



Distribuito in ITALIA da

**Li StarFish S.r.l.**

Via Cavour, 35

20063 Cernusco S/N (MI)

telefono 02-92150794

fax 02-92157285

info@listarfish.it

www.listarfish.it



# M65 EpiDeath<sup>®</sup> ELISA

**REF 10040**

**Instructions for Use**

**Bruksanvisning**

**Gebrauchsanweisung**

**Mode d'emploi**

**Istruzioni per l'uso**

**Instrucciones de uso**

**In USA, Canada and Japan**

**For research and laboratory use only.**

**Not for human or diagnostic use.**

## M65 EpiDeath® ELISA

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

En

Sv

De

Fr

It

Es

# Instructions for Use of the M65 EpiDeath® ELISA

## Contents

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

## Explanation of Symbols Used on Labels



Catalogue number



Contains sufficient for <n> tests



Batch code



Manufacturer



Temperature limitation



Use by



Consult Instructions for Use

## Trademarks

M30<sup>®</sup>, M30 Apoptosense<sup>®</sup>, M65<sup>®</sup>, EpiDeath<sup>®</sup> and PEVIVA<sup>®</sup> are registered trademarks of VLVbio (Vivalavida AB).

## Shipping and Storage

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

## Assay Description

### Intended Purpose

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

### Summary and Explanation of the Test

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

K18 is cleaved by caspases during apoptosis. The M30 Apoptosense® ELISA assay (PEVIVA prod. no. 10011; ref. 2) specifically measures the level of caspase-cleaved K18 fragments (cck18) containing the K18Asp396 neo-epitope. The combination of the M30 Apoptosense® ELISA and the M65 EpiDeath® ELISA therefore facilitates the determination of cell death mode *in vitro* and in serum or plasma from patients or experimental animals with human tumour xenografts (ref. 1, 3, 4).

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

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

### Principle of the Method

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

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

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

## Materials Provided for 96 Determinations

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

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

**M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer:** One vial containing 11 mL of phosphate buffer with protein stabilizers for dilution of the M65 EpiDeath Conjugate. Preservative added. Blue coloured.

**M65 EpiDeath Standard A–H:** Standard A containing 2 mL of phosphate buffer with foetal calf serum (FCS). Standard B–H, 0.5 mL each, containing standard material in phosphate buffer with FCS. The values of Standard A–H are 0, 200, 400, 800, 1 200, 2 000, 3 000, and 5 000 U/L, respectively. Preservative added. Yellow coloured. *Ready for use!* Standard A can be used for dilutions of samples > 5 000 U/L.

**M65 EpiDeath Control Low & High:** Two vials containing 0.5 mL of reactive components in phosphate buffer with FCS. The values of M65 EpiDeath Control Low and M65 EpiDeath 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: 2 mm)
- 96-well microtiter plate washer or multichannel pipette (volume 250 µL)
- Vortex mixer
- Precision pipettes: 25, 50, 75 and 200 µL
- Cylinder (500 mL)
- Deionised water

## Assay Protocol

### Warnings and Precautions

1. The M65 EpiDeath® ELISA kit is intended for *in vitro* use only.
2. Do not mix reagents from different kit lots.
3. All patient specimens should be regarded as contagious and handled and disposed of according to appropriate regulations.
4. Do not use samples that are contaminated.
5. The Stop Solution contains 1.0 M sulphuric acid, which will cause irritation of the skin and is harmful to the eyes. In case of contact, flush with plenty of water and seek medical advice.
6. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on [www.peviva.com](http://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 × 25 µL). Donors do not need to be fasting prior to blood collection.

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

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

**Note!** The same type of material, i.e. serum or plasma collected by one method, should be used for a specific project. For further information on the performance of the M65 EpiDeath® ELISA using different types of samples, please consult [www.peviva.com](http://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. 3, 5), but it is recommended that repeated freeze-thawing should be avoided. For dilution of samples see sections "Component Preparation" and "Performance Characteristics".

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

The M65 EpiDeath® ELISA can be used to assess total cell death of epithelial cells *in vitro* by measuring release of K18 protein into the culture medium. The M30 Apoptosense® ELISA and the M65 EpiDeath® ELISA can be used to assess cell death mode by calculation of an M30:M65 ratio (ref. 1, 6). The ratio should be calibrated for each carcinoma cell line using appropriate controls; i.e. agents known to induce apoptosis (e.g. genotoxic agents or staurosporine) and/or mainly necrosis (e.g. oligomycin treatment of glucose starved cells or treatment with hydrogen peroxide) (ref. 1). Calculation of M30:M65 ratios is only recommended for samples  $\geq 300$  U/L.

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

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

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

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

## **Component Preparation**

### **Dilution of M65 EpiDeath Conjugate**

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

### **Dissolving of Wash Tablet**

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



## Dilution of Samples

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

## Storage and Shelf Life After First Opening

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

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

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

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

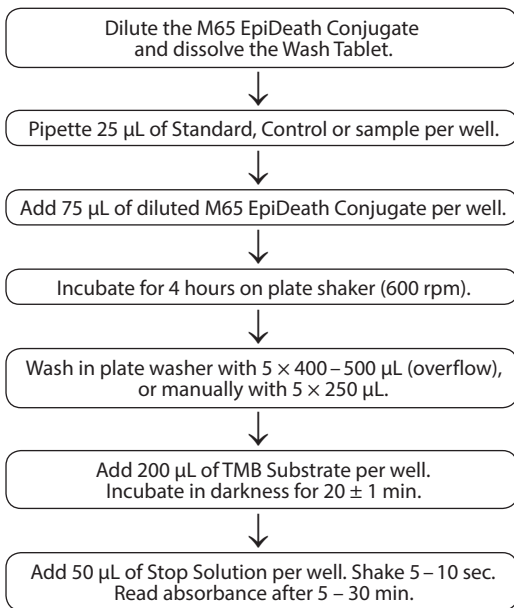
## Assay Procedure

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

1. Allow all reagents to reach room temperature before performing the assay. Vortex all reagents prior to use.
2. Dissolve the Wash Tablet in fresh deionised water (see “Component Preparation”).
3. Dilute the M65 EpiDeath Conjugate with M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer (see “Component Preparation”) and mix.
4. Pipette 25  $\mu$ L of M65 EpiDeath Standard (A–H), M65 EpiDeath Control Low, M65 EpiDeath Control High or sample per well (duplicates are recommended).
5. Add 75  $\mu$ L of the diluted M65 EpiDeath Conjugate solution to each well. *Note! Steps 4 and 5 should be performed sequentially without interruption within 20 minutes.*
6. Cover the wells with sealing tape or a microtiter plate lid.
7. Incubate on shaker for four (4) hours. Speed setting: 600 rpm.
8. Wash the plate in a plate washer five (5) times with 400–500  $\mu$ 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  $\mu$ L of Wash Tablet solution. Avoid contamination between wells.
9. Add 200  $\mu$ L of TMB Substrate to each well. Incubate in darkness at room temperature for  $20 \pm 1$  minutes.
10. Add 50  $\mu$ 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”.

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

## Flow Chart



## Calculation of Analytical Results

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

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

## Assay Performance

### Performance Characteristics

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

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

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

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

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

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

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

### Traceability of Standard

The units measured by the M65 EpiDeath® ELISA are defined against native antigen spiked into serum. Native antigen is calibrated against a recombinant protein standard. 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 M65 EpiDeath Control Low and High with their given concentrations should be sufficient to secure the assay performance and should be used, at least, in duplicate each time the assay is performed.

If this procedure is not sufficient, each laboratory needs to establish its own controls by the guidelines in section “Collection and Preparation of *in vitro* Samples for Research Use Only” or by individual laboratory routine. These

controls should be frozen in aliquots and treated in the same way each time the assay is performed.

## Limitations of the Method

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

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

## Literature References

1. Kramer *et al.*, *Cancer Res* 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, *Invest New Drugs* 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, *Clin Cancer Res* 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, *Cancer Biomarkers* 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, *Ann Oncol* 19, 2008, 990.
6. Linder *et al.*, *Expert Rev Mol Diagn* 10, 2010, 353.

For further references, please consult [www.peviva.com/literature](http://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.

# Istruzioni per l'uso di ELISA M65 EpiDeath®

## Indice

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

## Spiegazione dei simboli utilizzati sulle etichette



Numero di catalogo



Contenuto sufficiente per "n" saggi



Codice del lotto



Fabbricante



Limiti di temperatura



Utilizzare entro



Consultare le istruzioni per l'uso

## Marchi

M30<sup>®</sup>, M30 Apoptosense<sup>®</sup>, M65<sup>®</sup>, EpiDeath<sup>®</sup> e PEVIVA<sup>®</sup> sono marchi registrati di VLVbio (Vivalavida AB)

## Trasporto e conservazione

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

## Descrizione del test

### Scopo proposto

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

### Sommario e spiegazione del test

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

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

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

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



## Principio del procedimento

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

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

## Reagenti forniti per 96 determinazioni

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

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

**M65 EpiDeath Conjugate Dilution Buffer:** Una fiala contenente 11 ml di tampone fosfato con stabilizzanti di proteine per la diluizione di M65 EpiDeath Conjugate. Conservanti aggiunti. Di colore blu.

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

**M65 EpiDeath Control Low & High:** Due fiale contenenti 0,5 ml di componenti reattivi in tampone fosfato con siero fetale bovino. I valori dei M65 EpiDeath Control Low e M65 EpiDeath Control High sono indicati sulle rispettive fiale. Conservanti aggiunti. Di colore giallo. *Pronto per l'uso!*

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

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

**Stop Solution:** Una fiala contenente 7 ml di 1,0 M acido solforico. *Pronto per l'uso!*

**Sealing Tape:** Un (1) foglio.

**Istruzioni per l'uso.**

**Certificato di analisi.**

## Materiale occorrente non incluso

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

It

## Procedimento del test

### Precauzioni e avvertenze

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

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

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

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

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

ELISA M65 EpiDeath® può essere impiegato per stabilire la morte cellulare totale delle cellule epiteliali *in vitro* misurando il rilascio della proteina K18 all'interno del mezzo di coltura. ELISA M30 Apoptosense® e ELISA M65 EpiDeath® possono essere impiegati per stabilire la modalità di morte cellulare mediante il calcolo di un "rapporto M30:M65" (ref. 1, 6). Il rapporto deve essere calibrato per ogni linea cellulare di carcinoma mediante controlli appropriati: noti induttori di apoptosi (p. es. agenti genotossici o staurosporina) e/o principalmente di necrosi (p. es. trattamento con oligomicina di cellule con gravi carenze di glucosio o trattamento con acqua ossigenata) (ref. 1). Il calcolo del rapporto M30:M65 è consigliato solo per campioni  $\geq 300 \text{ U/l}$ .

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

**Giorno 2:** Lavare le cellule una sola volta con PBS e aggiungere mezzo fresco (200  $\mu\text{l}$ /pozzetto). Esporre le cellule all'agente (o agli agenti) desiderato (i).

**Giorno 2 – 4:** Prelevare il mezzo del campione da ogni pozzetto. Per evitare che il pozzetto vada a secco, si sconsiglia di prelevare più campioni dallo stesso pozzetto. Centrifugare il mezzo e prelevare il sovranatante privo di

cellule. **Nota!** Evitare di prelevare cellule. Per ogni test si usano campioni di 2 × 25 µl di sovrantante privo di cellule.

Se il saggio viene eseguito lo stesso giorno, i campioni possono essere conservati a 2 – 8 °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 M65 EpiDeath Conjugate

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

### Dissoluzione della Wash Tablet

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

### Diluizione dei campioni

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

## Conservazione e durata dopo la prima apertura

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

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

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

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

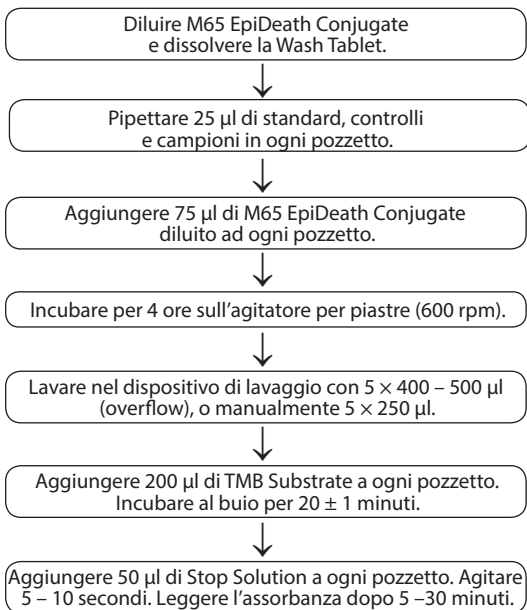
## Procedimento del test

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

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

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

## Schema del procedimento



## Calcolo dei risultati analitici

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

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

## Prestazioni del test

### Caratteristiche delle prestazioni

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

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

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

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

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

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

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

### Tracciabilità dello standard

Le unità determinate da ELISA M65 EpiDeath® sono definite contro antigene nativo introdotto nel siero. L'antigene nativo è calibrato contro uno standard di proteina ricombinante. 1 U/l = 1,24 pM. *Nota!* A causa di buffer di test diversi, il materiale standard non può essere scambiato tra kit Peviva diversi.

### Controllo di qualità interno

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

Se questo procedimento non fosse sufficiente, ciascun laboratorio deve stabilire i propri controlli, secondo quanto indicato alla sezione "Prelievo e preparazione dei campioni *in vitro* solo per uso ricerca" o secondo le tec-

niche di routine del laboratorio. Tali controlli dovrebbero essere congelati in aliquote e trattati nello stesso modo ogni volta che si esegue il test.

## Limitazioni del procedimento

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

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

## Letteratura di riferimento

1. Kramer *et al.*, Cancer Res 64, 2004, 1751.
2. Hägg *et al.*, Invest New Drugs 20, 2002, 253.
3. Olofsson *et al.*, Clin Cancer Res 13, 2007, 3198.
4. Olofsson *et al.*, Cancer Biomarkers 5, 2009, 117.
5. Greystoke *et al.*, Ann Oncol 19, 2008, 990.
6. Linder *et al.*, Expert Rev Mol Diagn 10, 2010, 353.

Per ulteriori informazioni, consultare il sito [www.peviva.com/literature](http://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.



# 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



Distribuito in ITALIA da

**Li StarFish S.r.l.**

Via Cavour, 35

20063 Cernusco S/N (MI)

telefono 02-92150794

fax 02-92157285

info@listarfish.it

www.listarfish.it