppskattning av apoptosen. För att mäta de totala nivåerna av cck18-fragmentet i odlingsmedium och celleextrakt tillsättes detergent till odlingsmediet.

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 µl/brunn). Behandla cellerna med önskade ämnen.

Dag 2–4: Tillsätt 10 µl 10 % NP-40 per brunn i 96-brunnsplattor (innehållande 200 µl medium per brunn; slutkoncentration 0,5 %). Skaka plattan 5 minuter i rumstemperatur så att cellerna lyseras. Det rekommenderas att medium/lysat sugs upp och ner i pipetten för att erhålla tillräcklig blandning. Överför 2 × 25 µl av medium/lysat till en M30 Coated Microstrips.

Preparering av prover från cellsupernatant

M30 Apoptosense ELISA och M65® ELISA kan användas för att fastställa typ av celldöd genom att beräkna kvoten mellan M30 och M65 (ref. 3). Sådana mätningar ska göras med mediumsupernatanter! Kvoten bör kalibreras för varje carcinomcellinje med hjälp av lämpliga kontroller, som t ex kända ämnen som orsakar apoptos (t. ex. genotoxiska ämnen eller staurosporin) och/eller huvudsakligen nekros (oligomycin/glukossvält eller väteperoxid).

Dag 1/dag 2: Så ut cellerna, tvätta och tillsätt ämnen på samma sätt som vid användning av cellsuspension.

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

Förvara proverna vid 2–8 °C om testet utförs under samma dag. Förvara prover som ska analyseras vid ett senare tillfälle vid -20 °C eller lägre. Unvik upprepad frystining.

Spädning av komponenter

Spädning av M30 Conjugate

Späd M30 Conjugate med M30 Conjugate Dilution Buffer. Flaskan med M30 Conjugate innehåller exakt 400 µl konjugerad antikropps lösning. Tillsätt 9,2 ml M30 Conjugate Dilution Buffer direkt till flaskan med M30 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 G (1 000 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 torkmedelspåsen.

TMB Substrate och M30 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 för ljus. TBM Substrate kan inte användas efter exponering för ljus.

Förvara den spädda M30 Conjugate-lösningen i flaskan vid 2–8 °C om kitet används vid flera tillfällen. Skydda lösningen från ljus. Spädd M30 Conjugate-lösning är hållbar i 3 veckor efter spädning.

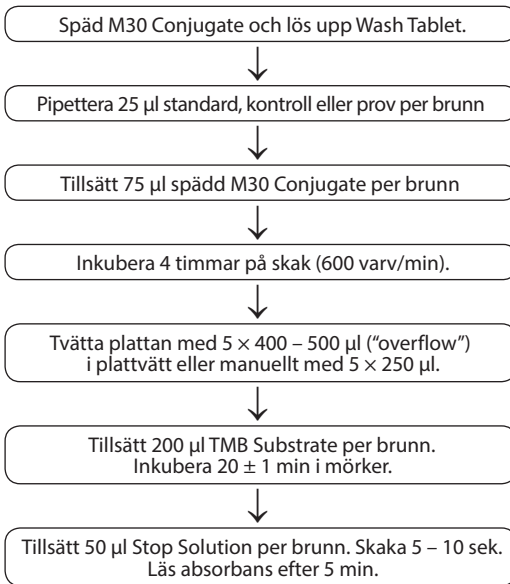
Upplöst Wash Tablet är hållbar i 5 veckor om den förvaras vid 2–8 °C.

Testprocedur

M30 Apoptosense ELISA ska utföras vid rumstemperatur (24 ± 3 °C).

1. Rumstemperera alla komponenter och prover före testsättning. Vortexa före användning.
2. Lös upp Wash Tablet med färskt avjoniserat vatten (se avsnitt "Spädning av komponenter").
3. Späd M30 Conjugate med M30 Conjugate Dilution Buffer och blanda ordentligt (se avsnitt "Spädning av komponenter").
4. Pipettera 25 µl M30 Standard (A–G), M30 Control Low, M30 Control High eller prover per brunn (duplikat rekommenderas).
5. Tillsätt 75 µl av spädd M30 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 upplöst Wash Tablet-lösning. 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 resultaten".

Flödesschema



Sv

Beräkning av resultaten

Testresultat från mätningen i M30 Apoptosense 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 erhållen koncentration med spädningsfaktor och om blodgivarserum/-plasma använts, ta hänsyn till M30-koncentrationen av dessa.

Mätmetodens prestanda

Metodens karakteristik

Mätområde: Mätområdet är 0–1 000 U/l.

High dose-effekt: Metoden har ingen *high dose*-effekt upp till 195 000 U/l.

Reproducerbarhet: Spridningen av mätvärden inom test ("WA % CV") är < 10 % och spridningen av mätvärden mellan test ("BA % CV") är < 10 % för prover > 200 U/l.

Känslighet: Den lägsta detekterbara koncentrationen av M30-antigen som kan mätas med M30 Apoptosense ELISA är 20 U/l, vilket motsvarar den absorbans som ligger 2 standardavvikelse från absorbansen för 0 U/l.

Spiking recovery: När en hög standard tillsätts till ett mänskligt blodgivarprov erhålls i medel 109 % av förväntat koncentration inom spannet 98 – 120 %.

Parallellism/Spädbarhet: Återfinning vid spädning av patientsera i M30 Standard A (0 U/l): 107 % (medelvärde) och 99–122 % (gränsvärden).

Referensområde: I serum från 200 svenska blodgivare har medianen bestämts till 94 U/l och den 95:te percentilen till 251 U/l. Det rekommenderas att varje laboratorium fastställer sitt eget referensområde.

Kalibrering

Enheten i M30 Apoptosense ELISA är definierad mot humanserum innehållande nativt antigen. Det nativa antigenet är kalibrerat mot en rekombinant proteinstandard. 1 U/l = 1,24 pM. *Obs!* På grund av skillnader i reaktionsbuffertar kan standarder inte utbytas mellan olika Peviva-produkter.

Intern kvalitetskontroll

Att kontrollerna att M30 Control Low och M30 Control 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 cck18 som prognosfaktor eller för monitorering av behandlingssvar är ännu inte fullt klarlagt.

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

Litteratur och referenser

1. Leers *et al.*, *J Pathol.* 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, *Exp Cell Res.* 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, *Cancer Biomarkers* 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, *Ann Oncol* 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, *Eur J Cancer* 39, 2003, 769.

För ytterligare referenser, se www.peviva.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 fransäger 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 M30 Apoptosense® ELISA

Inhaltsangabe

Erklärung der auf den Etiketten benutzten Symbolen	30
Handelsmarken	30
Patente	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
<i>In vitro</i> -Probengewinnung und -Handhabung für die Forschung	34
Verdünnung der Komponenten	35
Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen	35
Testprotokoll	36
Flussdiagramm	37
Berechnung der Analysenergebnisse	37
Leistungsmerkmale des Tests	38
Testcharakterisierung	38
Kalibrierung 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®, Apoptosense®, M65®, EpiDeath® und PEVIVA® sind eingetragene Handelsmarken von VLVbio (Vivalavida AB).

Patente

Europäisches Patent Nummer EP 1 019 438.

U.S.-Patente Nummer 6,296,850 und 6,716,968 und 6,706,488.

Kanadisches Patent Nummer 2305681.

Japanisches Patent Nummer 4372340.

Lagerung und Versand

M30 Apoptosense® ELISA wird gekühlt versendet und muss bei 2 – 8 °C gelagert werden. **Achtung!** Nicht einfrieren!

Testdurchführung

Verwendungszweck

M30 Apoptosense® ELISA ist ein einstufiger *in vitro*-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung des apoptose-spezifischen Caspase-gespaltenen Keratins 18 (ccK18, K18Asp396 oder M30-Neoepitop) in Serum und Plasma.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Im Verlauf der Apoptose spalten Caspasen verschiedene zelluläre Proteine. Eines dieser Substrate epithelialer Zellen ist das intermediäre Filamentprotein Keratin 18 (K18). Der Antikörper M30 erkennt ein Neoepitop, das mit der Asparaginsäure 396 (Ref. 1) des K18 endet und nach der Spaltung freigelegt wird. Diese Spaltung erfolgt im Frühstadium der Apoptose durch Caspase 9 und in der Exekutionsphase durch Caspase 3 und Caspase 7 (Ref. 2).

Der M30 Apoptosense ELISA misst den Gehalt an löslichen caspasegespaltenen K18- (ccK18-) Fragmenten, die das K18Asp396-Neoepitop enthalten. Nach Induktion der Apoptose in epithelialen Zellen steigt die ccK18-Konzentration zuerst in den Zellextrakten an. Das Antigen wird später durch sekundäre Nekrose apoptotischer Körper in den extrazellulären Bereich freigesetzt. Der Caspase-Inhibitor zVAD-fmk hemmt bei der Apoptose den Anstieg des ccK18-Werts (Ref. 3).

Der M30 Apoptosense ELISA kann zusammen mit dem M65® ELISA (PEVIVA Prod.-Nr. 10020) verwendet werden, welcher den Gesamtgehalt an K18 misst. Die Kombination beider Tests ist zur Evaluierung des Zelltods nützlich (Ref. 4).

Der M30 Apoptosense ELISA erkennt menschliches caspasegespaltenes K18, jedoch nicht das von Maus, Ratte oder Hund (Ref. 5). Der Test misst daher nur die Tumorapoptose bei Mäusen oder Ratten mit menschlichen Tumorxenotransplantaten (Ref. 5).

Der M30 Apoptosense ELISA wird in der Forschung, in klinischen Studien und in der klinischen Routine zur Beurteilung der Krankheitsaktivität und -verlaufes im Bereich der Hepatologie, Onkologie und der Transplantationsmedizin verwendet. Klinische Studien konnten zeigen, dass sich der Test für die Beurteilung des Ausmaßes einer Fettlebererkrankung eignet. Weiterhin kann der Test zwischen unterschiedlichen Fibrosestadien bei entzündlicher Lebererkrankung wie der chronischen HCV-Infektion differenzieren.

Testprinzip

M30 Apoptosense ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay. Standards, Kontrollen und Proben reagieren mit einem festen Fängerantikörper M5, der

auf K18 gerichtet ist und mit dem mit HRP (Meerrettichperoxidase) konjugierten Antikörper M30, der auf das K18Asp396-Neoepitop gerichtet ist. Ungebundenes Konjugat wird durch einen Waschprozess entfernt. TMB-Substrat wird zugeben. Die Farbentwicklung wird beendet und die Absorption gemessen. Die resultierende Färbung ist direkt proportional zur Konzentration des M30-Gehalts.

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, 96 trockene Testmulden (12 × 8). Die Mulden sind mit monoklonalem K18-Mausantikörper M5 beschichtet. Die Mikrotiterplatte befindet sich in einem versiegelten Aluminiumbeutel, der ein Trockenmittelbeutel enthält. Eventuell nicht benötigte Streifen müssen im Beutel zusammen mit dem Trockenmittel wieder versiegelt werden. *Gebrauchsfertig!*

M30 Conjugate: Konzentrat (24 ×). Ein Fläschchen mit 0,4 ml HRP-konjugiertem monoklonalem Mausantikörper M30 (anti-K18Asp396-Neoepitop) in Phosphatpuffer mit Protein stabilisator und Konservierungsmittel. Mit M30 Conjugate Dilution Buffer verdünnen. *Achtung!* Vor Licht schützen!

M30 Conjugate Dilution Buffer: Ein Fläschchen mit 11 ml Phosphatpuffer mit Protein stabilisator zur Verdünnung des M30 HRP Conjugates enthält. Enthält Konservierungsmittel. Blaue Lösung.

M30 Standards A – G: Ein Fläschchen Standard A mit 2 ml phosphatgepuffertem FKS (fötales Kälberserum). Standards B – G, jeweils 0,5 ml, die das Standardmaterial in phosphatgepuffertem FKS enthalten. Die Werte der Standards A – G sind 0, 75, 150, 250, 500, 750 und 1.000 U/l. Enthält Konservierungsmittel. Gelbe Lösung. *Gebrauchsfertig!* Proben > 1.000 U/l können mit Standard A verdünnt werden.

M30 Control Low & High: Zwei Fläschchen mit jeweils 0,5 ml, die die reaktiven Bestandteile in phosphatgepuffertem FKS enthalten. Die Werte der M30 Controls Low und High sind auf den entsprechenden Fläschchen angegeben. 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-Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin). *Achtung!* Vor Licht schützen! *Gebrauchsfertig!*

Stop Solution: Ein Fläschchen mit 7 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 AD)
- 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 oder destilliertes Wasser

Testprotokoll

De

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

1. Der M30 Apoptosense ELISA-Test 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 verursachen kann. Bei Kontakt mit reichlich Wasser auswaschen und einen Arzt aufsuchen.
6. Sicherheitsdatenblätter (MSDS) sind unter www.peviva.de oder auf Nachfrage erhältlich.

Blutentnahme und Handhabung der Proben

Das Probevolumen sollte so bemessen sein, dass mit jeder Probe jeweils zwei Messungen durchgeführt werden können (Testvolumen: $2 \times 25 \mu\text{l}$). Spender müssen bei der Blutentnahme nicht nüchtern sein.

Serum: Blutgewinnung durch Venenpunktion in einfachen Röhrchen (ohne Antikoagulans) unter Vermeidung von Hämolyse, anschließend Abtrennung der Zellen vom Serum.

Plasma: M30 Apoptosense ELISA kann auch für Plasmaproben (EDTA oder Heparin) verwendet werden.

Achtung! Im Rahmen eines Projekts sollte stets das gleiche Probenmaterial, d.h. entweder Serum oder Plasma, verwendet werden. Für weitere Informationen über die Leistung von M30 Apoptosense ELISA bei Verwendung unterschiedlicher Proben wenden Sie sich bitte an www.peviva.de.

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. 6, 7), doch sollte es nicht unnötig erfolgen. Bezüglich der Verdünnung der Proben siehe Abschnitt „Testcharakterisierung“.

In vitro-Probengewinnung und -Handhabung für die Forschung

Der M30 Apoptosense ELISA wurde in zahlreichen veröffentlichten Studien in Zellkulturanwendungen verwendet (Referenzen siehe www.peviva.de). Peviva hat ein spezielles Produkt für *in vitro*-Zellkulturen entwickelt, den *M30 Cyto-Death™ ELISA* (PEVIVA Prod. Nr. 10900). Der dynamische Bereich und die Sensitivität dieses Produkts sind der *in vitro*-Anwendung angepasst.

Die folgenden Protokolle können zum Nachweis der Apoptose in epithelialen Zellkulturen mithilfe des M30 Apoptosense ELISA verwendet werden.

Handhabung der Proben aus Zellkulturen

In vielen Anwendungen ist es von Vorteil, die Gesamtreaktivität von M30 (ccK18) einmalig zu einem späten Zeitpunkt zu messen. Solche Messungen repräsentieren eine integrierte Bewertung der Apoptose. Zur Bestimmung des Gesamtgehalts von ccK18 Fragmenten in Zellkulturmedien und Zellextrakten füge man nichtionische Tenside direkt zu den Zellen im Gewebekulturmedium hinzu.

Tag 1: Aussäen der Zellen. Die Saatkichte 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 µl/Mulde) zugeben. Die Zellen werden mit der/den gewünschten Testsubstanz(en) versetzt.

Tag 2 – 4: Für 96-Testmuldenplatten, die 200 µl Medium pro Mulde enthalten, 10 µl 10 % NP-40 pro Mulde hinzufügen. Zur Ausführung der Lyse die Platte auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur 5 Minuten lang inkubieren. Zur Verbesserung des Mischergebnisses wird empfohlen, das Medium/Lysat zuvor vorsichtig auf und ab zu pipettieren; dabei darauf achten, dass die Probe nicht schäumt. Überführung von 2 × 25 µl des Mediums/Lysates in die Mulden der M5 Coated Microstrips.

Handhabung der Proben aus Zellkulturüberständen

M30 Apoptosense ELISA und M65® ELISA kann zur Bewertung der Art des Zelltodes durch Berechnung eines M30:M65-Verhältnisses (Ref. 3) verwendet werden. Die Erstellung eines derartigen Verhältnisses sollte allerdings auf die Bestimmung von Zellkulturüberständen beschränkt sein. Dieses Verhältnis sollte für jede Karzinomzelllinie mit geeigneten Kontrollen kalibriert werden, d. h. mit

Mitteln, die bekanntlich Apoptose einleiten (z. B. genotoxische Mittel, Staurosporin) und/oder hauptsächlich zur Nekrose führen (z. B. Oligomycin/Glukoseentzug oder Wasserstoffperoxid).

Tag 1/Tag 2: Aussäen der Zellen, waschen und Zugabe der Testsubstanzen wie vorstehend beschrieben.

Tag 2 – 4: Aufnahmen des Probenmediums von jeder Mulde. Um eine Austrocknung zu vermeiden, sollten nicht mehrere Proben aus der gleichen Mulde aufgenommen werden. Zentrifugieren des Mediums und Aufnahme des zellfreien Überstandes. *Achtung!* Aufnahme von Zellen vermeiden. Verwendung von 2 × 25 µl zellfreiem Überstand je Test.

Falls die Messung am gleichen Tag ausgeführt wird, können die Proben bei 2 – 8 °C gelagert werden. Für spätere Analysen müssen die Proben bei mindestens -20 °C eingefroren werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren vermeiden.

De

Verdünnung der Komponenten

Verdünnen des M30 Conjugates

Das M30 Conjugate muss mit M30 Conjugate Dilution Buffer verdünnt werden. Das Fläschchen mit M30 Conjugate enthält genau 400 µl. 9,2 ml des M30 Conjugate Dilution Buffer direkt in das Fläschchen mit M30 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 G (1.000 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.

Lagerung und Haltbarkeit nach dem ersten Öffnen

Falls der gesamte Kit nicht auf einmal verwendet wird, müssen die Reagenzien in ihren Originalbehältern bei 2 – 8 °C gelagert werden. Falls nicht alle Streifen benötigt werden, Beutel mit Mikrostreifen wieder versiegeln (Trockenmittelbeutel beilegen).

TMB Substrate und M30 HRP Conjugate sind lichtempfindlich und empfindlich gegenüber Metallionen. Sie sollten bei Nichtgebrauch immer in den ori-

ginalen Braunglasflaschen bei 2 – 8 °C gelagert werden. Bei Verwendung eines neuen Behälters ist für Lichtschutz zu sorgen. TMB Substrate kann nach Licht- einwirkung nicht mehr benutzt werden.

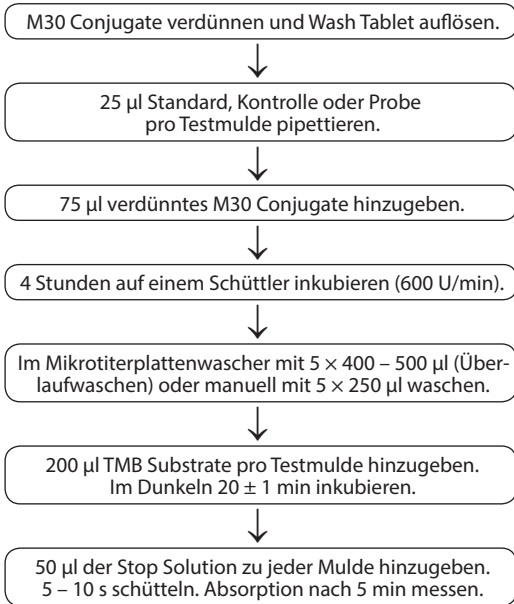
Falls der Kit für verschiedene Anlässe verwendet wird, das verdünnte M30 Con- jugate im Fläschchen bei 2 – 8 °C lagern und vor Licht schützen. Die verdünnte M30 Conjugate-Lösung ist 3 Wochen haltbar. Die aufgelöste Wash Tablet ist bei Lagerung bei 2 – 8 °C 5 Wochen haltbar.

Testprotokoll

Der M30 Apoptosense ELISA muss bei Raumtemperatur (24 ± 3 °C) durchge- führt werden.

1. Vor dem Durchführen des Tests alle Reagenzien auf Raumtemperatur brin- gen. Alle Reagenzien vor Gebrauch mit Hilfe des Wirbelmischers mischen.
2. Wash Tablet in frisch deionisiertem Wasser auflösen (siehe „Verdünnung der Komponenten“).
3. M30 Conjugate mit M30 Conjugate Dilution Buffer verdünnen (siehe „Ver- dünnung der Komponenten“) und mischen.
4. 25 µl M30 Standard (A – G), M30 Control Low, M30 Control High oder Probe pro Mulde pipettieren (Duplikate werden empfohlen).
5. Zugabe von 75 µl der verdünnten M30 Conjugate-Lösung zu jeder Mulde. *Achtung! Die Schritte 4 und 5 müssen ohne Unterbrechung aufeinander fol- gend innerhalb von 20 Minuten durchgeführt werden.*
6. Mulden mit dem Sealing Tape oder einem Deckel für Mikrotiterplatten ab- decken.
7. Vier Stunden auf dem Schüttler inkubieren (Geschwindigkeitseinstellung: 600 U/min).
8. Mikrotiterplatte in einem Mikrotiterplattenwascher fünf Mal mit 400 – 500 µl/Mulde waschen (Überlaufwaschen)
oder
Die Mikrotiterplatte von Hand waschen: Inkubationslösung verwerfen und die Mulden fünf Mal mit 250 µl aufgelöster Wash Tablet waschen. Kreuzkon- tamination zwischen den Mulden vermeiden.
9. Zugabe von 200 µl TMB Substrate zu jeder Mulde. Im Dunkeln bei Raumtemperatur 20 ± 1 Minute inkubieren.
10. Zugabe von 50 µl der Stop Solution zu jeder Mulde. Mikrotiterplatte 5 – 10 Sekunden schütteln, um TMB Substrate und Stop Solution voll- ständig zu vermischen. Mikrotiterplatte vor Ablesen der Absorption 5 Mi- nuten stehen lassen.
11. Bestimmung der Absorption bei 450 nm in einem Absorptionslesegerät für Mikrotiterplatten innerhalb von 30 Minuten und Aufzeichnen der Ergebnisse.
12. Berechnen der Ergebnisse wie im Abschnitt „Berechnung der Analysener- gebnisse“ beschrieben.

Flussdiagramm



Berechnung der Analyseergebnisse

Die Ergebnisse der Absorptionsmessung 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: Kubischer Spline. 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 Serum/Plasma von einer Blutspende verwendet wurde, muss deren M30-Konzentration (U/l) berücksichtigt werden.

Leistungsmerkmale des Tests

Testcharakterisierung

Messbereich: Der Messbereich liegt zwischen 0 und 1.000 U/l.

Hochdosiseffekt: Unterhalb von 195.000 U/l tritt kein Hochdosiseffekt auf.

Reproduzierbarkeit: Für Proben > 200 U/l beträgt die Intra-Assay-Abweichung (Intra-Assay % VK) < 10 % und die Inter-Assay-Abweichung (Inter-Assay % VK) beträgt < 10 %.

Empfindlichkeit: Die nachweisbare Mindestkonzentration von K18Asp396-Neopitop in M30 Apoptosense ELISA liegt bei 20 U/l. Sie ist definiert als die M30-Konzentration, die dem Absorptionswert der zweifachen Standardabweichung vom Absorptionswert des Standards 0 U/l entspricht.

Quantifizierungsgrenze: Die niedrigste Konzentration, bei der der Analyt in der Probenmatrix mit ausreichender Genauigkeit und Präzision gemessen werden kann, beträgt 40 U/l.

Wiederfindung: Wiederfindung vom hohem Standard in menschlichen Blutproben: 109 % (Durchschnitt) und 98 – 120 % (Bereich).

Linearität/Verdünnung: Wiederfindung von menschlichem Serum bei einer Verdünnung im M30 Standard A (0 U/l): 107 % (Durchschnitt) und 99 – 122 % (Bereich).

Referenzbereich: Im Serum von 200 schwedischen Blutspendern lag der Medianwert bei 94 U/l und der 95. Perzentil bei 251 U/l. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich festlegt.

Kalibrierung des Standards

Die mit dem M30 Apoptosense ELISA gemessenen Einheiten sind in Bezug auf Serumproben definiert, zu denen natives Antigen zugegebenes wurde. Das native Antigen wird in Bezug auf einen rekombinanten Proteinstandard kalibriert. 1 U/l = 1,24 pM. *Achtung!* Infolge der unterschiedlichen Testpuffer kann Standardmaterial nicht zwischen unterschiedlichen Peviva-Kits ausgetauscht werden.

Interne Qualitätskontrolle

Die gelieferten Controls Low und High mit ihren jeweiligen Konzentrationen sollten für die Gewährleistung der Effizienz des Tests ausreichen. Bei jedem Test sind 2 Kontrollen mitzuführen.

Wird diese Vorgehensweise nicht als ausreichend angesehen, muss das Labor seine eigenen Kontrollen an Hand der Richtlinien in Abschnitt „*In vitro*-Probengewinnung und -Handhabung für die Forschung“ oder durch individuelle Laborroutinen herstellen. Diese Kontrollen müssen in aliquoten Mengen eingefroren werden und sind bei jedem Test gleich zu behandeln.

Grenzen der Methode

Der klinische Nutzen der Messung von ccK18 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 stören den Test nicht.

Literaturhinweise

1. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

Weitere Literaturhinweise und Informationen finden Sie auf unserer Webseite unter www.peviva.com/de/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 M30 Apoptosense® ELISA

Résumé

Explication des symboles utilisés sur les étiquettes	42
Marques déposées	42
Brevets	42
Transport et conservation	42
Description du test	43
Utilisation prévue	43
Résumé et explication du test	43
Matériel fourni pour 96 mesures	44
Matériel requi mais non fourni	45
Protocole de test	45
Avertissements et précautions	45
Collecte et préparation des spécimens sanguins	45
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	48
Méthode d'analyse	48
Organigramme	49
Calcul des résultats de l'analyse	50
Performance du test	50
Caractéristiques de performance	50
Traçabilité de l'étalon	50
Contrôle interne de qualité	51
Limites de la procédure	51
Références	51
Garantie	51

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

Brevets

Brevet européen numéro EP 1 019 438.

Brevets américains numéro 6,296,850 et 6,716,968 et 6,706,488.

Brevet japonais numéro 4372340.

Brevet canadien numéro 2305681.

Transport et conservation

Le test M30 Apoptosense[®] ELISA doit être transporté au frais et conservé entre 2 et 8 °C. *Remarque* : ne pas congeler !

Description du test

Utilisation prévue

M30 Apoptosense® ELISA est un test immunologique *in vitro* en une seule étape permettant de mesurer le taux sérique et plasmatique de kératine 18 après clivage par la caspase (cck18, K18Asp396 ou néo-épitope M30) associé à l'apoptose.

Résumé et explication du test

Au cours de l'apoptose, les caspases clivent diverses protéines cellulaires. Dans les cellules épithéliales, l'un de ces substrats est la protéine filamenteuse intermédiaire appelée kératine 18 (K18). L'anticorps M30 reconnaît un néo-épitope exposé suite au clivage de K18 par la caspase après le résidu acide aspartique 396 (réf. 1). Le clivage à cette position a lieu en début d'apoptose sous l'action de la caspase-9 et pendant la phase d'exécution sous l'action de la caspase-3 et de la caspase-7 (réf. 2).

Le test M30 Apoptosense ELISA mesure la concentration de fragments solubles de K18 (cck18) clivés par la caspase et contenant le néo-épitope K18Asp396. Après induction de l'apoptose des cellules épithéliales, on observe tout d'abord une augmentation du taux de cck18 dans les extraits cellulaires. Il se produit ensuite une libération d'antigènes dans le compartiment extracellulaire, dû à une nécrose secondaire des corps apoptotiques. L'augmentation de cck18 pendant l'apoptose est contrée par l'inhibiteur de caspase zVAD-fmk (réf. 3).

Le test M30 Apoptosense ELISA peut être utilisé en association avec le test M65® ELISA (PEVIVA produit N° 10020) qui mesure la concentration totale de K18. La combinaison des deux tests permet d'évaluer le mode de mort cellulaire (réf. 4).

Après clivage par la caspase, le test M30 Apoptosense ELISA permet de détecter le K18 humain mais pas celui de la souris, du rat ou du chien (réf. 5). Le test M30 Apoptosense ELISA détecte spécifiquement l'apoptose de cellules tumorales chez la souris ou le rat porteur de xénogreffes de tumeurs humaines (réf. 5).

Le test M30 Apoptosense ELISA est utilisé pour la recherche, dans le cadre d'études et du diagnostic cliniques dans les domaines de l'oncologie, de l'hépatologie et de la transplantation.

Principe de la méthode

Le test M30 Apoptosense ELISA est un dosage immuno-enzymatique de type « sandwich » sur phase solide. Les étalons, les témoins et les échantillons réagissent avec un anticorps capteur M5 sur phase solide, dirigé contre K18, et

l'anticorps M30 conjugué au HRP (peroxydase du raifort), dirigé contre le néo-épitope K18Asp396. Une étape de lavage permet d'éliminer le conjugué non lié. Le substrat TMB est ajouté. Le développement de la couleur est stoppé puis l'absorbance est lue. La couleur résultante est directement proportionnelle à la concentration de l'analyte.

En établissant une courbe étalon où l'absorbance mesurée est fonction de concentrations connues, il est possible de calculer la quantité d'antigènes dans l'échantillon. La concentration d'antigènes est exprimée en unités par litre (U/L).

Matériel fourni pour 96 mesures

M5 Coated Microstrips : une microplaque de 96 puits secs (12 × 8). Les puits sont tapissés d'anticorps monoclonaux murins M5 anti-K18. 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 !*

M30 Conjugate : concentré (24 ×). Une ampoule contenant 0,4 mL d'anticorps monoclonaux murins M30 (anti néo-épitope K18Asp396) conjugué avec de la peroxydase de raifort (HRP) dans un tampon phosphate contenant des stabilisateurs de protéines. Doit être dilué avec M30 Conjugate Dilution Buffer. Conservateur ajouté. *Remarque* : ne pas exposer à la lumière !

M30 Conjugate Dilution Buffer : une ampoule contenant 11 mL de solution tampon phosphate avec stabilisateurs de protéines pour la dilution du M30 Conjugate. Conservateur ajouté. De couleur bleue. *Prêt à l'emploi !*

M30 Standards A–G : standard A contenant 2 mL de tampon phosphate additionné de SVF (sérum de veau fœtal). Standards B–G, de 0,5 mL chacun, contenant un échantillon étalon dans un tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des Standards A–G sont 0, 75, 150, 250, 500, 750 et 1 000 U/L, respectivement. Conservateur ajouté. De couleur jaune. *Prêt à l'emploi !* L'étalon A peut être utilisé pour les dilutions d'échantillons > 1 000 U/L.

M30 Controls Low & High : deux ampoules de 0,5 mL contenant des réactifs dans du tampon phosphate additionné de SVF. Les concentrations des M30 Controls Low & High sont indiquées sur leurs flacons respectifs. 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 substrat TMB (3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine). *Remarque* : ne pas exposer à la lumière ! *Prêt à l'emploi !*

Stop Solution : un flacon contenant 7 mL d'acide sulfurique à 1,0 M. *Prêt à l'emploi !*

Sealing Tape : une (1) feuille.

Mode d'emploi.

Certificat d'analyse.

Matériel requis mais non fournis

- Lecteur de microplaques (longueur d'onde de 450 nm ; OD linéaire 0 – 3)
- Agitateur de microplaques (oscillation : 600 tr/min, orbite : 1,5 – 4 mm)
- Appareil de lavage pour microplaques 96 puits ou pipette multicanaux (volume 250 µL)
- Mixeur Vortex
- Pipettes de précision : 25, 50, 75 et 200 µL
- Cylindre gradué (500 mL)
- Eau déionisée

Protocole de test

Fr

Avertissements et précautions

1. Le kit M30 Apoptosense ELISA est uniquement destiné à l'utilisation *in vitro*.
2. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de kit.
3. Tous les échantillons de patients doivent être considérés comme infectieux et manipulés et éliminés selon la réglementation en vigueur.
4. Ne pas utiliser les échantillons contaminés.
5. La Stop Solution contient de l'acide sulfurique à 1,0 M, néfaste pour les yeux et susceptible de provoquer une irritation de la peau. En cas de contact, laver abondamment et demander l'avis d'un médecin.
6. Les feuilles de sécurité (MSDS) sont disponibles sur le site www.peviva.com ou sur demande.

Collecte et préparation des spécimens sanguins

Le volume de l'échantillon doit être suffisant pour mesurer chaque échantillon en duplicats (volume de test : 2 × 25 µL). Les donneurs ne sont pas tenus d'être à jeun avant 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 avant de séparer le sérum des cellules.

Plasma : le test M30 Apoptosense ELISA peut également être utilisé pour des échantillons de plasma (EDTA ou héparine).

Remarque : pour un même projet, on devra utiliser le même type de matériel biologique, c'est-à-dire de sérum ou de plasma collecté par une méthode donnée. Pour plus d'informations sur la performance du test M30 Apoptosense ELISA selon les différents types d'échantillons utilisés, veuillez consulter le site www.peviva.com.

Conserver les échantillons 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 et décongelés sans perte d'activité, mais il est recommandé d'éviter toute congélation-décongélation répétée. Concernant la dilution des échantillons, voir la section « Caractéristiques de performance ».

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

Le test M30 Apoptosense ELISA a été utilisé pour des applications relatives à la culture cellulaire dans un certain nombre d'études publiées (voir les références sur www.peviva.com). Peviva a développé un produit spécifique destiné à la culture cellulaire *in vitro*, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA produit N° 10900). Ce produit possède une gamme dynamique et une sensibilité appropriées pour les travaux *in vitro*.

Les protocoles suivants peuvent être utilisés pour détecter l'apoptose de cellules en culture dérivées d'épithélium à l'aide du test M30 Apoptosense ELISA.

Préparation des échantillons à partir de cultures cellulaires

Pour de nombreuses applications, il convient de mesurer la réactivité totale de M30 (K18Asp396) en un seul point tardif. Ces mesures permettent une évaluation intégrée de l'apoptose. Afin de doser l'ensemble des fragments cck18 dans les milieux de culture cellulaire et les extraits cellulaires, ajouter un détergent non ionique directement aux cellules dans leur milieu de culture.

Jour 1 : ensemencer les cellules. La densité d'ensemencement doit être déterminée en fonction du type de cellules et de la nature de l'agent cytotoxique ; 5 000 à 10 000 cellules par puits donnent en général une densité adaptée pour une microplaque de 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 : pour des microplaques de 96 puits contenant 200 µL de milieu par puits, ajouter 10 µL de NP-40 à 10 % par puits. Agiter pendant 5 minutes à température ambiante sur un agitateur rotatif jusqu'à obtention de la lyse. Mélanger doucement par aspiration/expulsion à l'aide d'une pipette, en prenant garde d'éviter la formation de bulles d'air, puis transférer 2 × 25 µL de milieu/lysate dans les puits M5 Coated Microstrips.

Préparation des échantillons à partir des surnageants de cultures cellulaires

Les tests M30 Apoptosense ELISA et M65® ELISA peuvent être utilisés pour évaluer le mode de mort cellulaire en calculant le rapport M30:M65 (réf. 3). Ces mesures doivent être effectuées à partir du milieu surnageant ! Le rapport doit être calibré pour chaque lignée de cellules de carcinome à l'aide de témoins appropriés, c'est-à-dire d'agents connus pour induire l'apoptose (ex. : agents génotoxiques, staurosporine) et/ou la nécrose essentiellement (ex. : oligomycine/privation de glucose ou peroxyde d'hydrogène).

Jour 1/Jour 2 : ensemencer les cellules, puis laver et ajouter les agents comme indiqué ci-dessus.

Jour 2-4 : recueillir le milieu de l'échantillon de chaque puits. Afin d'éviter les effets de dessèchement, il est recommandé de ne pas effectuer plusieurs prélèvements à partir du même puits. Centrifuger le milieu et recueillir le surnageant sans cellules. *Remarque :* éviter de recueillir des cellules.

On utilisera 2 × 25 µL d'échantillons 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. Éviter toute congélation-décongélation répétée.

Préparation des composants

Dilution du M30 Conjugate

Diluer le M30 Conjugate avec M30 Conjugate Dilution Buffer. Le flacon de M30 Conjugate contient exactement 400 µL. Ajouter 9,2 mL de M30 Conjugate Dilution Buffer directement au flacon de M30 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 G (1 000 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.

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 omettre d'inclure le desséchant.

Le TMB Substrate et le M30 Conjugate sont sensibles à la lumière et aux ions métaux et doivent toujours être conservés entre 2 et 8 °C dans les bouteilles ambrées d'origine 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 M30 Conjugate dilué dans le flacon entre 2 et 8 °C. Ne pas exposer à la lumière. La solution diluée de M30 Conjugate reste stable pendant 3 semaines.

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

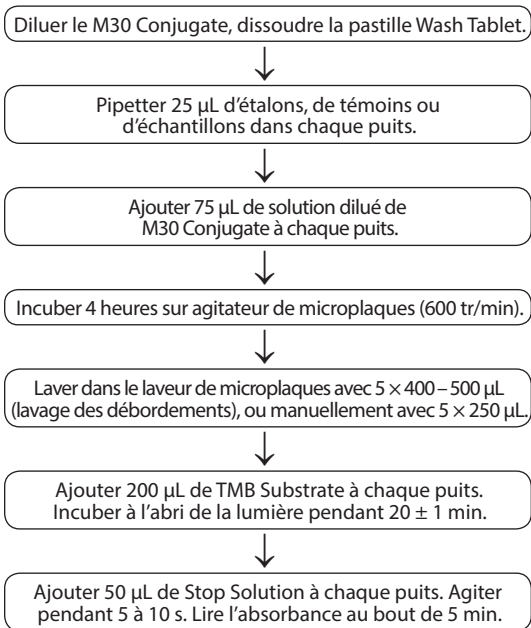
Méthode d'analyse

Le test M30 Apoptosense 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 Solution avec de l'eau fraîche déionisée (voir « Préparation des composants »).
3. Diluer le M30 Conjugate avec M30 Conjugate Dilution Buffer (voir « Préparation des composants ») puis mélanger.
4. Pipetter 25 µL de M30 Standards (A – G), de M30 Control Low, de M30 Control High ou d'échantillons par puits (il est recommandé de faire des duplicats).
5. Ajouter 75 µL de solution diluée de M30 HRP Conjugate à chaque puits. *Remarque : les étapes 4 et 5 doivent être exécutées de manière séquentielle et sans interruption dans un délai de 20 minutes.*
6. Couvrir les puits avec du film adhésif ou un couvercle de microplaque.
7. Incuber sur un agitateur pendant quatre (4) heures. Réglage de la vitesse : 600 tr/min.
8. Laver la plaque cinq fois dans un laveur de microplaques avec 400 – 500 µL/puits (lavage des débordements).
ou
Laver la plaque manuellement, en éliminant la solution d'incubation puis en lavant les puits cinq (5) fois avec 250 µL de la solution de la pastille Wash Tablet. Éviter toute contamination d'un puits à l'autre.
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 à 10 secondes. Laisser reposer la microplaque pendant 5 minutes avant de lire l'absorbance.
11. Déterminer l'absorbance à 450 nm avec un lecteur de microplaques dans un délai de 30 minutes et noter les résultats.
12. Calculer les résultats comme indiqué dans la section « Calcul des résultats de l'analyse ».

Organigramme



Calcul des résultats de l'analyse

Les résultats du test M30 Apoptosense ELISA sont calculés à l'aide de méthodes assistées par ordinateur. Calculer 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 est utilisé, leur taux (U/L) de M30 doit être pris en compte.

Performance du test

Caractéristiques de performance

Plage de mesure : la plage de mesure est de 0 à 1 000 U/L.

Effet de concentration élevée : aucun effet de concentration élevée n'est observé jusqu'à 195 000 U/L.

Reproductibilité : la variation intra-essai (% CV intra-essai) est < 10 % et la variation inter-essai (% CV inter-essai) est < 10 % pour les échantillons > 200 U/L.

Sensibilité : la concentration minimale détectable de néo-épitope K18Asp396 dans le test M30 Apoptosense ELISA est de 20 U/L, définie comme étant la concentration de M30 correspondant à l'absorbance à deux écarts-types de l'absorbance du Standard 0 U/L.

Recouvrement d'échantillons dopés : Recouvrement d'étalon de concentration élevée utilisé pour doper des échantillons de sang humain : 109 % (moyenne) et 98 – 120 % (plage).

Linéarité/Dilution : récupération de sérums humains dilués dans M30 Standard A (0 U/L) : 107 % (moyenne) et 99 – 122 % (plage).

Plage de référence : dans le sérum de 200 donneurs de sang suédois, la médiane était de 94 U/L et le 95^e percentile était de 251 U/L. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse sa propre plage de référence.

Traçabilité de l'étalon

Les unités mesurées par le test M30 Apoptosense 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. 1 U/l = 1,24 pM (réf. 8). *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

Les Controls Low & High fournis avec leurs concentrations devraient suffire pour assurer la bonne performance du test et devront être utilisés au moins en deux 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 individuelles 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 cck18 dans des échantillons de sang humain en tant qu'indicateurs de pronostic 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.

Fr

Références

1. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, Exp Cell Res. 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

Pour de plus amples références ou d'informations, veuillez consulter le site www.peviva.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 del kit ELISA M30 Apoptosense®

Indicazione del contenuto

Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette	54
Marchi	54
Brevetti	54
Trasporto e conservazione	54
Descrizione del test	55
Scopo proposto	55
Sommaio e spiegazione del test	55
Principio del procedimento	55
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	57
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[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] e PEVIVA[®] sono marchi registrati di VLVbio (Vivalavida AB)

Brevetti

Numero di brevetto europeo EP 1 019 438.

Numero di brevetto USA 6,296,850 e 6,716,968 e 6,706,488.

Numero di brevetto Giapponese 4372340.

Numero di brevetto canadese 4372340.

Trasporto e conservazione

Il kit ELISA M30 Apoptosense[®] 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

Il kit ELISA M30 Apoptosense® è un metodo immunologico diretto *in vitro* per la determinazione quantitativa del neoepitopo cck18, K18Asp396 o M30, associato ad apoptosi, nel siero e nel plasma.

Sommario e spiegazione del test

Durante l'apoptosi, le caspasi separano diverse proteine cellulari. Nelle cellule epiteliali, uno di quei substrati è la cheratina 18 (K18), una proteina dei filamenti intermedi. L'anticorpo M30 riconosce un neoepitopo di K18 esposto a seguito di clivaggio ad opera di caspasi dopo il residuo di acido aspartico 396 (Ref. 1). Il taglio proteolitico in questa posizione è eseguito dalla caspasi9, nella fase iniziale dell'apoptosi, e dalle caspasi3 e 7, nella fase di esecuzione (Ref. 2).

Il kit ELISA M30 Apoptosense misura il livello dei frammenti solubili tagliati dalla caspasi della K18 (cck18) contenenti il neoepitopo K18Asp396. Dopo l'induzione dell'apoptosi nelle cellule epiteliali, si osservano in prima istanza aumenti di cck18 negli estratti cellulari. Il rilascio dell'antigene nel compartimento extracellulare si verifica in un secondo tempo ed è dovuto alla necrosi secondaria dei corpi apoptotici. L'aumento di cck18 nel corso dell'apoptosi è inibito dall'inibitore della caspasi zVAD-fmk (Ref. 3).

ELISA M30 Apoptosense può essere usato in combinazione con ELISA M65® (PE-VIVA Prod. No 10020) che quantifica la K18 totale. La combinazione delle due analisi è utile per una valutazione della modalità di morte cellulare (Ref. 4).

ELISA M30 Apoptosense individua il neoepitopo di K18 prodotto nell'uomo dal clivaggio della caspasi, ma non riconosce quello formatosi in topi, ratti o cani (Ref. 5). ELISA M30 Apoptosense individuerà, nello specifico, l'apoptosi del tumore nei topi o ratti portatori di tumore xenotrapiantato (Ref. 5).

ELISA M30 Apoptosense è utilizzato per la ricerca e la sperimentazione clinica nei campi dell'oncologia, epatologia, trapianti e sepsi.

Principio del procedimento

ELISA M30 Apoptosense 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 M30 coniugato con HRP (perossidasi di rafano), diretto contro il neoepitopo K18Asp396. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio. Si aggiunge il substrato

It

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, 96 pozzetti asciutti (12 × 8). 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!*

M30 Conjugate: concentrato (24 × conc). Una fiala contiene 0,4 ml di anticorpo monoclonale M30 di topo (anti-K18Asp396 neoepitopo) coniugato con perossidasi di rafano (HRP) in tampone fosfato con stabilizzante di proteine. Deve essere diluito con M30 Conjugate Dilution Buffer. Conservanti aggiunti. *Nota!* Non esporre alla luce!

M30 Conjugate Dilution Buffer: una fiala contiene 11 ml di tampone fosfato con stabilizzanti di proteine per la diluizione di M30 HRP Conjugate. Conservanti aggiunti. Di colore blu. *Pronto per l'uso!*

M30 Standards A–G: lo Standard A contiene 2 ml di tampone fosfato con siero fetale bovino. Gli Standards B–G, 0,5 ml ciascuno, contengono materiale standard in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori degli Standard A–G sono 0, 75, 150, 250, 500, 750 e 1.000 U/L, rispettivamente. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!* Lo Standard A può essere utilizzato per diluizioni dei campioni > 1.000 U/L.

M30 Control Low & High: due fiale da 0,5 ml contenenti componenti reattivi in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori dei M30 Controls Low e High sono indicati sulle rispettive fiale. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!*

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

Stop Solution: una fiala contiene 7 ml di 1,0 M acido solforico. *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.

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: 1,5–4 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 (500 ml)
- Acqua deionizzata

Procedimento del test

Precauzioni e avvertenze

1. Il kit ELISA M30 Apoptosense 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 può causare irritazione della pelle ed è dannoso per gli occhi. In caso di contatto, risciacquare abbondantemente con acqua e consultare un medico.
6. Le schede di sicurezza (MSDS) sono disponibili al sito www.peviva.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) e separare il siero dalle cellule.

Plasma: ELISA M30 Apoptosense può essere usato anche per campioni di plasma (EDTA o eparina).

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 M30 Apoptosense con diversi tipi di campione, si prega di consultare www.peviva.com.

Conservare i campioni a 2–8 °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. 6, 7), ma si raccomanda di evitare cicli ripetuti e non necessari di ricongelamento-scongelamento. Per la diluizione dei campioni, si veda la sezione "Caratteristiche delle prestazioni".

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

ELISA M30 Apoptosense è stato utilizzato per applicazioni di colture cellulari in un certo numero di studi pubblicati (per i riferimenti andar al sito www.peviva.com). Peviva ha sviluppato un prodotto specifico per la coltura delle cellule *in vitro*, *M30 CytoDeath™ ELISA* (PEVIVA Prod No 10900). Questo prodotto ha un intervallo dinamico e una sensibilità tali da essere adatto per i lavori *in vitro*.

Per il rilevamento dell'apoptosi di cellule derivate da colture epiteliali con ELISA M30 Apoptosense, si possono utilizzare i seguenti procedimenti.

Preparazione del campione da colture cellulari

Per molte applicazioni conviene misurare la reattività totale a M30 (ccK18) in un singolo punto tardivo. Queste misure riflettono una valutazione integrata dell'apoptosi. Per determinare i frammenti cck18 totali nei mezzi di coltura cellulare e negli estratti cellulari, aggiungere un detergente non-ionico direttamente alle cellule nel mezzo di coltura.

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: Per piastre da 96 pozzetti contenenti 200 µl di mezzo per pozzetto, aggiungere 10 µl di NP 40 10 % per pozzetto. Lasciare lisare le cellule agitando la piastra con un agitatore a rotazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Si raccomanda di miscelare delicatamente, pipettando i campioni, facendo attenzione a non creare bolle d'aria; trasferire quindi 2 × 25 µl di mezzo/lisato nei pozzetti di un M30 Coated Microstrips.

Preparazione del campione da sovranatanti di colture cellulari

ELISA M30 Apoptosense e ELISA M65® possono essere impiegati per stabilire la modalità di morte cellulare mediante il calcolo di un "rapporto M30:M65" (Ref. 3). Tali misurazioni devono essere eseguite usando i sovranatanti! Il rapporto deve essere calibrato per ogni linea cellulare di carcinoma mediante controlli appropriati: noti induttori di apoptosi (p. es. agenti genotossici, staurosporina) e/o principalmente di necrosi (p. es. oligomicina/privazione del glucosio o acqua ossigenata).

Giorno 1/Giorno 2: piastrare le cellule, lavare e aggiungere gli agenti come descritto sopra.

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-scongelo.

Preparazione del componente

Diluizione di M30 HRP Conjugate

Diluire M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer. Una fiala di M30 HRP Conjugate contiene esattamente $400 \mu\text{l}$ di prodotto. Aggiungere $9,2 \text{ ml}$ di M30 Conjugate Dilution Buffer direttamente alla fiala di M30 HRP 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 G ($1\,000 \text{ U/l}$) 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 $2-8^\circ\text{C}$. Se non si utilizzano tutte le strisce, richiudere ermeticamente la busta di microstrisce. Ricordarsi di includere l'essiccante.

TMB Substrate e M30 HRP Conjugate sono sensibili alla luce e agli ioni metallici e devono essere costantemente conservati nelle bottiglie ambrate originali a $2-8^\circ\text{C}$, 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 M30 HRP Conjugate diluito nella fiala a 2–8 °C. Non esporre alla luce. La soluzione diluita M30 Conjugate è stabile per 3 settimane.

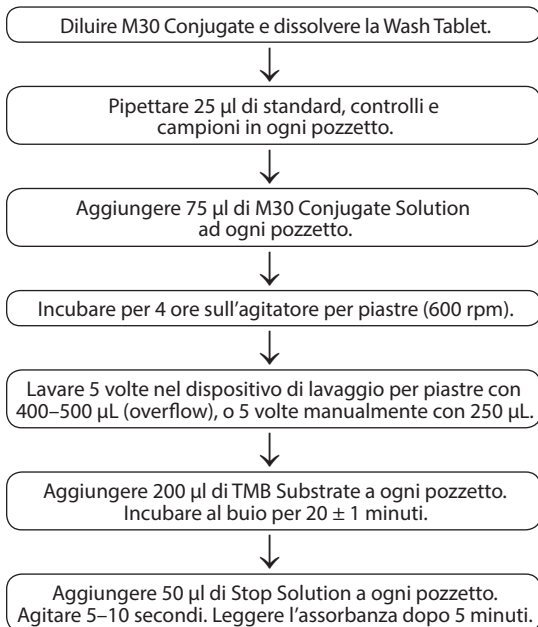
La soluzione preparata della Wash Tablet rimane stabile per 5 settimane se conservata a 2 – 8 °C.

Procedimento del test

Il test con ELISA M30 Apoptosense 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 M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer e mescolare (vedi "Preparazione del componente").
4. Pipettare 25 µl di M30 Standards (A–G), M30 Control Low, M30 Control High e campione per pozzetto (si raccomandano duplicati).
5. Aggiungere 75 µl della soluzione diluita di M30 HRP 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 µl/pozzetto (lavaggio overflow)
oppure
lavare la piastra manualmente, scartando la soluzione di incubazione e lavando i pozzetti cinque (5) volte con 250 µl della soluzione preparata della Wash Tablet. Evitare contaminazioni tra i pozzetti.
9. Aggiungere 200 µl di TMB Substrate a ogni pozzetto. Incubare al buio e a temperatura ambiente per 20 ± 1 minuti.
10. Aggiungere 50 µl 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'assorbenza.
11. Entro 30 minuti, determinare l'assorbenza 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".

Schema del procedimento



Calcolo dei risultati analitici

I risultati del test ELISA M30 Apoptosense 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 come campione diluente, si dovrà tener conto della loro concentrazione (U/L) di "M30".

Prestazioni del test

Caratteristiche delle prestazioni

Intervallo di determinazione: l'intervallo di determinazione è 0–1.000 U/L.

Effetto dovuto a dose alta: non è stato riscontrato alcun effetto da dose alta fino a 195.000 U/L.

Riproducibilità: la variazione all'interno di un test è < 10 % (CV) e la variazione tra test è < 10 % (CV) per campioni > 200 U/L.

Sensibilità: la concentrazione minima misurabile di neoepitopo K18Asp396 con ELISA M30 Apoptosense è 20 U/L, definita come la concentrazione di "M30" corrispondente a un'assorbanza superiore di due deviazioni standard all'assorbanza dello Standard 0 U/L.

Spiking recovery: recupero dello standard alto quando introdotto nei campioni di sangue umano: 109 % (media) e 98 – 120 % (intervallo).

Linearità/Diluizione: recupero da sieri umani diluiti in M30 Standard A (0 U/L): 107 % (media) e 99–120 % (intervallo).

Intervallo di riferimento: nel siero di 200 donatori svedesi, la media era di 94 U/L e il 95° percentile era 251 U/L. Si consiglia che ogni laboratorio definisca il proprio intervallo di riferimento.

Tracciabilità dello standard

Le unità determinate da ELISA M30 Apoptosense sono definite contro antigene nativo introdotto nel siero. L'antigene nativo è calibrato contro uno standard di proteina ricombinante. 1 U/l = 1,24 pM (Ref. 8). *Nota!* A causa di buffer di test diversi, il materiale standard non può essere scambiato tra kit Peviva diversi.

Controllo di qualità interno

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

Se questo procedimento non fosse sufficiente, ciascun laboratorio dovrebbe 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 cck18 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 (= 1.250 mg/dl), itterici (= 12.5 mg/dl) o emolizzati (= 50 mg/dl) non interferiscono con il test.

Letteratura di riferimento

1. Leers *et al.*, *J Pathol.* 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, *Exp Cell Res.* 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, *Cancer Biomarkers* 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, *Ann Oncol* 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, *Eur J Cancer* 39, 2003, 769.

Per ulteriori informazioni, consultare il sito www.peviva.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.

Instrucciones de uso del M30 Apoptosense® ELISA

Resumen

Resumen	65
Explicación de los símbolos utilizados en las etiquetas	66
Marcas comerciales	66
Patentes	66
Envío y almacenamiento	66
Descripción del análisis	67
Objetivo previsto	67
Resumen y explicación de la prueba	67
Principio del método	67
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	69
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
Protocolo del ensayo	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

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[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] y PEVIVA[®] son marcas comerciales registradas de VL:Vbio (Vivalavida AB).

Patentes

Número de patente europea EP 1 019 438.

Patentes estadounidenses números 6.296.850 y 6.716.968 y 6.706.488.

Número de patente japonesa 4372340.

Número de patente canadiense 2305681.

Envío y almacenamiento

El M30 Apoptosense[®] ELISA se envía en condiciones refrigeradas y debe almacenarse a entre 2 y 8 °C. *Nota:* ¡No congelar!

Descripción del análisis

Objetivo previsto

M30 Apoptosense® ELISA es un inmunoanálisis *in vitro* de un paso para la determinación cuantitativa en suero y plasma de queratina 18 degradada por caspasas (ccK18, K18Asp396 o M30 neo-epítipo) relacionada con la apoptosis.

Resumen y explicación de la prueba

Las caspasas degradan varias proteínas intracelulares durante la apoptosis. En las células epiteliales, uno de esos sustratos es la queratina 18 (K18) de los filamentos intermedios. Después de la degradación por caspasa de la K18, el anticuerpo M30 reconoce un neoepítipo expuesto tras el residuo de ácido aspártico en posición 396 (ref. 1). La escisión en esta posición se produce en una fase temprana durante la apoptosis mediada por caspasa 9 y durante la fase de ejecución en la apoptosis mediada por caspasa 3 y caspasa 7 (ref. 2).

M30 Apoptosense ELISA mide la concentración de fragmentos solubles de K18 degradada por caspasa (ccK18) que contienen el neoepítipo K18Asp396. Una vez que se induce la apoptosis en células epiteliales, el incremento de ccK18 se observa primero en los extractos celulares. La liberación del antígeno en el compartimento extracelular se produce posteriormente y se debe a la necrosis secundaria de los cuerpos apoptóticos. El inhibidor de caspasa zVAD-fmk (ref. 3) inhibe el aumento de ccK18 durante la apoptosis.

M30 Apoptosense ELISA se puede usar en combinación con M65® ELISA (PEVIVA Prod. No 10020) que mide la K18 total. La combinación de los dos análisis resulta útil para valorar el modo de muerte celular (ref. 4).

M30 Apoptosense ELISA detecta K18 degradada por caspasa humana, pero no detecta K18 degradada por caspasa de ratón, rata o perro (ref. 5). M30 Apoptosense ELISA detecta específicamente la apoptosis tumoral en ratones o ratas portadores de xenoinjertos tumorales humanos (ref. 5).

M30 Apoptosense ELISA se usa para ensayos de investigación y clínicos en los campos de la oncología, hepatología, trasplantes y sepsis.

Principio del método

M30 Apoptosense ELISA es un enzimoimmunoanálisis 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 M30 contra el neoepítipo K18Asp396 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 de 96 pocillos secos (12 × 8). 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.*

M30 Conjugate: concentrado (24 × conc). Un vial que contiene 0,4 ml de anticuerpo monoclonal M30 de ratón (neoepítipo anti-K18Asp396) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos. Debe diluirse con M30 Conjugate Dilution Buffer. Conservante añadido. *Nota:* ¡No exponer a la luz!

M30 Conjugate Dilution Buffer: un vial que contiene 11 ml de amortiguador fosfato con estabilizadores proteicos para la dilución del M30 HRP Conjugate. Conservante añadido. De color azul. *Listo para usar.*

M30 Standards A–G: Standard A contiene 2 ml de suero bovino fetal con tampón de fosfato. Los Standard B–G, de 0,5 ml cada uno, contienen material estándar en suero bovino fetal con tampón de fosfato. Los valores de los Standard A–G son 0, 75, 150, 250, 500, 750 y 1.000 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.

M30 Controls Low & High: dos viales de 0,5 ml que contienen reactivos en suero bovino fetal con amortiguador fosfato. Los controles bajo (Low) y alto (High) de M30 se indican en los viales respectivos. Conservante añadido. De color amarillo. *Listo para usar.*

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

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

Stop Solution: un vial que contiene 7 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: 1,5–4 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 (500 ml)
- Agua desionizada

Protocolo del ensayo

Advertencias y precauciones

1. El kit M30 Apoptosense 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 puede provocar 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 de materiales (MSDS) están disponibles en www.peviva.com o se pueden solicitar.

Es

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 × 25 µl). 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) al vacío y separe el suero de las células.

Plasma: M30 Apoptosense ELISA también se puede usar para muestras de plasma (tubos con EDTA o heparina).

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 M30 Apoptosense ELISA con distintos tipos de muestras, consulte www.peviva.com.

Guarde las muestras a 2–8 °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. 6, 7), pero se recomienda evitar congelar y descongelarlas repetidas veces. Para la dilución de las muestras, consulte la sección: “Características del rendimiento”.

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

M30 Apoptosense ELISA se ha usado para aplicaciones en cultivo celular en una serie de estudios publicados (consulte las referencias en www.peviva.com). Peviva ha desarrollado un producto específico para cultivos celulares *in vitro*, **M30 CytoDeath™ ELISA** (n.º de producto de PEVIVA 10900). Este producto tiene un intervalo dinámico y una sensibilidad adecuada para el trabajo *in vitro*.

Se pueden usar los siguientes protocolos para la detección de apoptosis de células cultivadas derivadas epitelialmente usando M30 Apoptosense ELISA.

Preparación de muestras de cultivos celulares

Para muchas aplicaciones resulta ventajoso medir la reactividad de M30 total (cck18) en un momento único y tardío. Dichas mediciones reflejan una valoración integrada de la apoptosis. Para analizar el total de los fragmentos de cck18 en medios de cultivo celular y en extractos celulares, añada detergente no iónico directamente al medio de cultivo.

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: para placas de 96 pocillos que contienen 200 µl de medio por pocillo, añada 10 µl de NP 40 al 10 % por pocillo. Para que se produzca la lisis, coloque las placas en un agitador rotatorio durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mezclar suavemente con la pipeta y teniendo cuidado de no crear burbujas de aire y traslade 2 × 25 µl del medio/lisado a los pocillos de M30 Coated Microstrips.

Preparación de muestras de sobrenadantes de cultivos celulares

M30 Apoptosense ELISA y M65® ELISA se pueden usar para valorar el modo de muerte celular calculando la relación M30:M65 (ref. 3). Dichas mediciones deben llevarse a cabo usando el medio sobrenadante. La relación se debe calibrar para cada línea celular de carcinoma usando los controles apropiados; es decir, agentes que se sabe que inducen la apoptosis (por ej.: agentes genotóxicos, estauro-

sporina) y/o principalmente la necrosis (por ej.: oligomicina/carencia de glucosa o peróxido de hidrógeno).

Día 1/Día 2: siembre las células, lávelas y añada los agentes como se ha descrito anteriormente.

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 × 25 µl 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 °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 M30 HRP Conjugate

Diluya M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer. El vial de M30 HRP Conjugate contiene exactamente 400 µl. Añada 9,2 ml de M30 Conjugate Dilution Buffer directamente al vial de M30 HRP 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 G (1.000 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 M30 HRP 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 Substrate no se puede utilizar después de haber estado expuesto a la luz.

Si el kit se usa en varias ocasiones, guarde M30 Conjugate en el vial a 2–8 °C. No exponer a la luz. La solución diluida de M30 Conjugate es estable durante 3 semanas.

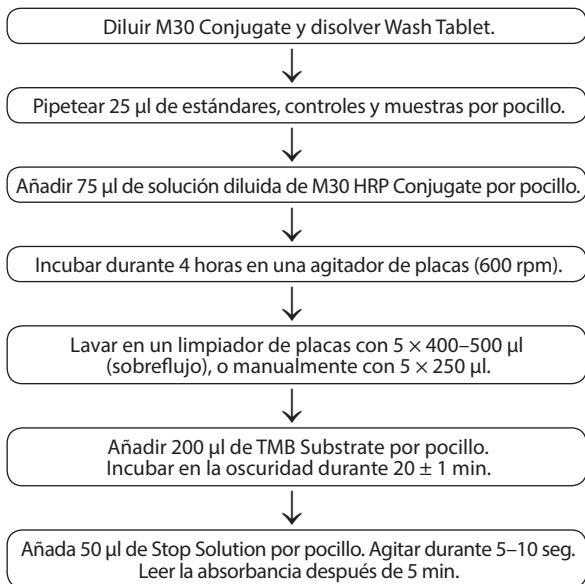
La solución de lavado preparada es estable durante 5 semanas cuando se guarda a 2 – 8 °C.

Protocolo del ensayo

El test M30 Apoptosense 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 M30 HRP Conjugate con M30 Conjugate Dilution Buffer y mézclelos (consulte “Preparación de los componentes”).
4. Pipetee 25 µl por pocillo de M30 Standard (A–G), de M30 Control Low y M30 Control High o de las muestras (se recomienda tener duplicados).
5. Añada 75 µl de la solución diluida de M30 HRP 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 microaloración.
7. Incube cuatro (4) horas en el agitador. Ajuste de velocidad: 600 rpm.
8. Lave la placa en un limpiador de placas cinco veces con 400–500 µl/pocillo (lavado de sobreflujo)
o
Lave la placa manualmente, descartando la solución de incubación y lavando los pocillos cinco (5) veces con 250 µl de la solución de lavado preparada diluida. 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”.

Flujograma



Es

Cálculo de resultados analíticos

Los resultados de M30 Apoptosense 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 de M30 (U/l).

Funcionamiento del análisis

Características del rendimiento

Intervalo de medición: el intervalo de medición es 0–1.000 U/l.

Efecto de dosis alta: no se produce un efecto de dosis alta hasta las 195.000 U/l.

Reproducibilidad: la variación intraanalítica (WA % CV) es < 10 % y la variación interanalítica (BA % CV) es < 10 % para muestras > 200 U/l.

Sensibilidad: la concentración mínima detectable del neoepítipo K18Asp396 en M30 Apoptosense ELISA es de 20 U/l, definida como la concentración de M30 que corresponde a la absorbancia a dos desviaciones estándar con respecto a la absorbancia del Standard 0 U/l.

Ensayo de recuperación: Recuperación de High Standard en muestras de sangre humana: 109 % (promedio) y 98 – 120 % (intervalo).

Linealidad/dilución: recuperación en suero humano cuando se diluye en M30 Standard A (0 U/l): 107 % (promedio) y 99–122 % (intervalo).

Intervalo de referencia: En suero de 200 donantes de sangre suecos, la mediana fue de 94 U/l y el percentil 95 fue de 251 U/l. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

Trazabilidad del estándar

Las unidades medidas por M30 Apoptosense ELISA se definen frente a un antígeno nativo en el suero. El antígeno nativo se calibra frente a un estándar proteico recombinante. 1 U/l = 1,24 pM. *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 controles bajo (Low) y alto (High) suministrados con sus concentraciones dadas son suficientes para garantizar el funcionamiento de los análisis y se recomienda que se empleen, al menos, por duplicado cada vez que se realice el análisis.

Si este procedimiento no es suficiente, cada laboratorio deberá 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 ccK18 como indicador pronóstico ni para el tratamiento de pacientes sometidos a regímenes de terapia.

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

Referencias bibliográficas

1. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, Exp Cell Res. 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

Para ver otras referencias, consulte www.peviva.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.

Es

Instruções de utilização para o kit M30 Apoptosense® ELISA

Conteúdos

Explicação dos símbolos utilizados nos rótulos	78
Marca Registada	78
Patentes	78
Transporte e Armazenamento	78
Descrição do Ensaio	79
Finalidade	79
Sumário e explicação do teste	79
Princípio do Método	79
Materiais fornecidos para 96 determinações	80
Materiais Necessários não fornecidos	81
Protocolo do Ensaio	81
Avisos e Precauções	81
Colheita e preparação de amostras de sangue	81
Colheita e Preparação de amostras para uso exclusivo em Investigação	82
Preparação dos componentes	83
Armazenamento e data de validade após abertura	83
Procedimento do Ensaio	84
Fluxograma	85
Cálculo e análise dos resultados	85
Desempenho do ensaio	86
Características do desempenho	86
Rastreabilidade dos calibradores	86
Controlo de Qualidade Interno	86
Limitações do método	87
Referências Bibliográficas	87
Garantia	87

Explicação dos símbolos utilizados nos rótulos



Referência



Contém reagentes suficientes para <n> testes



Lote



Fabricante



Gama de Temperatura



Usado por



Consultar Instruções de Utilização

Marca Registada

M30[®], Apoptosense[®], M65[®], EpiDeath[®] e PEVIVA[®] são marcas registadas da VLVbio (Vivalavida AB).

Patentes

Número da patente europeia: EP 1 019 438.

Números das patentes dos E.U.A.: 6,296,850 e 6,716,968 e 6,706,488.

Número da patente canadiana: 2305681.

Número da patente japonesa: 4372340.

Transporte e Armazenamento

O kit M30 Apoptosense[®] ELISA é transportado em condições refrigeradas e deve ser armazenado de 2 a 8 °C. **Nota!** Não congelar!

Descrição do Ensaio

Finalidade

O kit M30 Apoptosense ELISA é imunoensaio para a determinação quantitativa da apoptose – associada à “caspase-cleaved” keratin 18 (ccK18, K18Asp396 ou M30 neo-epitopo), no soro e no plasma.

Sumário e explicação do teste

As caspases fazem a clivagem de várias proteínas celulares durante a apoptose. Nas células epiteliais, um dos substratos é um filamento intermediário da proteína citoqueratina 18 (K18). O anticorpo M30 reconhece o neo-epitopo exposto após a clivagem pela caspase do K18, depois do resíduo 396 do ácido aspártico (ref. 1). A clivagem nesta posição ocorre durante a apoptose através da caspase 9 e durante a fase de activação da caspase 3 e caspase 7 (ref.2).

O kit M30 Apoptosense ELISA mede os níveis solúveis dos fragmentos de K18, após clivagem pela caspase, que contém o neo-epitopo K18Asp396. Após a indução da apoptose das células epiteliais, o aumento de ccK18 é primeiramente observado nos extractos celulares. A libertação do antigénio no compartimento extracelular ocorre à posteriori e deve-se à necrose secundária dos corpos apoptóticos. O aumento do ccK18 durante a apoptose é inibido pelo caspase-inibidor zVAD-fmk (ref. 3).

O M30 Apoptosense ELISA pode ser utilizado em combinação com M65 ELISA (PEVIVA Prod. No. 10020) que mede a K18 total. A combinação dos dois imunoensaios é útil na abordagem do modo da morte celular (ref. 4).

O kit M30 Apoptosense ELISA detecta o K18 humano clivado pela caspase, mas não detecta o K18 de rato, ratinho ou canino clivado pela caspase (ref. 5). O kit M30 Apoptosense ELISA detecta especificamente a apoptose de tumores em ratos ou ratinhos com tumores humanos xeno enxertados.

M30 Apoptosense ELISA é para ser utilizado em investigação, diagnóstico clínico e estudos clínicos nas áreas oncológicas, hepatológicas e transplantação.

Princípio do Método

O M30 Apoptosense ELISA é um imunoensaio enzimático tipo sandwich de fase sólida. Os calibradores, controlos e amostras reagem com o anticorpo de captura M5 específico para K18 e com o anticorpo M30 conjugado com peroxidase de rábano específico para o neo-epitopo K18Asp396. O conjugado não ligado é removido no passo de lavagem. O substrato TMB é adicionado.

O desenvolvimento de cor é parado por adição da solução stop e a absorvância lida. A cor resultante é directamente proporcional à concentração do analito.

A curva de calibração é traçada num gráfico com a concentração dos calibradores conhecida vs a absorvância lida, a quantidade de antigénio na amostra pode ser calculada. A concentração do antigénio é expressa em unidades por litro (U/L).

Materiais fornecidos para 96 determinações

M5 Coated Microstrips: uma microplaca, 12 tiras cada com 8 poços, 96 poços secos no total. Os poços estão revestidos com anticorpo de ratinho monoclonal anti-K18. A microplaca está selada numa bolsa de alumínio, com exsicante no seu interior. As tiras que não forem utilizadas, deverão ser guardadas na bolsa com o exsicante. *Pronto a usar!*

M30 Conjugate: Concentrado (24 × conc). 1 frasco com 0,4 ml de anticorpo de ratinho monoclonal anti-M30 (anti-K18Asp396 neo-epitope) conjugado com peroxidases de rábano (HRP) em tampão fosfato com proteínas estabilizadoras. Conservantes adicionados. O M30 Conjugate deve ser diluído com o M30 Conjugate Dilution Buffer. *Nota:* não expor à luz!

M30 Conjugate Dilution Buffer: 1 frasco com 11 ml de tampão fosfato com proteínas estabilizadoras para diluição do M30 Conjugate. Conservantes adicionados. Cor azul.

M30 Standard A – G: Calibradores A contendo 2 ml de tampão fosfato com soro fetal de vitela (FCS). Calibradores B – G, 0,5 ml cada contendo material de calibração em tampão de fosfato com FCS. Os valores dos calibradores A – G são 0, 75, 150, 250, 500, 750 e 1 000 U/L, respectivamente. Conservantes adicionados. Cor amarela. *Pronto a usar!* Standard A pode ser utilizado para diluir amostras > 1 000 U/L.

M30 Control Low & High: 2 frascos contendo 0,5 ml de componentes reactivos em tampão de fosfato com FCS. Os valores dos M30 Control Low e High estão escritos nas etiquetas dos respectivos frascos. *Pronto a usar!*

Wash Tablet: 1 pastilha de 500 mL para preparar a solução de lavagem. Dissolver a pastilha em 500 ml de água desionizada.

TMB Substrate: 1 frasco contendo 22 ml de solução TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). *Nota!* Não expor à luz!

Stop Solution: 1 frasco contendo 7 ml de ácido sulfúrico 1,0 M. *Pronto a usar!*

Sealing Tape

Instruções de Uso

Certificado de análise

Materiais Necessários não fornecidos

- Leitor de Microplacas (comprimento de onda: 450 nm; linear 0 – 3 OD)
- Agitador de Microplacas (oscilação: 600 rpm, órbita: 1,5 – 4 mm)
- Lavador de microplacas (96 poços) ou pipeta multicanal (250 µl)
- Vórtex
- Pipetas de precisão: 25, 50, 75 e 200 µl
- Cilindro (500 ml)
- Água desionizada

Protocolo do Ensaio

Avisos e Precauções

1. M30 Apoptosense ELISA kit é para uso exclusivo *in vitro*.
2. Não misture os reagentes de lotes diferentes.
3. Amostras dos doentes devem ser manuseadas como transmissoras de doenças infecciosas e de acordo com as boas práticas laboratoriais.
4. Não utilize amostras contaminadas.
5. A solução Stop contém ácido sulfúrico 1,0 M, que pode causar irritação na pele e é prejudicial aos olhos. Em caso de contacto, lavar com muita água e procure conselho médico.
6. Fichas de Segurança (MSDS) estão disponíveis no site www.peviva.com ou por pedido.

Colheita e preparação de amostras de sangue

O volume de amostra deve ser suficiente para duplicados (2 × 25 µl). Não é necessário estar em jejum antes da colheita.

Soro: Colheita de sangue venoso, evitando hemólise, em tubos secos (sem anti-coagulantes). Após retração do coágulo, centrifugue e o utilize o soro.

Plasma: O kit M30 Apoptosense ELISA pode ser utilizado em plasma (EDTA ou Heparina).

Nota! Num mesmo projecto, deverá ser utilizado o mesmo tipo de amostra, soro ou plasma. Para mais informações sobre o desempenho do kit de M30 Apoptosense ELISA utilizando diferentes tipos de amostras, consulte o site: www.peviva.com.

Armazene as amostras de 2 – 8 °C até 4 horas. Para períodos mais longos, congele as amostras a -20 °C ou menos. As amostras podem ser congeladas e descongeladas sem perda de actividade (ref. 6, 7), mas é recomendável evitar ciclos sucessivos de congelamento. Para diluição de amostras consulte a secção “Preparação dos componentes” e “Características de Desempenho”.

Colheita e Preparação de amostras para uso exclusivo em Investigação

O M30 Apoptosense ELISA tem sido usado em culturas celulares num diferente número de publicações (para referências consulte www.peviva.com)

Peviva desenvolveu um produto específico para culturas celulares *in vitro*, **M30 CytoDeath ELISA** (Ref^a 10900). Este produto tem uma gama dinâmica e a sensibilidade necessária para trabalhar *in vitro*.

Preparação de Amostras de culturas celulares

Para muitas aplicações, é vantajoso medir a reactividade total do M30 (cck18) a um único ponto e tardiamente. Essa quantificação reflecte a apoptose na totalidade. Para quantificar todos os fragmentos cck18 nos meios de cultura celulares e extractos celulares, adicione directamente um detergente não iónico às células em meios de cultura celular.

Dia 1: Semeie as células. A densidade da sementeira tem que ser determinada para o tipo de células específico e agente tóxico específico; 5 000 – 10 000 células/poço numa placa de 96 é normalmente adequado.

Dia 2: Lave as células todas com PBS e adicione meio fresco (200 µl/poço). Exponha as células aos agentes escolhidos.

Dia 2 – 4: 96 poços contendo 200 µl de meio por poço, adicione 10 µl a 10 % NP 40 por poço. Para que ocorra a lise, coloque num agitador rotativo durante 5 min à temperatura ambiente. Misture cuidadosamente para não formar bolhas, através de pipetagem/dispensa, transfira 2 × 25 µl de meio/lisado para os poços da microplaca revestidos com M5.

Preparação do sobrenadante da cultura celular

O M30 Apoptosense ELISA e o M65 ELISA podem ser utilizados na abordagem da morte celular por cálculo do rácio M30:M65 (ref. 3). Estas quantificações podem ser efectuadas no sobrenadante! Os rácios devem ser calibrados para cada linha celular do carcinoma utilizando agentes conhecidos que induzam apoptose (p.e, agentes genotóxicos, saturosporina) e/ou maioritariamente necrose (p.e oligomicina/privação de glucose ou peróxido de hidrogénio).

Dia 1/Dia 2: Semeie célula, lave e adicione agentes descritos acima.

Dia 2 – 4: Colha amostra de meio de cada poço. Evite efeitos de secagem. A colheita de múltiplas amostras do mesmo poço não é recomendável. Centrifugue o meio e retire o sobrenadante sem células. *Nota!* Evite retirar de células. 2 × 25 µl de sobrenadante sem células são necessários para o ensaio.

Se o ensaio for realizado no mesmo dia, as amostras podem ser armazenadas a 2 – 8 °C. Se as amostras forem analisadas à posteriori, devem ser armazenadas à temperatura de -20 °C ou inferior. Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.

Preparação dos componentes

Diluição do M30 Conjugate

Dilua o M30 Conjugate com o tampão de diluição do M30 Conjugate Dilution Buffer. O frasco de M30 Conjugate contém 0,4 ml. Adicione 9,2 ml de M30 Conjugate Dilution Buffer directamente no frasco de M30 Conjugate e misture.

Dissolução da Wash Tablet

Dissolva uma pastilha em 500 ml de água desionizada.

Diluição das amostras

Amostras superiores ao Standard G (1 000 U/L) devem ser diluídas com o Standard A ou soro de dadores de sangue. Como a diluição no ensaio é linear, a concentração original é calculada por multiplicação da concentração medida pelo factor de diluição. No caso amostras de dadores de soro/plasma terem sido utilizadas como diluente, a sua concentração deve ser tida em consideração.

Armazenamento e data de validade após abertura

Se o kit não for aberto os reagentes devem ser armazenados a 2 – 8 °C. Se não forem utilizadas todas as tiras, volte a guardar no respectivo saco e feche. Lembre-se de colocar o exsiccante.

O TBM Substrate e M30 Conjugate são sensíveis à luz e iões metálicos pelo que devem ser sempre armazenados nos frascos de âmbar originais a 2 – 8 °C, mesmo entre utilizações. Se se utilizar um novo frasco, este deve ser protegido da luz! O substrato TMB não pode ser utilizado após exposição à luz.

Se o kit for utilizado em diferentes ocasiões, armazene o M30 Conjugate num frasco a 2 – 8 °C. Não exponha à luz. O conjugado diluído é estável durante 3 semanas.

A solução de lavagem é estável durante 5 semanas quando armazenado a 2 – 8 °C.

Procedimento do Ensaio

O M30 Apoptosense ELISA deve ser realizado à temperatura ambiente (24 ± 3 °C).

1. Permita que os reagentes atinjam a temperatura ambiente antes de iniciar o ensaio. Vortex todos os reagentes antes de utilizar.
2. Dissolva a pastilha de lavagem com água desionizada (veja "preparação de componentes")
3. Dilua o M30 Conjugate com M30 Conjugate Dilution Buffer.
4. Pipete 25 µl de M30 Standard (A – G), M30 Control Low, M30 Control High ou amostras nos respectivos poços (duplicados são recomendados).
5. Adicione 75 µl de solução diluída de conjugado M30 a cada poço.

Nota! Os passos 4 e 5 devem ser executados sequencialmente sem interrupção em 20 min.

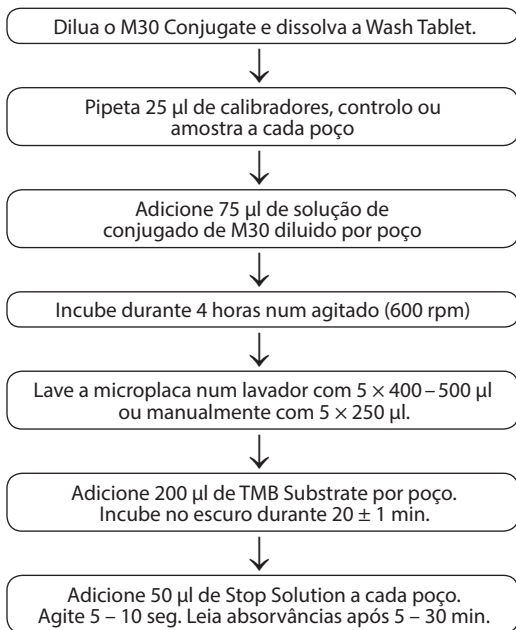
6. Tape os poços com Sealing Tape.
7. Incube durante 4 horas com agitação a 600 rpm.
8. Lave a microplaca num lavador 5 vezes com 400 – 500 µl/poço de solução de lavagem

ou

Lave manualmente 5 vezes com 250 µl de solução de lavagem. Evite contaminação entre os poços.

9. Adicione 200 µl de TMB Substrate a cada poço. Incube durante 20 ± 1 minutos no escuro à temperatura ambiente.
10. Adicione 50 µl de Stop Solution a cada poço. Misture completamente a solução TMB Substrate e a Stop Solution, agite a microplaca durante 5 – 10 segundos.
11. Deixe repousar durante 5 minutos antes de ler as absorvâncias.
12. Determine as Abs a 450 nm num leitor de microplacas nos 30 min seguintes e guarde os resultados.

Fluxograma



Pt

Cálculo e Análise dos Resultados

Os resultados do M30 Apoptosense ELISA são calculados por métodos computacionais. Analise os valores dos controlos e amostras com um programa de tratamento de dados de ELISA adequado. Curva algorítmica: cubic spline. Eixo-x: concentração (U/L); eixo-y: absorvâncias a 450 nm (A450).

Nota! Se as amostras forem diluídas, as concentrações observadas têm que ser multiplicada pelo factor de diluição, e no caso de amostras de dadores sangue e plasma terem sido utilizadas como diluente, as suas concentrações têm que ser consideradas.

Desempenho do ensaio

Características do desempenho

Gama de valores: 0–1 000 U/L.

Efeito Dose Elevadas: Não há efeito de doses elevadas até 195 000 U/L.

Reprodutibilidade: Variação intra ensaio (WA % CV) $\leq 10\%$, variação inter ensaio (BA % CV) $\leq 10\%$ e a variação total $\leq 10\%$, para amostras superiores a 200 U/L.

Sensibilidade: A concentração mínima detectável do neoepitopo K18Asp396 com o M30 Apoptosense ELISA é 20 U/L, definida como a concentração de cck18 que corresponde à absorvância de dois desvios padrão da absorvância do Standard A (0 U/L).

Quantificação do limite baixo: A concentração mais baixa do analito numa amostra de matriz pode ser aceite com exactidão e precisão a partir de 40 U/L.

Recuperação Spiking: Recuperação do calibrador mais alto quando adicionado a amostras de sangue humano: 109 % (média) e 98 – 120 % (gama).

Linearidade da Diluição: Recuperação de soro humano quando diluído no Standard A (0 U/L): 107 % (média) e 99 – 122 % (gama).

Valores de referência: Num estudo de 200 dadores de sangue suecos, a mediana foi 94 U/L e 95th percentil foi 251 U/L. É recomendável que cada laboratório estabeleça os seus valores de referência.

Rastreabilidade dos calibradores

As unidades medidas com o M30 Apoptosense ELISA são definidas contra o antigénio nativo adicionado ao soro. O Antigénio nativo está calibrado contra a proteína recombinante de referência. 1 U/L = 1,24 pM. *Nota!* Devido a diferentes tampões, os calibradores são específicos do lote de kit.

Controlo de Qualidade Interno

Os Controlos do kit M30, baixo e alto, fornecidos com concentrações conhecidas permitem validar o desempenho do kit e deverão ser utilizados em duplicado sempre que se executa um ensaio.

Se este procedimento não for suficiente, cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de controlo de acordo com as directrizes “Colheita e preparação de amostras para uso exclusivo em investigação” ou de acordo com o procedimento do próprio laboratório. Estes controlos devem ser congelados em alíquotas e tratados sempre de igual modo quando da execução do ensaio.

Limitações do método

A utilidade clínica da quantificação do cck18 em amostras de sangue humanas como indicador de prognóstico e de abordagem de terapêuticas ainda não está completamente estabelecida.

Amostras lipêmicas ($\leq 1\ 250$ mg/dl), ictéricas ($\leq 12,5$ mg/dl) ou hemolisadas (≤ 50 mg/dl) não interferem com o ensaio.

Referências Bibliográficas

1. Leers *et al.*, J Pathol. 187, 1999, 567.
2. Schütte *et al.*, Exp Cell Res. 297, 2004, 11.
3. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
4. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
5. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
6. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
7. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
8. Ueno *et al.*, Eur J Cancer 39, 2003, 769.

Para referências futuras, por favor consulte www.peviva.com/literature.

Garantia

Os dados de desempenho aqui apresentados foram obtidos utilizando o procedimento indicado. Qualquer alteração ou modificação neste procedimento, como recomendado pelo fabricante, pode afetar os resultados. Nesse caso, o fabricante nega todas as garantias, expressas, implícitas ou estatutárias, incluindo a garantia implícita de comercialização e adequação ao uso. Em tal caso, o fabricante e os seus distribuidores autorizados, não serão responsáveis por danos indiretos ou consequentes.

PEVIVA Products

Assays

M30 Apoptosense® ELISA

Prod. No. 10011

M65® ELISA

Prod. No. 10020

M30 CytoDeath™ ELISA

Prod. No. 10900

M65 EpiDeath® ELISA

Prod. No. 10040

Antibodies

M30 CytoDEATH™

- Unconjugated Prod. No. 10700
- Biotin Prod. No. 10750
- Fluorescein Prod. No. 10800
- Orange Prod. No. 10830

M5 Keratin 18

Prod. No. 10600

M6 Keratin 18

Prod. No. 10650



VLVbio

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