

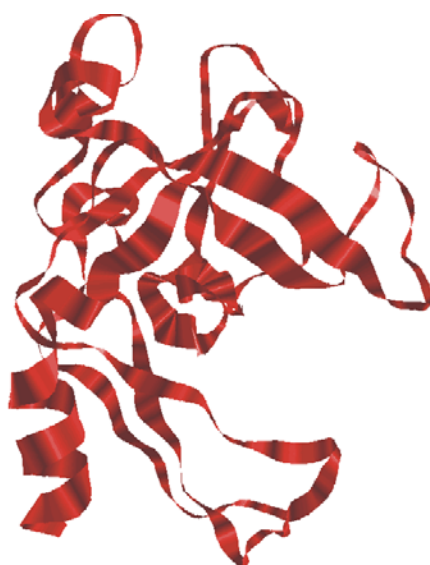
CE

Testanleitung

Quantitative Bestimmung der Tumor M2-PK
Stuhltest

Instruction Manual

Quantitative Determination of the Tumor M2-PK
Stool Test



ScheBo® • Tumor M2-PK™

ELISA Stuhltest/Stool Test

REF Artikel-Nr./Catalog No.: 11

IVD *In vitro* Diagnostikum
For *in vitro* diagnostic use only

Σ 96

Entwickelt und hergestellt von / Developed and manufactured by



ScheBo® • Biotech, Netanyastr. 3 (Europaviertel), 35394 Giessen (Germany)
Aktiengesellschaft

Phone +49-(0)641-49 96-0 • Fax +49-(0)641-49 96-77 • www.schebo.com

Test covered by international patents
(April 2012)

LOT

gültig ab Charge 28 / valid from lot 28 onward



• Certified Management System
• EN ISO 9001
• EN ISO 13485

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einführung4
1.1	Pathobiochemie 4
1.2	Testprinzip 4
1.3	Messbereich 5
1.4	Präzision 5
2	Zusammensetzung des Testkits.....5
3	Probenmaterial und Probenhaltbarkeit6
4	Aufbewahrung und Haltbarkeit des Testkits.....6
5	Erforderliche Geräte und Hilfsmittel6
6	Vorsichtsmaßnahmen7
7	Hinweise für eine optimale Testdurchführung.....7
7.1	Ihr Ansprechpartner für Rückfragen..... 8
8	Testdurchführung8
8.1	Vorbereitungen..... 8
8.1.1	Herstellung des Proben-/Waschpuffers 1x 8
8.1.2	Vorbereitung der ELISA-Platte 9
8.1.3	Vorbereitung der Stuhlproben 9
8.1.3.1	Abarbeitung mit ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™ 9
	Stuhlextraktion mit ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™ 10
8.1.3.2	Abarbeitung mit der Einwiegemethode 11
8.1.4	Verdünnung des anti Tumor M2-PK bio 12
8.2	Durchführung 12
8.2.1	Inkubation von Proben und Standards 12
8.2.2	Inkubation mit dem 2. Antikörper 13
8.2.3	Inkubation mit POD-Streptavidin 14
8.2.4	Farbreaktion 14
8.2.5	Abstoppen der Farbreaktion..... 14
8.2.6	Messung..... 14
8.3	Quantitative Auswertung 14
8.3.1	Manuelle Auswertung 14
8.3.2	Auswertung mittels ELISA - Software 16
8.3.3	Referenzkonzentration für die Tumor M2-PK im Stuhl..... 16
9	Störfaktoren16
10	Weiterführende Untersuchungen16
11	Literatur30
Kurzanleitung Rückseite

Table of contents

	Page
1	Introduction 17
1.1	Pathobiochemistry 17
1.2	Basic principle of the assay 17
1.3	Assay range 18
1.4	Precision 18
2	Reagents 18
3	Sample material and sample stability 19
4	Storage and stability of the test kit 19
5	Additional utensils required..... 19
6	Precautions 20
7	Recommendations for optimal test performance..... 20
7.1	Contact details..... 21
8	Test procedure..... 21
8.1	Preparations..... 21
8.1.1	Preparation of sample-/washing buffer 1x..... 21
8.1.2	Preparation of ELISA plate 21
8.1.3	Preparation of stool specimen 22
8.1.3.1	Using the Quick Prep™ sample preparation system 22
	Stool extraction with the ScheBo® • Tumor M2-PK™ Quick-Prep™ .. 23
8.1.3.2	Using the weighing method..... 24
8.1.4	Preparation of the secondary antibody anti Tumor M2-PK bio 25
8.2	Assay procedure 25
8.2.1	Incubation of samples and standards..... 25
8.2.2	Incubation with second antibody..... 26
8.2.3	Incubation with POD-Streptavidin..... 26
8.2.4	Colour reaction 27
8.2.5	Stopping the colour reaction 27
8.2.6	Measurement 27
8.3	Quantification of results..... 27
8.3.1	Manual evaluation..... 27
8.3.2	Evaluation by ELISA - Software 28
8.3.3	Reference concentration for Tumor M2-PK in stool 29
9	Interferences 29
10	Additional investigations 29
11	References 30
Short protocol.....	back page

1 Einführung

ScheBo® • Tumor M2-PK™ Stuhltest zur quantitativen Bestimmung der Tumor M2-PK durch **medizinisches Fachpersonal**.

Der Test dient der Darmkrebsvorsorge und weist auf Darmpolypen, Darmkrebs und akut- und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen sowie andere Erkrankungen im Verdauungstrakt hin.

1.1 Pathobiochemie

Untersuchungen bei einer Vielzahl von verschiedenen Tumoren des Menschen zeigen, dass in Tumoren ein **Isoenzym** der Pyruvatkinase, Typ Tumor M2 (**Tumor M2-PK**), in erhöhter Konzentration im Blut auftritt. Im Blut konnte eine Korrelation zwischen der Malignität von Tumoren und dem Gehalt des Tumorstoffwechsellmarkers **Tumor M2-PK**, dem Key-Regulator des Tumor Metabolom, nachgewiesen werden. Neben dem Enzymimmunoassay (ELISA) zum Nachweis der **Tumor M2-PK** im Plasma - zur Diagnoseunterstützung sowie zur Therapie- und Verlaufskontrolle verschiedenster Tumorarten - hat **ScheBo® • Biotech** einen zweiten ELISA entwickelt, mit dem die **Tumor M2-PK™ im Stuhl** (Best.-Nr. 11) - zum Nachweis kolorektaler Tumoren - quantifiziert werden kann. Beide Tests basieren auf monoklonalen Antikörpern, die hoch spezifisch für die **Tumor M2-PK** (dimere M2-PK) sind und deshalb nicht mit den anderen Isoenzymen der Pyruvatkinase (Typ L, R, M1 und tetramere M2) reagieren. Falls Sie eine Testanleitung für den **Tumor M2-PK EDTA-Plasmatest** (Best.-Nr. 08) benötigen, wenden Sie sich bitte an uns (siehe 7.1 Ihr Ansprechpartner für Rückfragen).

1.2 Testprinzip

Die ELISA-Platte ist mit einem monoklonalen Antikörper, der nur das Isoenzym der humanen Pyruvatkinase Typ Tumor M2 (Tumor M2-PK) erkennt, beschichtet. Tumor M2-PK aus **Stuhlproben** bzw. Standards wird durch Bindung am Antikörper immobilisiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit einem zweiten monoklonalen Antikörper gegen die Tumor M2-PK. Dieser Antikörper ist mit Biotin markiert und reagiert in der nächsten Inkubation mit dem Konjugat von POD (Peroxidase) und Streptavidin. Die Peroxidase

ihreseite ist in der Lage, das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) zu oxidieren. Oxidiertes TMB wird anschließend photometrisch bestimmt.

1.3 Messbereich

Das Testkit erlaubt die Bestimmung der Tumor M2-PK im Messbereich von 1 - 20 U/ml. Werte unterhalb des niedrigsten Standards sollten als < 1 U/ml angegeben werden. Werte oberhalb des höchsten Standards sollten als > 20 U/ml angegeben werden.

1.4 Präzision

Die Intraassay-Varianz wurde durch zwanzigfache Bestimmung von 5 Stuhlproben (3,8-19,7 U Tumor M2-PK/ml Stuhl) ermittelt. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) lag bei 5,3% (3,0-7,9%).

Die Interassay-Varianz wurde anhand von 5 Stuhlproben (1,9-18,2 U Tumor M2-PK/ml Stuhl), die an zehn verschiedenen Tagen bestimmt wurden, berechnet. Der mittlere VK lag bei 6,8% (4,4-9,4%).

2 Zusammensetzung des Testkits

- 1. 12 ELISA-Teststreifen mit jeweils 8 Vertiefungen, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Tumor M2-PK beschichtet sind.**
(Insgesamt: 96 Vertiefungen)
- 2. Proben-/Waschpuffer (5x) (schwarzer Deckel), 100 ml**
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2 mit Detergenz
- 3. Standards 1 bis 4 (lila Deckel), gebrauchsfertig, 700 µl**
Tumor M2-PK in einer Serummatrix mit Natriumazid
- 4. Kontrolle (gelber Deckel), gebrauchsfertig, 700 µl**
Tumor M2-PK in einer Serummatrix mit Natriumazid
- 5. Zweiter monoklonaler anti Tumor M2-PK Antikörper (biotinyliert) = Tumor M2-PK bio (weißer Deckel), 150 µl, in wässriger Lösung mit Natriumazid**
- 6. POD-Streptavidin, gebrauchsfertig, lichtempfindlich (schwarze Plastikflasche, schwarzer Deckel), 8 ml, in wässriger Lösung**
- 7. Substratlösung, gebrauchsfertig, lichtempfindlich (schwarze Plastikflasche, roter Deckel) 12 ml, TMB in wässriger Lösung**

8. Stopplösung, gebrauchsfertig (Plastikflasche, weißer Deckel) 12 ml

wässrige saure Lösung

3 Probenmaterial und Probenhaltbarkeit

Der ScheBo®• Tumor M2-PK™ Stuhltest dient der quantitativen Bestimmung der Tumor M2-PK in humanen Stühlen (eine erbsengroße geformte Stuhlprobe genügt). Dabei werden die Stuhlproben vor der ELISA-Bestimmung extrahiert.

Die Stuhlprobe darf nicht mit Wasser oder Urin in Berührung kommen.

Die Stuhlprobe sollte nach Probenahme vorzugsweise im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur gelagert werden und muss nach Probenahme innerhalb von 48 h im Labor eintreffen, anschließend ist sie 1 Tag bei 4 - 8 °C bzw. bis zu 1 Jahr bei -20 °C haltbar. Die Stuhlextrakte können 1 Tag bei 4 - 8 °C bzw. bis zu 4 Wochen -20 °C aufbewahrt werden.

Für andere Probenmaterialien liegen keine Leistungsmerkmale vor.

4 Aufbewahrung und Haltbarkeit des Testkits

Alle Komponenten des Testkits sind bei 4 - 8 °C bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach Ablauf der Haltbarkeit darf das Testkit nicht mehr verwendet werden. Unbenutzte ELISA-Teststreifen müssen mit Trockenmittel im wiederverschließbaren Folienbeutel festverschlossen gelagert werden.

5 Erforderliche Geräte und Hilfsmittel

- Einwegröhrchen zur Proben- und Reagenzverdünnung (3 ml, 10 ml)
- Messzylinder (500 ml)
- Vortex-Mixer
- verstellbare Präzisionspipetten für 0-50 µl, 50-200 µl und 200-1000 µl
- 2 ml, 5 ml und 10 ml Pipetten
- **verstellbare 8-Kanal-Pipette 50-250 µl**
- **Mikroplattenreader mit 450 nm Filter, Referenzwellenlänge 620 nm**

6 Vorsichtsmaßnahmen

Nur als *in vitro*-Diagnostikum zu verwenden. Standards und Kontrolle enthalten humanes Serum, das negativ gegen HIV I und II sowie HBc und HCV getestet ist. Trotzdem sollten diese Testkitbestandteile und Stuhlproben als potentiell infektiös behandelt werden.

Extraktionspuffer, Standards, Kontrolle und Tumor M2-PK bio enthalten als Konservierungsmittel Natriumazid. In der Substratlösung ist TMB und Kathon CG als Konservierungsmittel enthalten. Bitte Sicherheitsvorschriften beachten. Berührung mit der Haut vermeiden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Während der Testdurchführung Einmal-Handschuhe tragen.

Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen dürfen nicht zusammen verwendet werden.

7 Hinweise für eine optimale Testdurchführung

1. Genaueste Einhaltung der Testanleitung.
2. Alle Bestandteile des Testkits müssen bis zu ihrer Verwendung bei 4 - 8 °C gelagert und kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Nach Verwendung müssen sie möglichst schnell wieder bei 4 - 8 °C gelagert werden.
3. Alle flüssigen Testkit-Bestandteile sind vor Benutzung gut zu mischen. Eventuell vorhandene Flüssigkeitsreste im Deckel entfernen (Aufklopfen auf den Labortisch).
4. Das Berühren der ELISA-Platte am Boden ist zu vermeiden.
5. Das Abarbeiten der ELISA-Platte sollte stets in gleicher Reihenfolge und im gleichen Zeitintervall erfolgen.
6. Um Kontaminationen zu vermeiden, sind für jeden Pipettierschritt saubere Pipettenspitzen und Pipettierwannen zu verwenden. Beachten Sie bitte, dass bei Pipettierungen mit der 8-Kanal-Pipette immer dieselben Pipettierwannen für ein und dasselbe Reagenz (wie z.B. anti Tumor M2-PK bio oder POD-Streptavidin) benutzt werden.

7. Pipettieren

- Alle Reagenzien und Proben sollten im unteren Drittel der Vertiefung pipettiert werden.
- Beim Waschen Pipettenspitzen stets am oberen Rand der Vertiefung ansetzen.

8. Waschen

- Vor jedem Waschschrift ELISA-Platte gut ausschütten und **trocken klopfen, so dass keine Flüssigkeitsreste zurückbleiben.**
- Stets saubere Papierhandtücher zum Ausklopfen verwenden.
- Darauf achten, dass keine Flüssigkeitsreste zurücklaufen oder in andere Vertiefungen gelangen.
- Waschlösung bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen.

9. Messen

- Platte vor jeder Messung gut schütteln, so dass keine Farbschlieren mehr vorhanden sind.
- **Evtl. Luftblasen mit sauberer Kanüle entfernen.**
- Mindestens 5 Minuten nach dem Stoppen bis zur Messung warten.

7.1 Ihr Ansprechpartner für Rückfragen

Dr. Karin Decker

ScheBo® • Biotech AG

Netanyastr. 3, 35394 Giessen

Tel: +49-(0)641-4996-0, Fax: +49-(0)641-4996-77

<http://www.schebo.de>, e-mail: schebo@schebo.com

8 Testdurchführung

8.1 Vorbereitungen

8.1.1 Herstellung des Proben-/Waschpuffers 1x

100 ml Proben-/Waschpuffer 5x (**schwarzer Deckel**) + 400 ml H₂O (bidest).

Der verdünnte Proben-/Waschpuffer ist 6 Monate bei 4 - 8 °C stabil.

8.1.2 Vorbereitung der ELISA-Platte

Eingeschweißte ELISA-Platte (Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen) vor dem Öffnen der Folie auf Raumtemperatur kommen lassen. Folie an der vorgesehenen Einkerbung aufreißen, Clipverschluss öffnen und gewünschte Anzahl der beschichteten ELISA-Streifen entnehmen. **Unbenutzte ELISA-Teststreifen müssen mit Trockenmittel in dem festverschlossenen wiederver-schließbaren Folienbeutel gelagert werden.**

8.1.3 Vorbereitung der Stuhlproben

- ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™-Probenvorbereitungssystem (Best.-Nr. 11-Quick) - bevorzugte Methode - (siehe 8.1.3.1) alternativ kann mit der
- Einwiegemethode: Stuhlproben werden eingewogen (siehe 8.1.3.2) gearbeitet werden.

8.1.3.1 Abarbeitung mit ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™

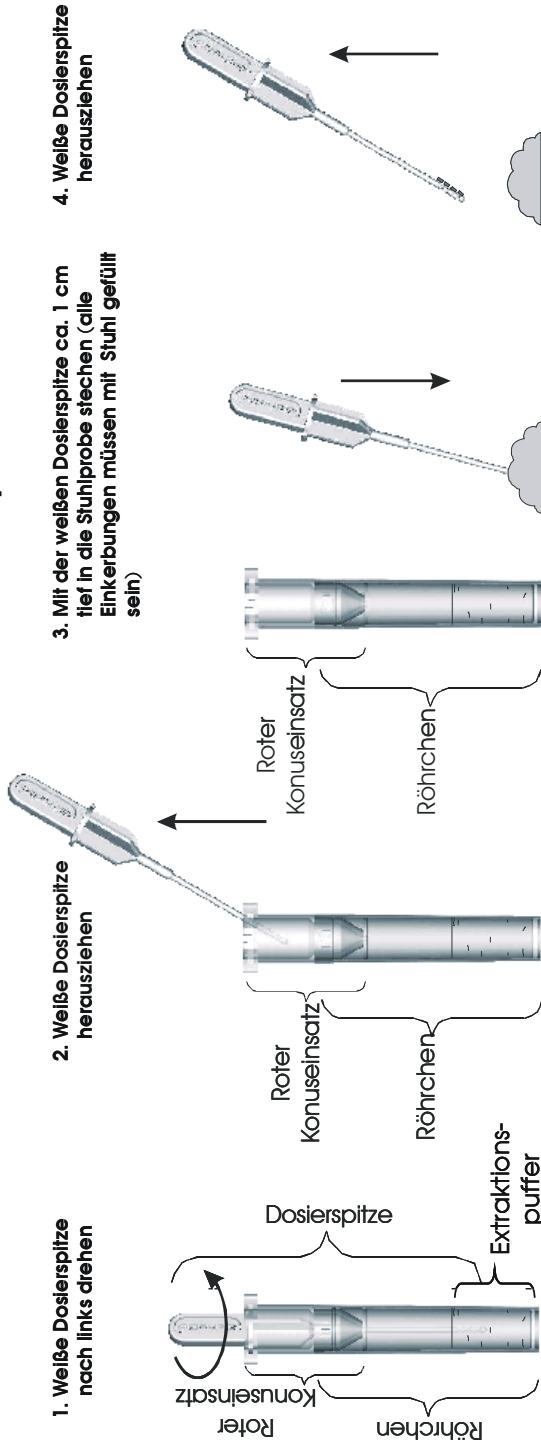
Der gebrauchsfertige Extraktionspuffer ist bereits im Röhrchen des ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™-Probenvorbereitungssystems enthalten! Haltbarkeit siehe Packungsaufdruck.

Vorbereitung der Stuhlproben

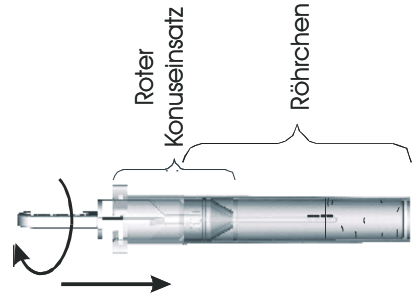
ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™ (Best.-Nr. 11-Quick) wird gemäß Abb. 1 (Seite 10) benutzt.

Stuhlprobenextrakte (ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™) werden unverdünnt eingesetzt! 50 µl des Stuhlprobenextrakts aus dem ScheBo®• Tumor M2-PK™ Quick-Prep™ werden direkt in die Vertiefung pipettiert.

Stuhlextraktion mit ScheBo® • Tumor M2-PK™ Quick-Prep™



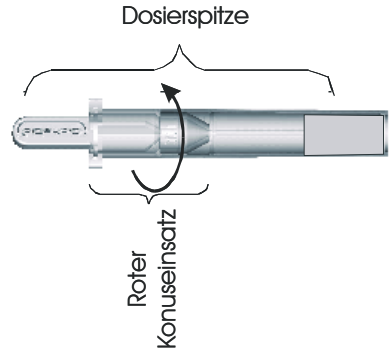
5. Weiße Dosierspitze durch den roten Konuseinsatz in das Röhren stecken und die Dosierspitze zum Schließen nach rechts drehen



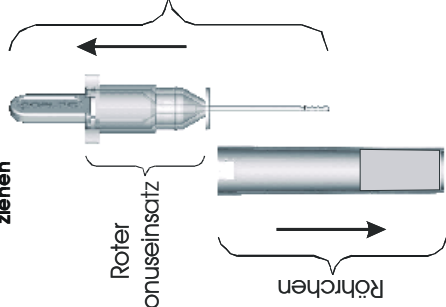
6. Gut mischen (Reagenzglaschüttler)
7. Zehn Minuten extrahieren
8. Abschließend mischen
Achtung! Es darf kein Stuhl mehr an der Dosierspitze hängen!



9. Roten Konuseinsatz zum Öffnen des Röhrens nach links drehen und den Konuseinsatz leicht bis zum „Knacken“ nach hinten oder nach oben drücken



10. Roten Konuseinsatz zusammen mit der weißen Dosierspitze aus dem Röhren ziehen



11. Nach Absetzen der Partikel wird aus dem Röhren das Stuhlprobenextrakt unverdünnt eingesetzt.

Die weitere Testdurchführung erfolgt gemäß Testanleitung (siehe Kapitel 8.2).

Abbildung 1

8.1.3.2 Abarbeitung mit der Einwiegemethode

Extraktionspuffer (5x) (Vierkantflasche, grüner Deckel), 100 ml (**Best.-Nr. 02**)
phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2 mit Detergenz und Natriumazid.

Herstellung des Extraktionspuffers:

100 ml Extraktionspuffer 5x (Best.-Nr.02, Vierkantflasche, grüner Deckel) +
400 ml H₂O bidest. Der verdünnte Extraktionspuffer ist 6 Monate bei 4 - 8 °C
stabil.

Einwiegen der Stuhlprobe:

Ein etwa 12 ml umfassendes Einwegröhrchen und eine mikrobiologische
Impföse (z.B. SARSTEDT) werden mit einer empfindlichen digitalen
Laborwaage auf Null austariert. Anschließend wird mit der Impföse der Stuhl
eingewogen, indem man mit der Öse in die Stuhlprobe sticht und die an der
Spitze verbleibende Stuhlmenge (etwa 100 mg) in das Einwegröhrchen
einbringt. Anstelle der Impföse kann auch ein Zahnstocher benutzt werden.
Entsprechend der gewogenen Stuhlprobenmasse werden die Volumina des
zuzugebenden Extraktionspuffers variiert (z.B. 100 mg Stuhl + 10 ml Puffer oder
75 mg Stuhl + 7,5 ml Puffer).

Homogenisation und Extraktion der Stuhlprobe:

Die Stuhlprobensuspension wird bei Raumtemperatur mehrfach kräftig mit
einem Reagenzglasschüttelgerät (z.B. VORTEX) gemixt. Die Stühle müssen gut
homogenisiert sein, um eine vollständige Extraktion zu gewährleisten. Nach
mindestens 15 Minuten Extraktion wird noch einmal abschließend gemixt.
Den Extrakt 10 min. bei RT stehen lassen. Der Überstand wird abgenommen
und im Test verdünnt eingesetzt.

Verdünnung der Stuhlproben (Einwiegemethode):

Herstellung der 1:2 Verdünnung:

200 µl Stuhlprobenextrakt + 200 µl Proben/Waschpuffer 1x

8.1.4 Verdünnung des anti Tumor M2-PK bio (1:100)

Herstellung der anti Tumor M2-PK bio (weißer Deckel, 1:100) Verdünnung:

Ansatz für 2 Teststreifen (1/6 Platte):

15 µl anti Tumor M2-PK bio + 1,5 ml Proben-/Waschpuffer 1x

Ansatz für 4 Teststreifen (1/3 Platte):

25 µl anti Tumor M2-PK bio + 2,5 ml Proben-/Waschpuffer 1x

Ansatz für 6 Teststreifen (1/2 Platte):

30 µl anti Tumor M2-PK bio + 3,0 ml Proben-/Waschpuffer 1x

Ansatz für 12 Teststreifen (1 Platte):

60 µl anti Tumor M2-PK bio + 6,0 ml Proben-/Waschpuffer 1x

Wichtig: Die **Verdünnung von anti Tumor M2-PK bio** darf frühestens bei Testbeginn angesetzt, muss bis zu ihrer Verwendung bei 4 – 8 °C gelagert und kurz vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

8.2 Durchführung

8.2.1 Inkubation von Proben und Standards

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	P3	P3	P11	P11	P19	P19	P27	P27	P35	P35
B	STD1	STD1	P4	P4	P12	P12	P20	P20	P28	P28	P36	P36
C	STD2	STD2	P5	P5	P13	P13	P21	P21	P29	P29	P37	P37
D	STD3	STD3	P6	P6	P14	P14	P22	P22	P30	P30	P38	P38
E	STD4	STD4	P7	P7	P15	P15	P23	P23	P31	P31	P39	P39
F	Ko	Ko	P8	P8	P16	P16	P24	P24	P32	P32	P40	P40
G	P1	P1	P9	P9	P17	P17	P25	P25	P33	P33	P41	P41
H	P2	P2	P10	P10	P18	P18	P26	P26	P34	P34	P42	P42

< 2 Streifen >

<----- 4 Teststreifen ----->

<----- gesamt Platte, 12 Teststreifen ----->

Abbildung 2: Mögliches Pipettierschema

STD: Standards

Ko: Kontrolle

P1-P42: Patientenproben

Blank: Vertiefung - A1 und A2 - jeweils 50 µl Proben-/Waschpuffer 1x einpipettieren.

Die **Standards** (lila Deckel) sind gebrauchsfertig, werden gemischt und in Reihe 1 und 2 als Doppelwerte in die entsprechenden Vertiefungen pipettiert (jeweils 50 µl).

Standard 1 = 1,0 U/ml

Standard 2 = 3,5 U/ml

Standard 3 = 10,0 U/ml

Standard 4 = 20,0 U/ml

Die **Kontrolle** (gelber Deckel) ist gebrauchsfertig, wird gemischt und mit jeweils 50 µl z.B. in die Vertiefung F1 und F2 pipettiert.

Kontrolle = 4,5 U/ml ± 15 %

Von den Stuhl-Proben werden jeweils 50 µl nebeneinander als Doppelwerte in die weiteren Vertiefungen pipettiert.

60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Waschen: Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Vertiefungen dreimal mit Proben-/Waschpuffer 1x (8-Kanalpipette) waschen (250 µl/Vertiefung); Waschlösung bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen; **Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernen.**

8.2.2 Inkubation mit dem 2. Antikörper (anti Tumor M2-PK bio)

Verdünnung des biotinylierten zweiten monoklonalen Antikörpers = anti Tumor M2-PK bio (1:100 verdünnen, siehe 8.1.4, Seite 12) mischen und 50 µl pro Vertiefung zugeben.

30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

Waschen: Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Vertiefungen dreimal mit Proben-/Waschpuffer 1x (8-Kanalpipette) waschen (250 µl/Vertiefung); Waschlösung bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen; **Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernen.**

8.2.3 Inkubation mit POD-Streptavidin

Mischen der **gebrauchsfertigen POD-Streptavidin-Lösung** (schwarze Plastikflasche, schwarzer Deckel) und Zugabe von 50 µl pro Vertiefung.

30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.

Waschen: Inhalt der Vertiefungen verwerfen. Vertiefungen dreimal mit Proben-/Waschpuffer 1x (8-Kanalpipette) waschen (250 µl/Vertiefung); Waschlösung bei jedem Waschschrift mind. 1-2 Minuten einwirken lassen; **Flüssigkeitsreste durch Ausklopfen auf sauberen Papiertüchern vollständig entfernen.**

8.2.4 Farbreaktion

Mischen der gebrauchsfertigen **Substratlösung** (schwarze Plastikflasche/roter Deckel) und Zugabe von 100 µl pro Vertiefung.

15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.

(Bitte verkürzen Sie, falls nötig, bei ELISA-Readern oder Vollautomaten, die nur bis 2,5 OD oder 3,0 OD messen, diese Inkubationszeit entsprechend.)

8.2.5 Abstoppen der Farbreaktion

Mischen der gebrauchsfertigen **Stopplösung** (Plastikflasche/weißer Deckel) und Zugabe von 100 µl pro Vertiefung; **Platte gut schütteln.**

8.2.6 Messung

Die OD-Messung erfolgt bei **450 nm** zwischen 5 bis 30 min nach Zugabe der Stopplösung. Vor der Messung muss die ELISA-Platte vorsichtig geschüttelt werden. Wird gegen eine Referenzwellenlänge gemessen, so sollte diese **620 nm** betragen.

8.3 Quantitative Auswertung

8.3.1 Manuelle Auswertung

Nach Subtraktion des Blank-Mittelwertes wird der Mittelwert der Absorption der Doppelwerte berechnet.

Die Konzentration der Standards (Abszisse) wird gegen ihre Absorption (Ordinate) aufgetragen (log-log)= **Standardkurve**.

Für die Patientenproben werden die Werte direkt an der Standardkurve abgelesen.

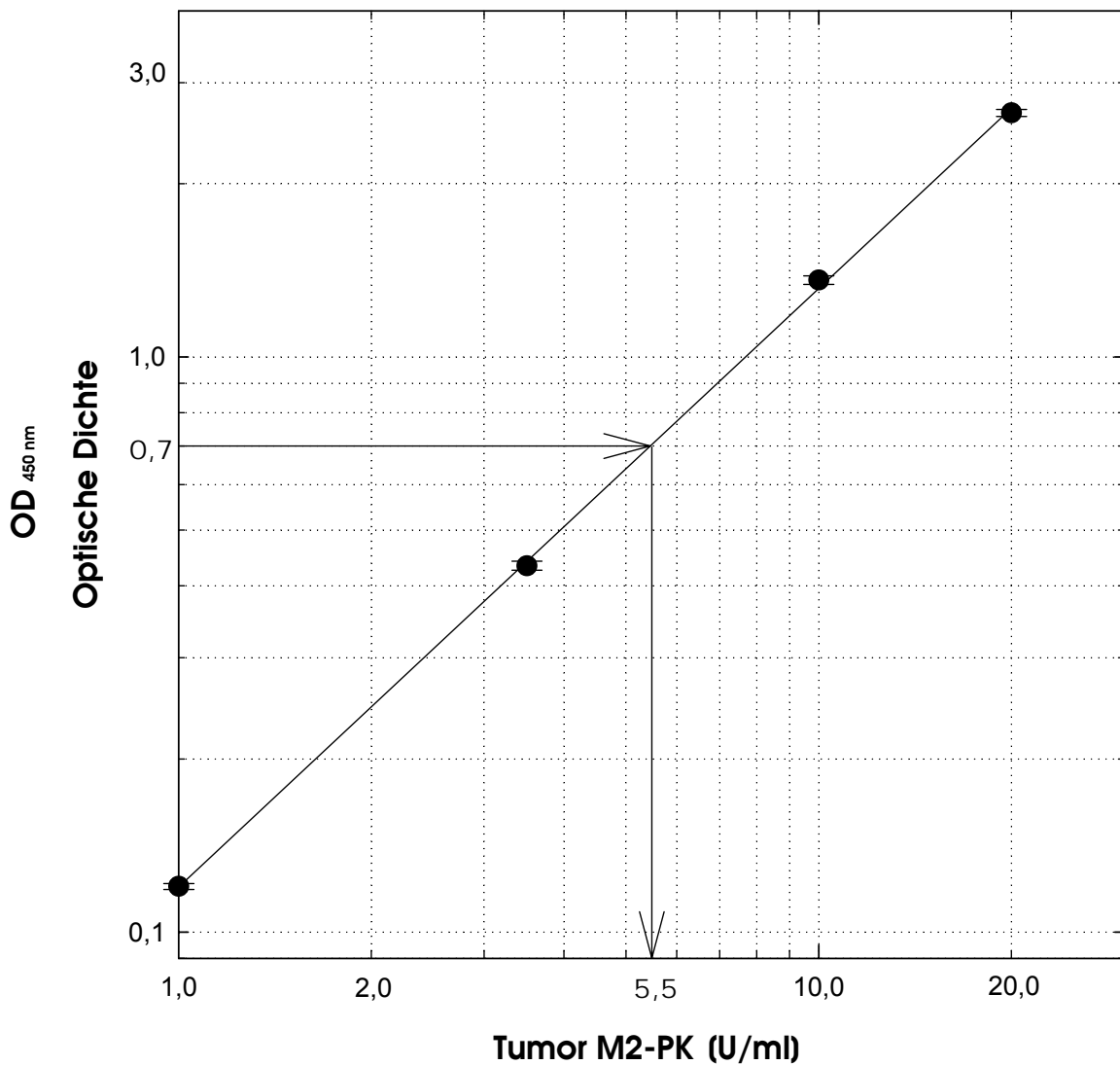


Abbildung 3: Typisches Beispiel einer Standardkurve

Berechnungsbeispiel: Die gemittelte OD der Probe betrug nach Korrektur des Blanks 0,7. Durch direktes Ablesen an der Standardkurve ist eine Tumor M2-PK-Konzentration von 5,5 U/ml zu ermitteln.

8.3.2 Auswertung mittels ELISA-Software

Die Plattenbelegung bezüglich der Blanks, Standards und Proben definieren (Abbildung 2).

Als Methode lineare Regression mit log-log Skalierung wählen.

8.3.3 Referenzkonzentration für die Tumor M2-PK im Stuhl

cut-off: 4 U/ml

Werte > 4 U/ml = Ein erhöhter Wert an Tumor M2-PK im Stuhl kann ein Indikator für Darmpolypen oder Darmkrebs sein. Erhöhte Werte können ebenfalls bei akut- und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sowie anderen Erkrankungen im Verdauungstrakt auftreten.

Bei einem cut-off von 4 U/ml beträgt die Sensitivität 80% (n= 704 Patienten mit kolorektalen Karzinom) bei einer Spezifität von 96% (n=7793 asymptomatische Personen).

9 Störfaktoren

Sehr wässrige Stühle können aufgrund des Verdünnungseffektes zu falsch normalen Tumor M2-PK-Konzentrationen im Stuhl (≤ 4 U/ml) führen. Es empfiehlt sich daher, die Konsistenz von sehr wässrigen Stühlen zu notieren und eine geformte Stuhlprobe anzufordern. Andere Störfaktoren sind nicht bekannt.

10 Weiterführende Untersuchungen

Weitere geeignete Untersuchungen (z.B. Koloskopie, Gastroskopie, CT oder Ultraschall) sollten immer durchgeführt werden, um das pathologische Ergebnis oder einen bestehenden klinischen Verdacht auf Krebs oder dessen Vorstufen zu bestätigen. Der Test ersetzt keine Darmspiegelung.

1 Introduction

ScheBo® • Tumor M2-PK™ Stool Test for the quantitative determination of Tumor M2-PK by **healthcare professionals**.

The test is used for colorectal cancer screening and indicates colorectal polyps, colorectal cancer, acute and chronic inflammatory bowel disease and some other diseases of the digestive tract.

1.1 Pathobiochemistry

The majority of human tumors strongly over-express the tumor M2 isoform of the glycolytic enzyme pyruvate kinase. This isoenzyme is released from tumor cells and is quantitatively detectable in body fluids. The concentration of type tumor M2 isoenzyme in blood correlates with the malignancy of the tumors. This new tumor metabolic activity marker is called **Tumor M2-PK** and is the key regulator of the Tumor Metabolom. **ScheBo® • Biotech** has developed two highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs). One of these ELISA tests allows the quantitative measurement of **Tumor M2-PK** in **stool** (to identify gastrointestinal tumors) and the other allows the quantitative measurement of **Tumor M2-PK** in **EDTA plasma** (for the detection of a wide range of different solid tumors). Both tests are based on two monoclonal antibodies that specifically react with **Tumor M2-PK** (dimeric M2-PK) and do not cross-react with the other isoforms of pyruvate kinase (Type L, R, M1 and tetrameric M2). This manual describes the use of the **ScheBo® • Tumor M2-PK™ Stool Test** (catalogue number 11). If you require the Instruction Manual for the **ScheBo® • Tumor M2-PK™ test in EDTA-plasma samples** (catalogue number 08), please contact us (see 7.1 Contact details).

1.2 Basic principle of the assay

The ELISA plate is coated with a monoclonal antibody which only recognizes **Tumor M2-PK**. Tumor M2-PK from **stool** samples and standards binds to the antibody and thus is immobilized on the plate. A second monoclonal antibody, which is biotinylated, binds to Tumor M2-PK during the next incubation. Then the conjugate of POD (peroxidase) and streptavidin binds

to the biotin moiety. The peroxidase oxidizes TMB (3,3',5,5'-tetra-methyl benzidine), which turns yellow. Finally, the concentration of oxidized TMB is determined photometrically.

1.3 Assay range

The test kit allows the quantification of Tumor M2-PK from 1 to 20 units/ml (U/ml). Values outside this range should be specified as < 1 U/ml or > 20 U/ml respectively.

1.4 Precision

The intra-assay variance was evaluated by 20-fold determination of five samples (3.8-19.7 U Tumor M2-PK/ml stool). The mean coefficient of variance (CV) was 5.3% (3.0-7.9%).

The inter-assay variance was calculated with five samples (1.9-18.2 U Tumor M2-PK/ml stool), which were tested on ten different days. The mean CV was 6.8% (4.4-9.4 %).

2 Reagents

1. **12 ELISA-strips with 8 wells each, coated with a monoclonal antibody to human Tumor M2-PK, 96 wells**
2. **Sample-/ washing buffer concentrate (5x) (black cap), 100 ml**
phosphate buffered saline, pH 7.2, with detergent
3. **Tumor M2-PK standards 1 to 4, ready-to-use (violet caps), 700 µl each**
Tumor M2-PK in serum matrix with sodium azide
4. **Control, ready-to-use (yellow cap), 700 µl**
Tumor M2-PK in serum matrix with sodium azide
5. **Second monoclonal antibody to Tumor M2-PK conjugated to biotin, i.e. anti Tumor M2-PK bio (white cap), 150 µl**
in aqueous solution with sodium azide
6. **POD-Streptavidin, ready-to-use, light sensitive (black plastic vial with black cap), 8 ml**
in aqueous solution
7. **Substrate solution, ready-to-use, light sensitive (black plastic vial with red cap), 12 ml, TMB in aqueous solution**

8. **Stop solution, ready-to-use (plastic vial with white cap), 12 ml** aqueous acidic solution

3 Sample material and sample stability

Sample material: Human stool only. A walnut-sized formed stool sample is sufficient. The stool sample must not come in contact with water or urine. Tumor M2-PK is extracted from the stool sample and then measured by ELISA.

Sample stability: The stool sample should preferably be kept refrigerated (or in a cool place), or stored at room temperature, until it is sent to the laboratory. It must reach the laboratory within 48 hours of defecation. It is then stable for 1 more day when kept at 4 - 8 °C or for up to 1 year at -20 °C. Undiluted stool extracts may be stored at 4 - 8 °C for one day or up to 4 weeks at -20 °C.

Performance characteristics have not been established for other types of samples.

4 Storage and stability of the test kit

All components of the test kit are stable at 4 - 8 °C until the expiry date shown on the kit labels. The kit must not be used after the expiry date. Unused ELISA-strips must be stored in the re-sealable foil bag containing the desiccant, making sure the seal is completely closed.

5 Additional utensils required

- Polystyrene test tubes (3 ml, 10 ml)
- 500 ml graduated cylinder
- Vortex mixer
- Adjustable precision pipettes: 0-50 µl, 50-200 µl, and 200-1000 µl
- 2 ml, 5 ml and 10 ml pipettes
- **Adjustable 8-channel pipette 50-250 µl**
- **ELISA plate-reader capable of reading absorbance at 450 nm (reference wavelength: 620 nm)**

6 Precautions

For *in vitro* diagnostic use only. Standards and control contain human serum that is negative for HIV I, HIV II, HBc and HCV tested. Nevertheless these kit reagents, as well as human body fluids, should be treated as potentially infectious.

Extraction buffer, standards, control and anti Tumor M2-PK bio contain NaN_3 as a preservative. Substrate solution contains TMB and Kathon CG as preservative. Please observe the relevant safety precautions. Avoid skin contact. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves while performing the test. **Do not mix materials from different master lots.**

7 Recommendations for optimal test performance

1. Follow the instruction manual precisely.
2. All components of the test kit have to be stored at 4 - 8 °C. Bring all reagents and the ELISA plate to room temperature shortly before use. After using store all reagents at 4 - 8 °C immediately.
3. Vortex all liquid reagents before use. Avoid droplets in the caps of the tubes.
4. Do not touch the bottom of the ELISA plate.
5. Always work up the ELISA plates in identical order and equal time intervals.
6. To avoid contamination use clean pipette tips and clean receptacles. Do not use the same receptacle for different reagents (i.e. anti Tumor M2-PK bio and POD-Streptavidin).
7. Pipetting
 - Pipette all reagents and samples into the lower third of the wells.
 - When washing hold the pipette tips at the upper rim of the wells.
8. Washing
 - Before each washing step, invert the plate and **tap hard** on a clean paper towel to **remove all remaining liquid**.
 - Use only clean paper towels when tapping the plate dry.
 - Make sure that no liquid drains back or transfers to other wells.

- Incubate with washing buffer **at least 1-2 minutes** per washing step.

9. Measurement

- Agitate plate well before each measurement to ensure even distribution of the dye.
- **Remove any bubbles** with a clean needle.
- **Wait at least five minutes after stopping the colour reaction before measuring.**

7.1 Contact details

For UK & Republic of Ireland contact:

ScheBo® • Biotech UK Limited

P.O. Box 6359, Basingstoke, RG22 4WE, U.K.

Tel.: +44-(0)1256-477259, Fax: +44-(0)1256-327889

e-mail: info@schebo.co.uk

Or for other countries contact:

Your local distributor

8 Test procedure

8.1 Preparations

8.1.1 Preparation of sample-/washing buffer 1x

100 ml sample-/washing buffer 5x (**black cap**) + 400 ml bidistilled water.

The diluted sample-/washing buffer is stable for 6 months at 4 - 8 °C.

8.1.2 Preparation of ELISA plate

Bring the ELISA plate to room temperature before opening. Tear open the re-sealable foil bag where indicated by the notch, open the re-sealable closure and remove the desired number of ELISA strips. **Unused ELISA strips must be stored at 4 - 8 °C in the re-sealable foil bag containing the desiccant, making sure the seal is completely closed.**

8.1.3 Preparation of stool specimen

- We recommend the ScheBo[®] • Tumor M2-PK[™] Quick-Prep[™] dosing device (cat. no. 11-Quick, see 8.1.3.1) is used for speed and convenience or alternatively
- Weighing method: stool specimen can be weighed (see 8.1.3.2)

8.1.3.1 Using the Quick-Prep[™] sample preparation system

The tubes of the ScheBo[®] • Tumor M2-PK[™] Quick-Prep[™] sample preparation system contains ready-to-use extraction buffer. See the imprint on the packaging for the expiry date.

Preparation of stool specimens

The ScheBo[®] • Tumor M2-PK[™] Quick-Prep[™] (cat. no. 11-Quick) should be used according to figure 1 (page 23).

The ScheBo[®] • Tumor M2-PK[™] Quick-Prep[™] stool extracts are ready-to-use!

Pipette 50 µl of stool extract directly from the ScheBo[®] • Tumor M2-PK[™] Quick-Prep[™] into each duplicate well.

Stool extraction with ScheBo® • Tumor M2-PK™ Quick-Prep™

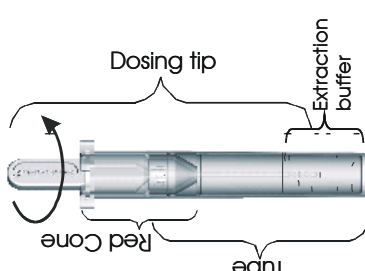
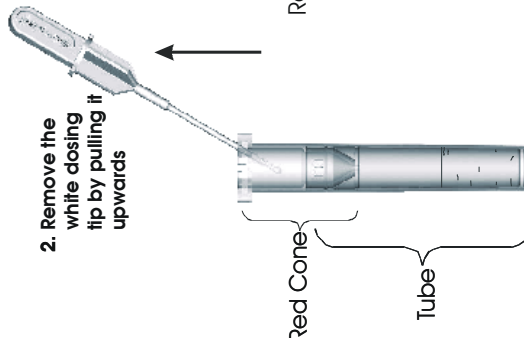
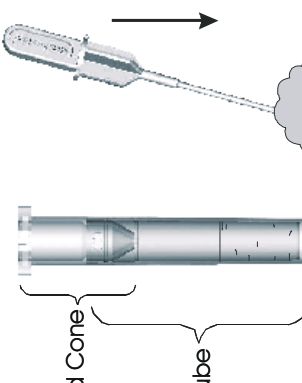
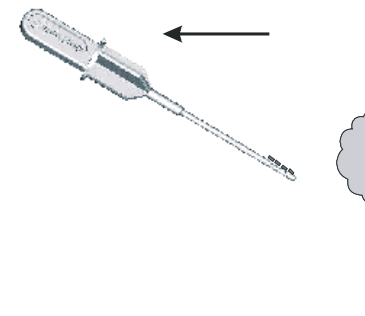
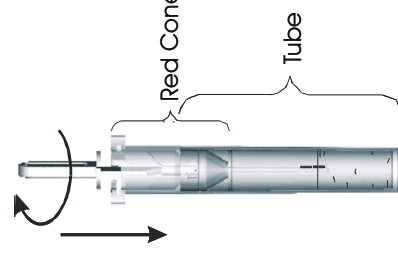
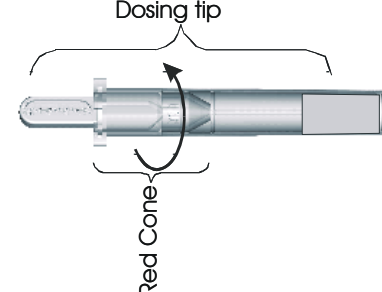
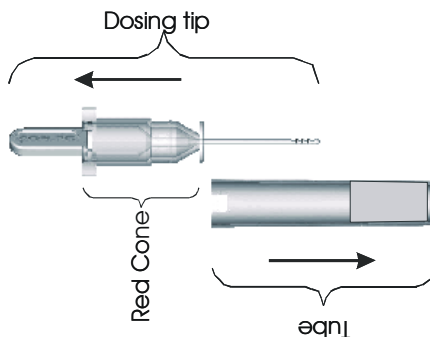
1. Turn the white dosing tip (only) anti-clockwise

2. Remove the white dosing tip by pulling it upwards

3. Insert the white dosing tip in stool sample to a depth of c. 1cm

4. Remove the white dosing tip. Make sure all notches are filled with stool.

5. Insert the white dosing tip into the tube through the red cone. Close by turning the white dosing tip clockwise.

6. Mix well (vortex)
- 7. Extract for 10 minutes
- 8. Then mix again
Attention! Make sure NO stool is left on the dosing tip!
- 9. Twist the red cone anti-clockwise, then push or lift upwards until it clicks open

- 10. Remove the red cone and white dosing tip (together) from the tube

- 11. After the particles have settled, complete the test as described (see section 8.2) The stool sample extract is ready to use (no dilution needed)

Figure 1

8.1.3.2 Using the weighing method

Extraction buffer concentrate (5x) for stool specimen (square flask, green cap), 100 ml (**cat. no.: 02**) phosphate buffered saline, pH 7.2, with detergent and sodium azide.

Preparation of extraction buffer:

Dilute the extraction buffer (5x) (cat. no.: 02): 100 ml extraction buffer (5x) + 400 ml distilled water. The diluted extraction buffer is stable for 6 months at 4 - 8 °C.

Weighing the stool specimen:

Tare a disposable tube (circa 12 ml capacity) and an inoculating loop (or toothpick) to zero, using a sensitive digital laboratory balance. Then take a sample (circa 100 mg) of the stool specimen using the inoculating loop (or toothpick) and replace the loop into the tube to weigh the sample.

Adjust the volume of extraction buffer added to the stool sample according to the sample mass, so that the final concentration equals 10 mg stool/ml extraction buffer (e.g. 100 mg stool +10 ml buffer or 75 mg stool + 7.5 ml buffer).

Homogenisation and extraction of the stool sample:

Vortex the stool suspension vigorously a number of times at room temperature. The stool suspensions must be thoroughly homogenised in order to achieve complete extraction. After at least 15 minutes' extraction time, vortex the suspension again.

Leave the extract to stand for 10 minutes at room temperature. Then remove the supernatant for use (**after dilution**) with the test kit.

Dilution of stool extract prepared by the weighing method (1:2):

Preparation of 1: 2 dilution:

200 µl extracted stool sample + 200 µl sample-/washing buffer 1x

8.1.4 Preparation of the secondary antibody anti Tumor M2-PK bio (1:100)

Preparation of 1:100 dilution of the biotin-conjugated second monoclonal antibody = **anti Tumor M2-PK bio** (white cap):

For 2 strips (1/6 plate):

15 µl anti Tumor M2-PK bio + 1.5 ml sample-/washing buffer 1x

For 4 strips (1/3 plate):

25 µl anti Tumor M2-PK bio + 2.5 ml sample-/washing buffer 1x

For 6 strips (1/2 plate):

30 µl anti Tumor M2-PK bio + 3.0 ml sample-/washing buffer 1x

For 12 strips (1 plate):

60 µl anti Tumor M2-PK bio + 6.0 ml sample-/washing buffer 1x

Important: The anti Tumor M2-PK bio must not be diluted until after the test has begun. It must be stored at 4 - 8 °C and brought to room temperature shortly before use.

8.2 Assay procedure

8.2.1 Incubation of samples and standards

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
B	STD1	STD1	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
C	STD2	STD2	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
D	STD3	STD3	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
E	STD4	STD4	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
F	CON	CON	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
G	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
H	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42

<--2 strips-->

<----- 4 test strips ----->

<----- whole ELISA plate, 12 test strips ----->

Figure 2: Possible plate layout

STD: standards

CON: control

S1-S42: samples

Blank: Pipette 50 µl of sample-/washing buffer 1x into wells A1 and A2.

Standards: Ready-to-use (violet cap); vortex and pipette 50 µl of each standard into strips 1 and 2 as duplicate.

Standard 1 = 1.0 U/ml

Standard 2 = 3.5 U/ml

Standard 3 = 10.0 U/ml

Standard 4 = 20.0 U/ml

Control: Ready-to-use (yellow cap); vortex and pipette 50 µl into wells F1 and F2.

Control = 4.5 U/ml ± 15 %

Stool Samples: Pipette 50 µl of the **sample** into each of two adjacent wells.

Incubate for 60 minutes at room temperature.

Washing: Empty the wells and wash each well 3 times with sample-/washing buffer 1x (8-channel pipette, 250 µl/well). Invert the plate and tap it firmly on a clean paper towel to **remove all remaining liquid.**

8.2.2 Incubation with second antibody (anti Tumor M2-PK bio)

Vortex the 1:100 biotin-conjugated second monoclonal antibody = **anti Tumor M2-PK bio** (see also 8.1.4, page 25) and add 50 µl/well.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Washing: Empty the wells and wash each well 3 times with sample-/washing buffer 1x (8-channel pipette, 250 µl/well). Invert the plate and tap it firmly on a clean paper towel to **remove all remaining liquid.**

8.2.3 Incubation with POD-Streptavidin

Vortex ready-to-use **POD-Streptavidin** (black plastic vial with black cap) and add 50 µl/well

Incubate for 30 minutes in the dark at room temperature.

Washing: Empty the wells and wash each well 3 times with sample-/washing buffer 1x (8-channel pipette, 250 µl/well). Invert the plate and tap it firmly on a clean paper towel to **remove all remaining liquid.**

8.2.4 Colour reaction

Vortex ready-to-use **substrate solution** (black plastic vial with red cap) and add 100 µl to each well.

Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature.

(You may need to shorten this time when using an ELISA plate-reader or a fully automated machine which reads absorbances up to only 2.5 or 3.)

8.2.5 Stopping the colour reaction

Vortex **stop solution** (ready-to-use, white cap) and stop the substrate reaction by adding 100 µl per well. **Mix contents well by agitating the plate.**

8.2.6 Measurement

Read the optical density at **450 nm** with a microtiter plate reader between 5 and 30 minutes after addition of the stop solution. Mix contents well before measuring. **620 nm** can be used as a reference wavelength.

8.3 Quantification of results

8.3.1 Manual evaluation

Calculate the mean optical densities of all duplicates after mean blank value has been subtracted. Plot the concentration of standards versus their corresponding optical densities on a log-log paper = standard curve. The concentration of samples can be read directly from the standard curve since the dilution factor was taken into account in the production of the standards.

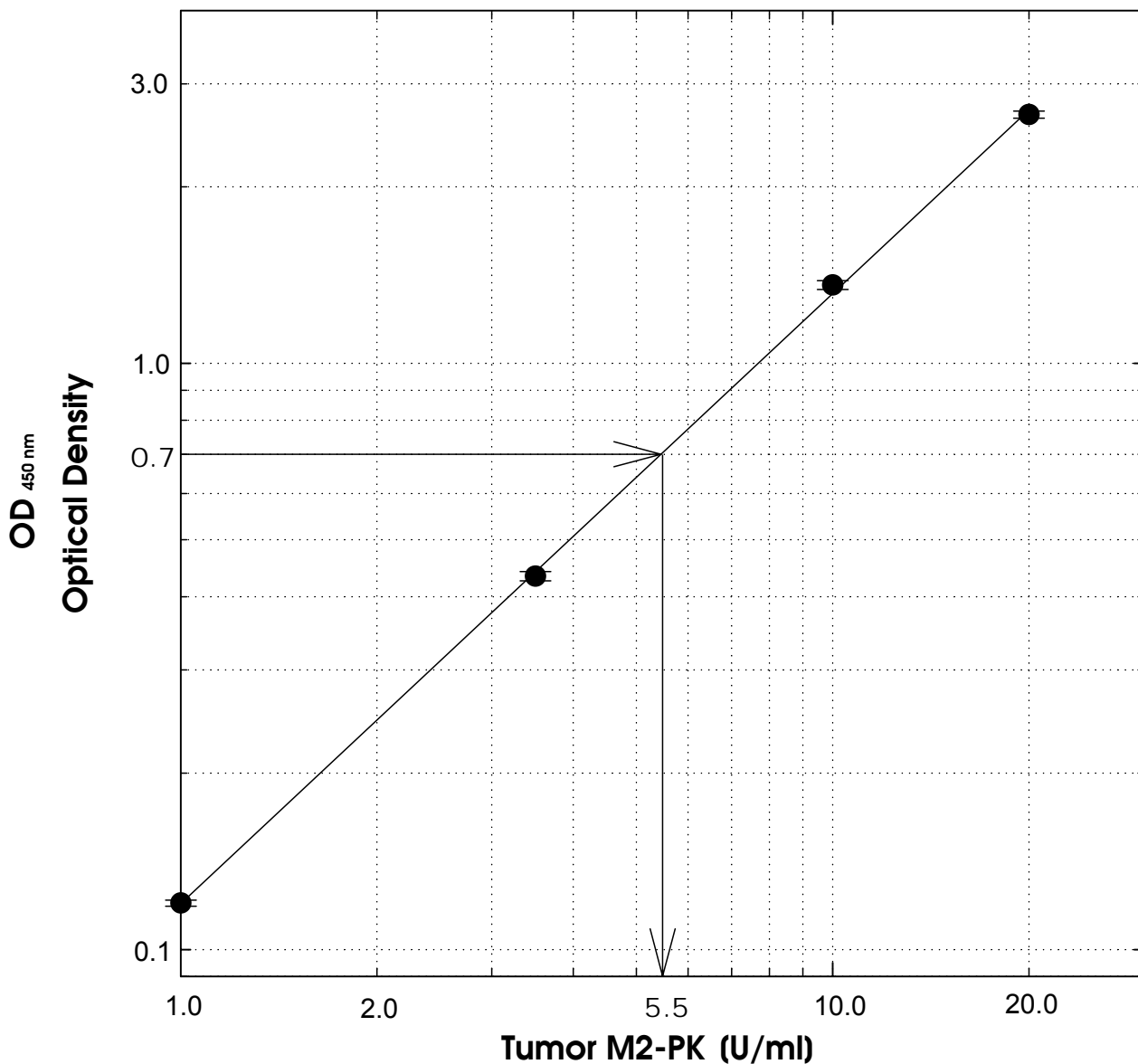


Figure 3: Typical example of a standard curve

Example: The average OD after subtracting the mean blank is 0.7. This corresponds to a Tumor M2-PK concentration of 5.5 U/ml.

8.3.2 Evaluation by ELISA - Software

Define blank, standards and samples according to the plate layout (figure 2). Use the curve - fit method (linear regression) with **log - log scale**. **Do not enter a dilution factor**, since the dilution of the samples has been taken into account in the production of the standards.

8.3.3 Reference Concentration for Tumor M2-PK in Stool

cut-off: 4 U/ml

Values > 4 U/ml = A raised level of Tumor M2-PK in the stool can be an indicator of colorectal polyps or colorectal cancer. Raised levels can also occur in acute and chronic inflammatory bowel disease and some other diseases of the digestive tract.

A reference concentration of 4 U/ml corresponds to a sensitivity of 80% (n=704 patients with colorectal cancer) at a specificity of 96% (n=7793 asymptomatic people).

9 Interferences

Due to dilution the Tumor M2-PK concentration may be lowered in very watery stool samples, which could lead to false negative (normal) results. Therefore it is recommended to note the consistency of watery stools. In case of a normal result (≤ 4 U/ml) a formed stool sample should be requested. There are no other factors known which interfere with the test.

10 Additional investigations

Further investigations (e.g. colonoscopy, gastroscopy, CT or ultrasound scan) should always be conducted to confirm a pathological result or where there remains the clinical suspicion of a cancer or a pre-malignant condition. The test is not a substitute for colonoscopy.

11 Literatur - References

Tumor M2-PK im Stuhl - Tumor M2-PK in Stool

Eigenbrodt, E., Hardt, P.D., Toepler, M., Schlierbach, P., Klör, H.U. Tumor M2-PK: A new tool for metabolic profiling of gastrointestinal tumors, **Poster from the 31st Meeting of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine (ISOBM), 30 August - 04 September 2003, Edinburgh, UK**

Ewald, N., Toepler, M., Akinci, A., Kloer, H.U., Bretzel, R.G., Hardt, P.D. Pyruvate kinase M2 (tumor M2-PK) as a screening tool for colorectal Cancer (CRC), A review of current published data, **Z Gastroenterol 43:1313-1317 (2005)** Review, German

Ewald, N., Schaller, M., Bayer, M., Akinci, A., Bretzel, R.G., Kloer, H.U., Hardt, P.D. Fecal Pyruvate Kinase-M2 (Tumor M2-PK) Measurement: A New Screening Concept for Colorectal Cancer, **Anticancer Research 27: 1949-1952 (2008)**

Hardt, P.D., Mazurek, S., Toepler, M., Schlierbach, P., Bretzel, R.G., Eigenbrodt, E., Kloer, H.U. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer, **British Journal of Cancer 91: 980-984 (2004)**

Hardt, P.D., Ngoumou, B., Rupp, J., Kloer, H.U. Measurement of fecal Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, **Anticancer Research 23: 851-854 (2003)**

Hardt, P.D., Toepler, M., Ngoumou, B., Rupp, J., Kloer, H.U. Fecal Pyruvate Kinase Concentrations (ELISA based on a Combination of Clone 1 and Clone 3 Antibodies) for Gastric Cancer Screening, **Anticancer Research 23: 855-858 (2003)**

Hardt, P.D., Toepler, M., Ngoumou, B., Rupp, J., Kloer, H.U. Measurement of Fecal Pyruvate-Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, **Poster from Perspectives in Colorectal Cancers: A Consensus Meeting, Barcelona, Spain, 19 -21 June, 2002**

Hardt, P.D., Toepler, M., Ngoumou, B., Rupp, J., Kloer, H.U. Measurement of Fecal Pyruvate-Kinase Type M2 (Tumor M2-PK) Concentrations in Patients with Gastric Cancer, Colorectal Cancer, Colorectal Adenomas and Controls, **Poster from the 2nd Colorectal Cancer Conference, 24 - 25 October 2002, Rome, Italy,**

Hardt, P.D., Toepler, M., Ngoumou, B., Rupp, J., Kroeger, R.M., Kloer, H.U. Measurement of fecal tumor M2-PK concentrations in patients with gastrointestinal cancer, **Kongress für Laboratoriumsmedizin 2002, 18 - 20 November 2002, Düsseldorf, Germany**

Hardt, P.D., Toepler, M., Schlierbach, P., Ngoumou, B., Rupp, J., Nalop, J., Klör, H.U. Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening Marker für kolorektale Karzinome, **Beitrag zur 109. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 26 – 30 April 2003, Wiesbaden, Germany**

Hardt, P.D., Toepler, M., Schlierbach, P., Ngoumou, B., Rupp, J., Nalop, J., Klör, H.U. Messung der Tumor M2-Pyruvatkinase im Stuhl als Screening-Marker für kolorektale Karzinome, **MedReview 5/2003**

Hardt, P.D., Schlierbach, P., Toepler, M., Bretzel, R.G., Klör, H.U. Faecal levels of Tumor M2-PK: sensitivity, specificity and correlation with tumour staging in colorectal cancer, **Poster from the NCRI Cancer Conference, 2-5 October 2005, Birmingham/UK**

Haug, U., Rothenbacher, D., Hardt, P.D., Kloer H.K., Stegmaier, Ch., Brenner, H. Tumor M2-PK Stool Test: a promising method for colorectal cancer screening, **Abstract from the 26th Deutscher Krebskongress 27.02. - 01.03. 2004, Berlin, Germany**

Haug U., Rothenbacher D., Wente M.N., Seiler, C.M., Stegmaier C., Brenner, H. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients, **British Journal of Cancer 96: 1329-1334 (2007)**

Kloer, H.U., Hardt, P.D., Schlierbach, P., Toepler, M., The tumor metabolic marker Tumor M2-PK in stool: a new biomarker for colorectal cancer, **Poster from the ASCO 41st Annual Meeting, May 13-17, 2005 Orlando/USA**

Koss, K., Maxton, D., Jankowski, J.A.Z., The potential use of fecal dimeric M2 pyruvate kinase (Tumor M2-PK) in screening for colorectal cancer (CRC), **Poster from the Digestive Disease Week (DDW), 14-19 May 2005, Chicago/USA**

Koss, K., Maxton, D., Jankowski, J.A. Faecal dimeric M2 pyruvate kinase in colorectal cancer and polyps correlates with tumour staging and surgical intervention, **Colorectal Dis.10: 244-248 (2007)**

Kumar ,Y.,Tapuria, N., Kirmani, N., Davidson, B.R. Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker, **Eur J Gastroenterol Hepatol 19: 265-276 (2007)**

Mazurek, S. New molecular markers: M2-PK, **Presentation of the World Endoscopy Organization (WEO) Meeting, May 2011, Chicago, USA**. Retrieved from:http://www.worldendo.org/assets/downloads/pdf/resources/ccsc/2011/w eo_crc11_1_1_2_mazurek.pdf

Mazurek, S., Hardt, P.D., Toepler, M., Schlierbach, P., Bretzel, R.G., Eigenbrodt, E., J., Kloer, H.U. Tumor M2-PK Stool Test: A new tool for colorectal cancer screening, **Poster from the 2nd Biebrich Interdisciplinary Conference Colon and Rectal Cancer, 2 – 4 Oct. 2003, Wiesbaden-Biebrich, Germany**

Mc Loughlin, R., Shiel, E., Sebastian, S., Ryan, B., O'Connor, H.J., O'Morain, C., Tumour M2-PK, a novel screening tool for colorectal cancer. **Poster from the NCRI Cancer Conference, 2-5 October 2005, Birmingham/UK**

Toepler, M., Schlierbach, P., Hardt, P.D., Bretzel, R.G., Kloer, H.U. Tumor M2-PK: A screening tool for colorectal cancer, **Poster from the 12th Hamburger Symposium on Tumor Markers, 30 November - 2 December 2003, Hamburg/Germany**

Tonus, C., Neupert, G., Sellinger, M. Colorectal cancer screening by non-invasive metabolic biomarker fecal tumor M2-PK, **World Journal of Gastroenterology 12: 7007-7011 (2006)**

Vogel, T., Driemel, C., Hauser, A., Hansmann, A., Lange, S., Jonas, M., Möslein, G. Comparison of different stool tests for the detection of cancer of the colon, **Dtsch Med Wochenschr 130: 872-877 (2005)** German

Tumor M2-PK im EDTA-Plasma und Allgemeine Literatur - Tumor M2-PK in EDTA-Plasma and General References

Brinck, U., Eigenbrodt, E., Oehmke, M., Mazurek, S. Fischer, G. L- and M2-Pyruvate Kinase Expression in Renal Cell Carcinomas and their Metastases, **Virchows Arch 424: 177-185 (1994)**

Cerwenka, H., Aigner, R., Bacher, H., Werkgartner, G., El-Shabrawi, A., Quehenberger, F., Mischinger H.J. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2) CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions, **Anticancer Research 19: 849-852 (1999)**

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., Cantley, L.C. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, **Nature 452: 230-233 (2008)**

Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Wu, N., Asara J.M., Cantley, L.C. Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine-binding protein, **Nature 452: 181-186 (2008)**

Eigenbrodt, E., Basenau, D., Holthausen, S., Mazurek, S., Fischer, G. Quantification of Tumor Type M2 Pyruvate Kinase (Tu M2-PK) in Human Carcinomas, **Anticancer Research 17: 3153-5156 (1997)**

Eigenbrodt, E., Kallinowski, F., Ott, M., Mazurek, S., Vaupel, P. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors, **Anticancer Research 18: 3267-3274 (1998)**

Eigenbrodt, E., Mazurek, S., Friis, R.R. Double role of pyruvate kinase type M₂ in the regulation of phosphometabolite pools, in: **Cell Growth and Oncogenesis, Bannasch, P., Kanduc, D., Papa, S., Trager, J.M. (eds), Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland (1998)**

Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R. Double Role for Pyruvate Kinase Type M2 in Expansion of Phosphometabolite Pools Found in Tumor Cells, **Crit Rev Oncog 3: 91-115 (1992)**

Elia, S., Massoud, R., Guggino, G., Cristino, B., Cortese, C., De Massimi, A.R., Zenobi, R. Tumor type M2-pyruvate-kinase levels in pleural fluid versus plasma in cancer patients: a further tool to define the need for invasive procedures. **Eur J Cardiothorac Surg. 33 (4): 723-727 (2008)**

Fischer, G., Holzrichter, S., Reinacher, M., Heinrichs, M., Dembowski, J., Eigenbrodt, E. Immunohistochemische Darstellung der L- und M2-Pyruvatkinase in primären Nierenzellkarzinomen und deren Metastasen, **Verh Dtsch Ges Path 73: 422-427 (1989)** German

Goonetilleke, K.S., Mason, J.M., Siriwardana, P., King, N.K., France, M.W., Siriwardana, A.K. Diagnostic and Prognostic Value of Plasma Tumor M2 Pyruvate Kinase in Periapillary Cancer, Evidence for a Novel Biological Marker of Adverse Prognosis, **Pancreas 34: 318-324 (2007)**

Hardt, P.D., Ngoumou, B.K., Rupp, J., Schnell-Kretschmer, H., Kloer, H.-U. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastrointestinal cancer, **Anticancer Research 20: 4965-4968 (2000)**

Hathurusinghe, H.R., Goonetilleke, K.S., Siriwardana, A.K. Current status of tumor M2 pyruvate kinase (tumor M2-PK) as a biomarker of gastrointestinal malignancy. **Ann Surg Oncol. 14 (10): 2714-2720 (2007)**

Hoopmann, M., Warm, M., Mallmann, P., Thomas, A., Göhring U.-J., Schöndorf, Th. Tumor M2 pyruvate kinase – determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy, **Cancer Letters 187: 223 – 228, (2002)**

Hugo, F., Fischer, G., Eigenbrodt, E. Quantitative Detection of Tumor M2-PK in Serum and Plasma, **Anticancer Research 19: 2753 – 2758 (1999)**

Kaura, B., Bagga, R., Patel, F.D. Evaluation of the Pyruvate Kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical cancer, **J Obstst Gynaecol Res 30: 193-196, (2004)**

Koss, K., Harrison, R.F., Gregory, J., Darnton S. J., Anderson, M.R., Jankowski, J.A.Z. The metabolic tumor marker pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) shows increased expression along the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's oesophagus, **J Clin Pathol 57: 1156-1159 (2004)**

Kumar, Y., Gurusamy, K., Pamecha, V., Davidson, B.R. Tumor M2-pyruvate kinase as tumor marker in exocrine pancreatic cancer a meta-analysis. **Pancreas. 35 (2): 114-119 (2007)**

Kumar ,Y., Tapuria, N., Kirmani, N., Davidson, B.R. Tumour M2-pyruvate kinase: a gastrointestinal cancer marker, **Eur J Gastroenterol Hepatol 19: 265-276 (2007)**

Lüftner, D., Mesterharm J., Akrivakis, C., Geppert, R., Petrides P.E., Wernecke, K.-D., Possinger K. Tumor Type M2 Pyruvate Kinase Expression in Advanced Breast Cancer, **Anticancer Research 20: 5077-5082 (2000)**

Lüftner, D., Schweigert, M., Geppert, R., Possinger, K. Tumor Type M2 Pyruvate Kinase in Colorectal Cancer: A Predictive Activity Marker versus Classical Mass Tumor Markers, **Abstract of the 3rd International Conference – Perspectives in Colorectal Cancer June 7-9, 2001, Dublin, Ireland**

Mazurek, S., Boschek, C.B., Hugo, F., Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading, **Semin Cancer Biol. 15: 300-308 (2005)**

Mazurek, S., Drexler, H.C., Troppmair, J., Eigenbrodt, E., Rapp, U.R. Regulation of pyruvate kinase type M2 by A-Raf: a possible glycolytic stop or go mechanism. **Anticancer Research 27: 3963-3971 (2007)**

Mazurek, S., Eigenbrodt, E. The tumor metabolome, **Anticancer Research 23: 1149-1154 (2003)**

Mazurek, S., Grimm, H., Boschek, C.B., Vaupel, P., Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 a crossroad in the tumor metabolome, **British Journal of Nutrition 87, Suppl. 1, 23-29, (2002)**

Mazurek, S., Grimm, H., Oehmke, M., Weisse, G., Teigelkamp, S. Eigenbrodt, E. Tumor M2-PK and Glutaminolytic Enzymes in the Metabolic Shift of Tumor Cells, **Anticancer Research 20: 5151-5154 (2000)**

Mazurek, S., Grimm, H., Wilker, S., Leib, S., Eigenbrodt, E. Metabolic characteristics of different malignant cancer cells lines, **Anticancer Research 18: 3275-3282 (1998)**

Mazurek, S., Lüftner D., Wechsel, H.W., Schneider J., Eigenbrodt, E. Tumor M2-PK: A Marker of the Tumor Metabolome, in: **Tumor Markers: Physiology, Pathobiology, Technology, and Clinical Applications, Diamandis E.P. et al. (Editors) AACC Press 2002, 471-475 (2002)**

Mazurek, S., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Michel, A., Fischer, G., Basenau, D., Dahlmann, N., Laumen R., Eigenbrodt, E. Die Bedeutung der Pyruvatkinase in der Onkologie, **notabene medici Jg. 23: 97 - 104 (1993)**

Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7, **Oncogene 20: 6891-6898 (2001)**

Oehler, R., Weingartmann, G., Manhart, N., Salzer, U., Meissner, M., Schlegel, W., Spittler, A., Bergmann, M., Kandioler, D., Oismüller, Ch., Struse, H.M., Roth, E. Polytrauma induces increased expression of pyruvate kinase in neutrophils, **Blood, 95: 1086-1092 (2000)**

Oremek, G.M., Eigenbrodt, E., Rädle, J., Zeuzem, St. Seiffert, U.B. Value of the Serum Levels of the Tumor Marker Tu M2-PK in Pancreatic Cancer, **Anticancer Research 17: 3031-3034 (1997)**

Oremek, G.M., Gerstmeier F., Sauer-Eppel, H., Sapoutzis, N., Wechsel, H.W. Pre-analytical Problems in the Measurement of Tumor Type Pyruvate Kinase (Tumor M2-PK), **Anticancer Research 23: 1127-1130 (2003)**

Oremek, G.M., Müller, R., Sapoutzis, N., Wigand, R. Pyruvate Kinase Type Tumor M2 Plasma Levels in Patients Afflicted with Rheumatic Diseases, **Anticancer Research 23: 1131-1134 (2003)**

Oremek, G.M., Rox ,St., Mitrou, P., Sapoutzis, N., Sauer-Eppel-H. Tumor M2-PK Levels in Haematological Malignancies, **Anticancer Research 23: 1135-1138 (2003)**

Oremek, G.M., Rutner, F., Sapoutzis, N., Sauer-Eppel, H. Tumor Marker Pyruvate Kinase Type Tumor M2 in Patients Suffering from Diabetic Nephropathy, **Anticancer Research 23: 1155-1158 (2003)**

Oremek, G.M., Sapoutzis, N., Kramer, W., Bickeböller, R., Jonas, D. Value of Tumor M2 (Tu M2-PK) in Patients with Renal Carcinoma, **Anticancer Research 20: 5095-5098 (2000)**

Oremek, G.M., Teigelkamp, S., Kramer, W., Eigenbrodt, E., Usadel, K.-H. The Pyruvate Kinase Isoenzyme Tumor M2 (Tumor M2-PK) as a Tumor Marker for Renal Carcinoma, **Anticancer Research 19: 2599-2602 (1999)**

Presek, P., Reinacher, M., Eigenbrodt, E. Pyruvate kinase type M2 is phosphorylated at tyrosine residues in cells transformed by Rous sarcoma virus, **FEBS Letters 242: 194-198 (1988)**

Roigas, J., Schulze, G., Raytarowski, S., Jung, K., Schnorr D., Loening, S.A. Tumor M2 Pyruvate Kinase in Plasma of Patients with Urological Tumors, **Tumor Biol 22: 282-285 (2001)**

Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Michel, A., Will, H., Fischer, G., Basenau, D., Dahlmann, N., Laumen, R., Mazurek, S., Eigenbrodt, E. Quantitative determination (ELISA) of pyruvate kinase type tumor M2, in: **Current Tumor Diagnosis, Applications, Clinical Relevance, Research-trends. R. Klapdor (ed.), W. Zuckschwerdt Verlag GmbH, München. (1994)**

Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer, **Adv Clin Chem 42: 1-41 (2006)**

Schneider, J., Bitterlich, N., Schulze, G. Improved Sensitivity in the Diagnosis of Gastro-intestinal Tumors by Fuzzy Logic-based Tumor Marker Profiles Including the Tumor M2-PK, **Anticancer Res 25: 1507-1515 (2005)**

Schneider J., Morr, H., Velcovsky, H.-G., Weisse, G., Eigenbrodt, E. Quantitative Detection of Tumor M2-Pyruvate Kinase in Plasma of Patients with Lung Cancer in Comparison to other Lung Diseases, **Cancer Detection and Prevention 24: 531-535 (2000)**

Schneider, J.; Neu, K.; Grimm, H.; Velcovsky, H.-G.; Weisse, G.; Eigenbrodt, E. Tumor M2-Pyruvate Kinase in Lung Cancer Patients: Immunohistochemical Detection and Disease Monitoring, **Anticancer Research, 22: 311-318 (2002)**

Schneider, J., Neu, K., Grimm, H., Velcovsky, H.-G., Morr, H., Eigenbrodt, E. Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study, **Cancer Letters 193: 91-98 (2003)**

Schneider, J., Petri, G., Bitterlich, N., Neu, K., Velcovsky, H.G., Morr, H., Katz, N., Eigenbrodt, E. Fuzzy logic-based tumor marker profiles including a new marker tumor M2-PK improved sensitivity to the detection of progression in lung cancer patients, **Anticancer Research 23: 899-906 (2003)**

Schneider, J., Petri, G., Bitterlich, N., Philipp, M., Velcovsky, M.G., Morr, H., Katz, N., Eigenbrodt, E. Fuzzy logic-based tumor marker profiles improved sensitivity of the detection of progression in small-lung cancer patients, **Clin Exp Med 2: 185-191 (2003)**

Schneider, J., Schulze G. Comparison of tumor M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK), carcinoembryonic antigen (CEA), carbohydrate antigens CA 19-9 and CA 72-4 in the diagnosis of gastrointestinal cancer, **Anticancer Research 23: 5089-5093 (2003)**

Schneider, J., Velcovsky, H.-G., Morr, H., Katz, N., Neu, K., Eigenbrodt, E. Comparison of the Tumor Markers Tumor M2-PK, CEA, Cyfra 21-1, NSE and SCC in the Diagnosis of Lung Cancer, **Anticancer Research 20: 5053-5058 (2000)**

Schulze, G. The Tumor Marker Tumor M2-PK: An Application in the Diagnosis of Gastrointestinal Cancer, **Anticancer Research 20: 4961-4964 (2000)**

Spoden, G.A.; Mazurek, S.; Morandell, D.; Bacher, N.; Ausserlechner, M.J.; Jansen-Dürr, P.; Eigenbrodt, E.; Zwerschke, W. Isotype-specific inhibitors of the glycolytic key regulator pyruvate kinase subtype M2 moderately decelerate tumor cell proliferation. **Int J Cancer, 123 (2): 312-321 (2008)**

Steinberg, P. Klingelhöffer, A., Schäfer, A., Wüst, G., Weiße, G., Oesch, F., Eigenbrodt, E. Expression of pyruvate kinase M₂ in preneoplastic hepatic foci of *N*-nitrosomorpholine-treated rats, **Virchows Arch 434: 213-220 (1999)**

Ugurel, S., Bell, N., Sucker, A., Zimpfer, A., Rittgen, W., Schadendorf, D. Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma, **Int J Cancer 117: 825-830 (2005)**

Wechsel, H.W., Feil, G., Lahme, S., Koeser, W., Bichler, K.H. Die plasmainaktive Form der Pyruvatkinase (pTuM2PK) beim Nierenzellkarzinom: ein geeigneter Tumormarker?, **Akt Urol 30, 249-253 (1999)**

Wechsel, H.W., Petri, E., Feil, G., Bichler, K.-H. Tumor Specific Pyruvate Kinase (Tumor M2-PK): A potential marker for renal cell carcinoma (RCC), **J Urology** **157: 424 (1997)**

Wechsel, H.W., Petri, E., Bichler, K.-H., Feil, G. Marker for Renal Cell Carcinoma (RCC): The Dimeric Form of Pyruvate Kinase Type M2 (Tumor M2-PK), **Anticancer Research** **19: 2583-2590 (1999)**

Wechsel, H.W., Petri, E., Feil, G., Nelde, H.-J., Bichler, K.-H. Nierenzellkarzinom, Immunhistologische Untersuchungen zur Expression der inaktiven Form der Pyruvatkinase, **Urologe (A)** **38, 583-585 (1999)**

Zhang, B.; Chen, J.-Y.; Chen, D.-D.; Wang, G.-B. Shen, P. Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls, **World J Gastroenterol** **10: 1634-1646 (2004)**

Kurzanleitung für den routinierten Anwender



Wichtig: Die Kurzanleitung ersetzt nicht die ausführliche und detaillierte Anleitung im Inneren des Heftes !

ScheBo® • Tumor M2-PK™ Stuhltest zur quantitativen Bestimmung der Tumor M2-PK durch **medizinisches Fachpersonal**.

- Vorbereitung des Proben-/Waschpuffers (und des Extraktionspuffers)
- Stuhl homogenisieren/extrahieren
- je 50 µl Blank, Standards (gebrauchsfertig), Kontrolle (gebrauchsfertig) und Proben als Doppelbestimmung in ELISA-Platte pipettieren - 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren - Waschen
- je 50 µl anti Tumor M2-PK bio (1:100) - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren - Waschen
- je 50 µl POD-Streptavidin (gebrauchsfertig) - 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren - Waschen
- 100 µl Substratlösung (gebrauchsfertig) - 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Zugabe von 100 µl Stopplösung (gebrauchsfertig)
- Extinktionsbestimmung OD 450 oder OD 450 - OD 620
- Auswertung mittels doppellogarithmischer Standardkurve

Short protocol for the experienced user



Important: The short protocol is not a substitute for the detailed protocol in the inside of this leaflet !

ScheBo® • Tumor M2-PK™ Stool Test for the quantitative determination of Tumor M2-PK by **healthcare professionals**.

- Prepare the sample-/washing buffer (and the extraction buffer)
- Extract stool and homogenize
- Pipette 50 µl blank, standards (ready-to-use), control (ready-to-use) and samples in duplicate into the ELISA-strips-Incubate 60 minutes at room temperature - Wash
- 50 µl anti Tumor M2-PK bio (1:100)-Incubate 30 minutes at room temperature -Wash
- 50 µl POD-Streptavidin (ready-to-use) - Incubate 30 minutes at room temperature (in the dark) - Wash
- 100 µl substrate solution (ready-to-use) - Incubate 15 minutes at room temperature (in the dark)
- Add 100 µl stop solution (ready-to-use)
- Read plate at OD 450 or OD 450 - OD 620
- Evaluate with standard curve using a log-log scale