



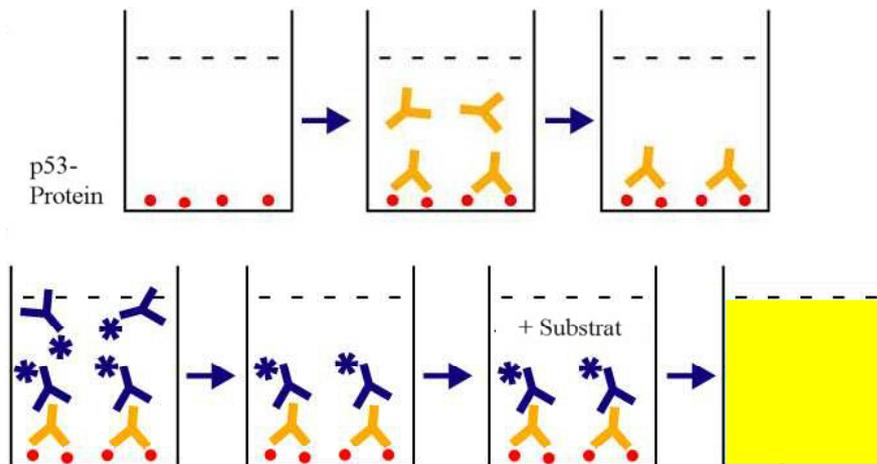
STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE

p53-Autoantikörper ELISA^{plus}

Kat.-Nr. p53 Aak

Gebrauchsanleitung

Version: 015-17.03.2011



CE



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Messprinzip	5
3	Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen	5
4	Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel	5
5	Packungsinhalt	5
5.1	Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge	6
6	Haltbarkeitsdaten	7
6.1	Hinweise zur Entsorgung	7
7	Aufarbeitung der Proben	7
8	Testdurchführung	8
8.1	Arbeitsvorbereitung	8
8.2	Arbeitsanleitung	8
9	Bewertung der Einzelmesswerte	9
9.1	Vertrauensbereich der Kontrollen	9
9.2	Interne Qualitätskontrolle	9
10	Auswertung	9
10.1	Beispiel	10
11	Problembehandlung	12
12	Test-Charakteristika	13
13	Literatur	14
14	Arbeitsanleitung (Kurzfassung)	16

Symbol	Erklärung
	Chargen-Nummer
	Artikelnummer
	Verwendbar bis ...
	Lagerung bei

Symbol	Erklärung
	Gebrauchsanweisung beachten
	Reagenz zur in-vitro Diagnostik
	Hersteller
	CE Kennzeichen gemäß Richtlinie 98/79/EG



STZ Ang. Biol. Chem., Schulzenstr.4, D-68259 Mannheim



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

1 Einleitung

Das p53-Tumorsuppressorgen ist von besonderem Interesse für die onkologische Diagnostik, da in ca. 60% aller Tumoren Mutationen in diesem Gen auftreten. Diese Mutationen haben eine p53-Proteinakkumulation innerhalb der Zelle zur Folge. In einem nicht endgültig geklärten Mechanismus kann es zu einer Immunreaktion kommen, die zur Bildung von p53-Autoantikörpern führt. Zahlreiche Studien beschreiben p53-Autoantikörper im Serum von verschiedensten Tumorpatienten (1-14) bei Krankheiten wie beispielsweise Darmtumoren, Ovarialtumoren, Mundhöhlenkarzinomen, Tumoren im Hals-Kopf-Bereich, Trophoblast-Tumoren, und Lungentumoren. Der Nachweis von p53-Autoantikörpern gilt als spezifischer Malignitätsmarker. Der p53 Autoantikörper-Status kann wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf einzelner Patienten liefern. Eine postoperative Abnahme des Antikörpertiters kann eine komplette Tumor-Resektion sowie eine nachfolgend erfolgreiche Chemotherapie anzeigen.

Der Prozentsatz p53 positiver Patientenserum variiert teilweise beträchtlich. Ursache hierfür ist wahrscheinlich die unterschiedliche Spezifität verschiedener Assaysysteme, die auch von Rohayem et al. in (15) beschrieben wurde. Der p53 Autoantikörper ELISA des STZ für Angewandte Biologische Chemie wird in dieser Arbeit als der mit der höchsten diagnostischen Zuverlässigkeit charakterisiert.

In frühen Stadien maligner **Darmtumoren**, in denen etablierte Tumormarker wie beispielsweise CEA eine geringe Sensitivität besitzen, liefert der von CEA unabhängige p53 Autoantikörper Parameter zusätzliche Daten. Die Kombination der Tumormarker CEA und p53 Autoantikörper erhöht daher signifikant die Sensitivität des Patientenmonitorings bei Darmkrebserkrankungen in frühen Stadien (16). Der p53 Autoantikörper Parameter wird bei solchen Patienten für das Patientenmonitoring eingesetzt. p53 Autoantikörper zeichnen sich hier durch hohe Korrelation mit Tumorregression oder Progression aus, durch die hohe Spezifität (100%) eröffnet sich ein Potential für die Frühdiagnose einer Rückfallerkrankung (1). Ebenso beschreiben Takeda und Kollegen in (12) eine signifikante Korrelation zwischen erfolgreicher Tumor Resektion und dem postoperativen Verschwinden von p53 Autoantikörper bei Darmkrebspatienten.

Ein schnellen und spezifischen Abfall des p53 Autoantikörpertiters wurde von Zalzman und Mitarbeitern bei **Lungenkrebspatienten** beobachtet, die mittels Chemotherapie erfolgreich behandelt wurden (11).

Der Nachweis von p53 Autoantikörpern eignet sich für die differenzierte Diagnose von **Trophoblasttumoren**. Die regelmäßige p53 Autoantikörper Bestimmung ist für das Patientenmonitoring bezüglich Krankheits- und Therapieverlauf geeignet (2).

Bei malignen Erkrankungen wie beim Pankreaskarzinom, Prostatakarzinom, Leukämien oder dem malignen Melanom werden p53 Autoantikörper weniger häufig beobachtet und sind von geringerem klinischen Wert (5,3).



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

p53 Autoantikörper sind nicht spezifisch für eine bestimmte Krebserkrankung. Da diese Antikörper in Patienten mit nicht malignen Erkrankungen (s.u.) nur sehr selten beobachtet werden, ist die Spezifität dieses Markers höher wie die vieler anderer Tumormarker.

In seltenen Fällen lassen sich auch bei einigen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Lupus erythematodes, Morbus Wegener, Morbus Basedow, p53-Autoantikörper nachweisen, wobei hier lediglich sehr niedrige Serum-Autoantikörper-Titer auftreten (16). In einer quantitativen Studie zeigten alle p53 Autoantikörper positiven Autoimmunpatienten einen sehr geringen Antikörpertiter, der sich in einem Bereich knapp über dem cut-off Wert bewegte (17). Dieser bemerkenswerte Unterschied im Antikörpertiter verdeutlicht die Notwendigkeit einer Quantifizierung des p53 Autoantikörpertiters. Allerdings sollte immer dann, wenn p53 Autoantikörper nachgewiesen werden, die Möglichkeit einer klinisch unauffälligen Krebserkrankung in Betracht gezogen werden.

Hauptindikation zur Bestimmung von p53 Autoantikörpern ist die Bestätigung klinischer Daten bezüglich eines Tumorverdachtes und zusätzliche Informationen zum Krankheitsverlauf des Tumorpatienten.

Der p53 Autoantikörper ELISA des STZ Angewandte Biologische Chemie zeichnet sich durch ein hohes Signal-Rauschverhältnis aus. Der STZ ELISA besitzt im Vergleich mit zwei anderen kommerziell erhältlichen Systemen die höchste diagnostische Zuverlässigkeit (15).

Mit dem p53-Autoantikörper-ELISA des STZ kann auf eindeutige Art und Weise der p53-Autoantikörper-Status semiquantitativ im Serum von Tumorpatienten bestimmt werden. Dadurch ist es möglich, Änderungen patientenspezifischer Autoantikörperkonzentrationen einfach zu bestimmen und damit frühzeitig Informationen zum Krankheitsverlauf während der Therapie zu erhalten.

Der p53 Autoantikörper ELISA^{plus} ermöglicht durch eine verbesserte Empfindlichkeit die Bestimmung von sehr geringen p53 Antikörpertiter und besitzt dadurch eine höhere Sensitivität.



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

2 Messprinzip

Sandwich-ELISA mit Festphase-gekoppeltem, rekombinantem p53-Protein, das die anti-p53-Autoantikörper aus der Serumprobe bindet; der Nachweis erfolgt über ein Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Human IgG als Detektor und anschließende Messung einer Peroxidase-bedingten Farbstoffumsetzung.

3 Allgemeine Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Alle Reagenzien dieses Kits dürfen nur zu *in vitro*-Untersuchungen verwendet werden.
- Materialien verschiedener Kits dürfen nicht untereinander gemischt werden.
- Das menschliche Serum, das in den Kontrollen enthalten ist, wurde auf Antikörper gegen Hepatitis B Virusantigene, Hepatitis C Virusantigene und Human-Immunschwäche-Virus (HIV1+2) negativ befundet. Trotzdem sollten die gebotenen Vorsichtsmaßnahmen für potentiell infektiöse Materialien eingehalten werden.

4 Erforderliche Laborgeräte und Hilfsmittel

- Mikropipette für 0,5 - 10µl und 50 - 200µl Volumina.
- Multipipette oder 8-Kanal-Pipette für 50µl-, 100µl- und 200µl Volumina.
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten (auch manuelles Waschen möglich).
- Photometer für Mikrotiterplatten.

5 Packungsinhalt

[Kennzeichnung nach den Kriterien der Gefahrstoffverordnung v. 26.08.1986 Gefahrenhinweise / Sicherheitsratschläge].

Alle Reagenzien sind in ungeöffnetem Zustand bei 2-8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Mikrotiterplatte

12 Streifen-Module à 8 Nöpfchen ("wells"), beschichtet mit Festphase-gebundenem, gereinigtem, rekombinantem p53-Protein.

Klammer

Zum Verschließen der Alufolie.

Reagenzientrog

Zum Pipettieren mit Mehrkanalpipette

Kalibrator

1,5 ml verdünntes Humanserum mit geprüfter p53-Autoantikörperkonzentration.

Negativ-Kontrolle

Gebrauchsfertige Lösung (1 ml) von Humanserum ohne p53-Autoantikörper.

Proben-Verdünnungspuffer

Lyophilisat (6 Flaschen) einer Proteinmatrix mit 0,05% Natrium-Azid zur Verdünnung der Proben. Das Lyophilisat wird mit jeweils 12 ml dest. Wasser rekonstituiert.

[R: 28-32; S: 28-45]



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

Detektor-Antikörper

Gebrauchsfertige Lösung (12 ml) eines anti-Human-IgG Antikörpers (Peroxidase-Konjugat) in einer Proteinmatrix.

Positivkontrolle

0,5 ml verdünntes Humanserum mit definierter p53-Autoantikörperkonzentration.

Substratlösung

Gebrauchsfertige vorgefärbte TMB-Lösung (12 ml) für den Peroxidase-Nachweis, lichtempfindlich.

[Xn gesundheitsschädlich, enthält 3,3,5,5,-Tetramethylbenzidin; R: 10-23/25-36/37/38; S: 7-16-24-45].

Stopplösung

2 N HCl (7,5 ml)

[C korrosiv, enthält Hydrochlorid; R: 34-36-37; S: 26-45].

Waschpuffer

Puffer (20x Konzentrat, 50 ml). Gebrauchslösung: 50 ml Konzentrat + 950 ml dest. Wasser.

5.1 Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge

- R 10:** Entzündlich
- R 28:** Sehr giftig beim Verschlucken
- R 32:** Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
- R 34:** Verursacht Verätzungen
- R 36:** Reizt die Augen
- R 37:** Reizt die Atmungsorgane
- R 23/25:** Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 36/37/38:** Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
- S 7:** Behälter dicht geschlossen halten
- S 16:** Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen
- S 24:** Berührung mit der Haut vermeiden
- S 26:** Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 28:** Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
- S 45:** Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich dieses Etikett vorzeigen)



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

6 Haltbarkeitsdaten

Reagenz	Lagerung		Haltbarkeit
Mikrotiterplatte	geöffnet / mit Klammer geschlossen	2-8°C	bis Verfallsdatum
Kalibrator	geöffnet	2-8°C	bis Verfallsdatum
Negativ-Kontrolle	geöffnet	2-8°C	bis Verfallsdatum
Positiv-Kontrolle	geöffnet	2-8°C	bis Verfallsdatum
Proben- Verdünnungspuffer	rekonstituiert	2-8°C	14 Tage
Detektor-Antikörper	geöffnet	2-8°C	bis Verfallsdatum
Substratlösung	geöffnet	2-8°C / dunkel	
Stopplösung	geöffnet	2-8°C oder RT	
Waschpuffer	geöffnet/verdünnt	2-8°C	

6.1 Hinweise zur Entsorgung

Chemikalien und Zubereitungen, die als Reststoffe anfallen, sind in der Regel Sonderabfälle. Deren Beseitigung unterliegt den abfallrechtlichen Gesetzen und Verordnungen des Bundes und der Länder. Die zuständige Behörde oder Abfallbeseitigungsunternehmen informieren über die Entsorgung von Sonderabfällen.

7 Aufarbeitung der Proben

Das Serum wird nach Koagulation der Blutproben durch Zentrifugation gewonnen. Die Serumproben sollten höchstens 24 h bei 2-8 °C gelagert werden; zur längeren Aufbewahrung empfiehlt sich die Lagerung geeigneter Aliquots bei -20 °C. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

Zur Messung des anti-p53-Antikörper-Gehalts im ELISA ist eine 1:100-Verdünnung der Proben in Proben-Verdünnungspuffer notwendig (z.B. 5 µl Serum + 495 µl Puffer).

Die Bestimmung des Antikörpertiters ist in 10 (Auswertung) beschrieben.



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

8 Testdurchführung

8.1 Arbeitsvorbereitung

- Alle Reagenzien unmittelbar vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- Rahmen der Mikrotiterplatte mit benötigter Anzahl von Streifen aus dem Beutel entnehmen. Für die Lagerung der restlichen Streifen den Beutel mit beigelegter Klammer verschließen.
- Herstellen der **Waschlösung** aus dem konzentrierten Waschpuffer durch Verdünnung von 50 ml Konzentrat mit 950 ml dest. Wasser.
- Lyophilisat des Proben-Verdünnungspuffers durch Zugabe von 12 ml dest. Wasser rekonstituieren.
- Die Serumproben vor Einsatz in dem Assay 1:100 in Proben-Verdünnungspuffer verdünnen (z.B. 5 µl Serum + 495 µl Puffer); Von Kalibratorverdünnungen, 1:3 verdünnte Positivkontrolle und unverdünnte Negativ-Kontrolle werden 100 µl/Einzelwert benötigt. Wir empfehlen das Ansetzen von Doppelwerten.

8.2 Arbeitsanleitung

1. Die im Rahmen fest eingeklemmten Streifen der Mikrotiterplatte werden mit 200 µl verdünntem Waschpuffer (= **Waschlösung**) kurz von dem Probenauftrag befüllt, 3 Minuten stehengelassen und danach dekantiert.
2. Unmittelbar anschließend werden neben einem Nullwert (100µl Probenverdünnungspuffer) jeweils 100 µl pro "well" der Kontrollen (siehe 10.1 **Kalibratorverdünnungen**, unverdünnte **Negativ-Kontrolle**, 1:3 verdünnte **Positiv-Kontrolle**) bzw. der **vorverdünnten Probenlösungen** einpipettiert. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Es schließt sich der folgende Waschschrift an: Mit einem Automaten wird fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer pro "well" gewaschen. Bei manuellem Waschen werden mit Hilfe der Multipipette oder 8-Kanal-Pipette 200 µl Waschlösung pro "well" einpipettiert und dekantiert. Dieses manuelle Waschen wird ebenfalls fünfmal durchgeführt.
3. Mit Hilfe der Multipipette werden von der gebrauchsfertigen **Detektor-Antikörper-Lösung** jeweils 100 µl pro "well" einpipettiert. Die Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wird wie unter Arbeitsschritt 2 beschrieben gewaschen.
4. Mit Hilfe der Multipipette werden von der gebrauchsfertigen **Substratlösung** je 100 µl pro "well" einpipettiert. Dieser Arbeitsschritt sollte zügig (innerhalb von 5 Minuten) vollzogen werden. Die Inkubation erfolgt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Reaktion muß weitestgehend im Dunkeln stattfinden (z.B. in einem Schrank).
5. Die Enzymreaktion wird dann durch Zugabe von 50 µl **Stopplösung** pro "well" abgebrochen. Dies bewirkt einen Farbumschlag nach gelb. Dieser Pipettierschritt sollte in der gleichen Reihenfolge und den gleichen Zeitintervallen erfolgen wie die Zugabe der Substratlösung.
6. Die **photometrische Messung** wird bei 450 nm durchgeführt (Referenzfilter von 630 nm oder 750 nm empfohlen). Darauf achten, dass keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind. (Sollte keine Referenzmessung möglich sein, kann alternativ von den E_{450} Messwerten ein Leerwert (Waschpuffer) abgezogen werden.



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

9.0 Bewertung der Einzelmesswerte

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzfilter von 630 nm oder 750 nm empfohlen). Sollten keine geeignete Referenzfilter vorhanden sein, kann alternativ von den E_{450} Messwerten ein Leerwert (Waschpuffer) abgezogen werden

9.1 Vertrauensbereich der Kontrollen

Bei korrekter Durchführung des Kits sollten die Extinktionen (E_{450}) der Kontrollen in den folgenden Vertrauensbereichen liegen:

	Kalibrator (1:2 verdünnt)	Negativ-Kontrolle
$E_{450-630}$	$> 0,5$	$\leq 0,3$

9.2 Interne Qualitätskontrolle

Der Testkit enthält eine Positivkontrolle für die interne Qualitätssicherung. Diese Positivkontrolle enthält p53 Autoantikörper in einer Konzentration von 14 U/ml. Als interne Kontrolle wird die 1:3 verdünnte Positiv-Kontrolle eingesetzt. Für die Gültigkeit des Messverfahrens muss der anhand der Eichkurve berechnete Antikörpertiter der Positiv-Kontrolle 1,4 U/Test ($\pm 25\%$) betragen.

10 Auswertung

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit dem mitgelieferten Standard (Kalibrator) für jeden Testlauf neu erstellt wird. Die lineare Eichkurve schneidet die x-Achse bei 0. Der Cut-off beträgt 120 U/ml Serum.

Negative Proben: Titer < 120 U/ml

Positive Proben: Titer > 120 U/ml

Kritischer Bereich: Titer 60-120 U/ml

Serumproben mit einem Titer von 60-120 U/ml werden „kritisch“ eingestuft, d.h. es ist möglich, dass p53-Autoantikörper in geringen Mengen vorhanden sind. Solche Patienten sollten 5-8 Wochen später erneut getestet werden.

1 Unit ist definiert als p53 Bindungsaktivität, die der Antikörperkonzentration von 100 μ l unverdünntem Kalibrator entspricht.



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

10.1 Beispiel

Verdünnen des Kalibrators

Der unverdünnte Kalibrator enthält p53 Autoantikörper in einer Konzentration von 10 U/ml. Aus dem Kalibrator wird mit Proben-Verdünnungspuffer eine Standardreihe angesetzt; empfohlen werden 4-6 Messwerte plus Nullwert (Probenverdünnungspuffer). Die Extinktion (E_{450}) von 100 μ l unverdünnten Kalibrators entspricht genau einer Unit (1U/Test).

	unverdünnt	1:2	1:4	1:8	1:16	Nullwert
Titer [U/Test]	1	0,50	0,25	0,125	0,063	0,0
Proben-Verdünnungspuffer (μ l)	-	100	150	175	187,5	100
Kalibrator (μ l)	100	100	50	25	12,5	0,0

Beispiel für die Berechnung des Antikörpertiters

	Verdünnung	$E_{450-630}$	U/Test ^Δ	U/Test _{unverdünnt}	U/ml
Nullwert		0,004	0,000		
Kalibrator	1 : 16	0,139	0,063		
Kalibrator	1 : 8	0,278	0,125		
Kalibrator	1 : 4	0,548	0,25		
Kalibrator	1 : 2	1,045	0,50		
Kalibrator	unverdünnt	2,319	1,00		
Probe 1	1:100	0,2	0,10	10	100
Probe 2	1:100	0,48	0,22	22	220
Probe 3	1:100	0,99	0,44	44	440
Probe 4	1:100	2,62	*		
Probe 4	1:1000	0,88	0,39	390	3900
Negativ-Kontrolle ^{&}	unverdünnt	0,129	0,07	7	70
Positiv-Kontrolle	1:3	1,054	0,47	1,41	14,1

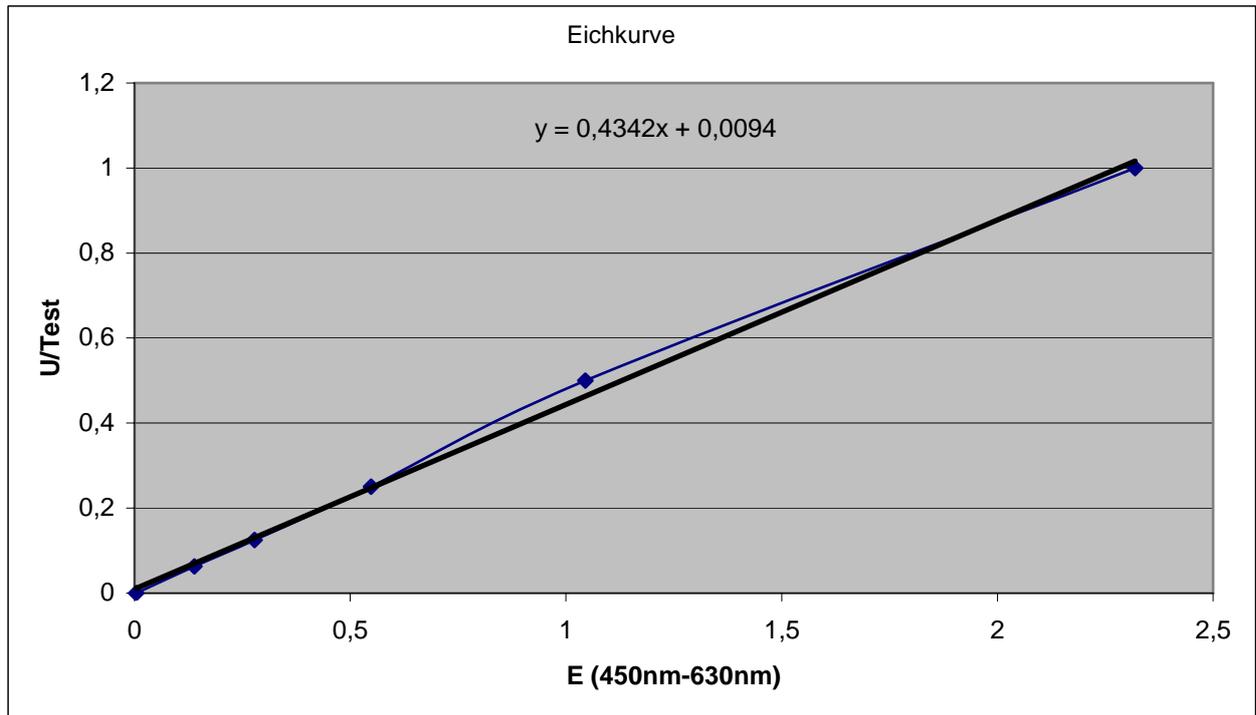
* Messwert außerhalb der Eichkurve

^Δ Testvolumen=100 μ l

& Negativkontrolle im Kit ist bereits 1:100 verdünnt (ready to use)



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**



(diese Eichkurve nicht zur Auswertung benutzen)

Serum-Proben

Die positiven Seren werden in Proben-Verdünnungspuffer so verdünnt, dass die Messwerte innerhalb der Eichkurve liegen (routinemäßig 1:100). Dies kann Verdünnungsschritte bis 1 : 5000 erfordern. Der Antikörpertiter der verdünnten Proben wird aus der Eichkurve abgelesen. Proben, deren Extinktion (E_{450}) außerhalb der Eichkurve liegt, müssen in höherer Verdünnung erneut getestet werden. Bei der Berechnung des Antikörpertiters wird die Verdünnung berücksichtigt.

$$\text{Antikörpertiter}_{\text{Eichkurve}} [\text{U/Test}] \times \text{Verdünnung}_{\text{Serum}} = \text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U/Test}]$$

$$\text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U/Test}] \times 10 = \text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U/ml}]$$

Positiv-Kontrolle / Negativ-Kontrolle

Im Kit ist ein vorverdünntes Serum mit einer definierten Menge p53 Autoantikörper (14 U/ml) als Positivkontrolle enthalten. Die Negativ-Kontrolle besteht aus einem 1:100 verdünnten Serum ohne p53 Autoantikörper.



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

11 Problembehandlung

Starker Hintergrund ($E_{\text{Kalibrator, 1:2 verdünnt}} > 2,0$)

Ein hoher Hintergrund kann durch zu wenig Waschen entstehen. Wenn ein Waschautomat verwendet wird, sollte der Waschdruck oder die Waschdauer überprüft werden. Bei manuellem Waschen muß zwischen den einzelnen Waschzyklen die Platte auf Papier trocken gedrückt werden, um die Waschlösung möglichst vollständig zu entfernen.

Zu schwache Extinktion des Kalibrators ($E_{\text{Kalibrator, 1:2 verdünnt}} < 0,5$)

Eine zu geringe Extinktion des Kalibrators kann durch zu starkes Waschen hervorgerufen werden. Wird ein Waschautomat verwendet, so kann der Waschdruck zu stark sein. Wenn möglich, sollte entweder der Waschdruck verringert werden oder mit weniger Waschzyklen gewaschen werden.

$E_{\text{Negativ-Kontrolle}} \geq 0,30$

Wenn die Extinktion der Negativ-Kontrolle zu hoch ist, kann das eventuell an unterschiedlichen Inkubationszeiten von Negativ-Kontrolle und Kalibrator liegen. Werden sehr viele Proben aufgetragen, so ist auf ein zügiges Pipettieren zu achten, damit möglichst keine zu großen Zeitverzögerungen auftreten. Für die exakte Quantifizierung ist ein identisches Pipettierschema einzuhalten, damit die enzymatisch katalysierte Färbereaktion in allen "wells" nach identischer Zeit abgestoppt wird (Mehrkanalpipette, Reagenzientrog).



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

12 Test-Charakteristika

Analytische Spezifität

Der p53 Autoantikörper ELISA weist spezifisch die gegen p53 gerichteten IgG-Antikörper nach. Kreuzreaktionen mit anderen Antikörpern konnten nicht nachgewiesen werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 0,07 U/Test.

Linearität

Die Linearität des Tests wird durch Bestimmung der Extinktionswerte des Positivstandards für 5 Verdünnungen gemessen. Hierfür werden jeweils Doppelwerte bestimmt. Der p53 Autoantikörper ELISA ist in einem Bereich von 0-1 U/Test linear.

Reproduzierbarkeit

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit wurden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten einer Positiv-Kontrolle bestimmt.

Intra-Assay-Variation:

Für die Intra-Assay-Variation wurden 15 Bestimmungen durchgeführt. Der Intra-Assay Variationskoeffizient ist $< 10\%$.

Inter-Assay-Variation:

Für die Inter-Assay-Variation wurden 2 Test-Kits verwendet. Der Inter-Assay Variationskoeffizient ist $< 15\%$.

Cut-off

Die Bestimmung des oberen Grenzwertes des Normalbereiches (Cut-off) beruht auf der Häufigkeitsverteilung von p53 Autoantikörper in einem Kollektiv von 189 gesunden Blutspendern. Der Cut-off wurde als das Doppelte des Mittelwertes dieses Kollektives definiert. Proben sind definitionsgemäß negativ, falls ihr Antikörpertiter ≤ 120 U/ml



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

13 Literatur

1. M. LECHPAMMER, J. LUKAC S. LECHPAMMER D. KOVACEVIC M. LODA, Z. KUSIC
Humoral immune response to p53 correlates with clinical course in colorectal cancer patients during adjuvant chemotherapy
Int J Colorectal Dis **19**: 114–120 (2004)
2. M. SHAARAWY AND M. SHEIBA
Diagnostic and Prognostic Significance of Circulating Tumor Suppressor Gene p53 Autoantibodies in Patients with Gestational Trophoblastic Tumors
Acta Oncologica, **43**(1):43-48 (2004)
3. JIAN-YING ZHANG ET AL.
Enhancement of Antibody Detection in Cancer Using Panel of Recombinant Tumor-associated Antigens
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 12: 136-143 (2003)
4. GADDUCCI, A., FERDEGHINI, M., BUTTITA, F., FANUCCHI, A., ANNICCHIARICO, C., PRONTERA, C., BEVILACQUA, G., GENAZZANI, A.R.
Preoperative serum antibodies against the p53 protein in patients with ovarian and endometrial cancer
Anticancer Research **16**, 3519-3524 (1996)
5. ANGELOPOULOU, K., DIAMANDIS, E.P., SUTHERLAND, D.J.A., KELLEN, J.A., BUNTING, P.S.
Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers
Int. J. Cancer **58**, 480-487 (1994)
6. SHIN, D.M., KIM, J., RO, J.Y., HITTELMAN, J., ROTH, J.A., HONG, W.K., HITTELMAN, W.N.
Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis.
Cancer Res. **54**, 321-326 (1994)
7. HOUBIERS J.G.A., VAN DER BURG S.H., VAN DE WATERING L.M.G., TOLLENAR R.A.E.M., BRAND A., VAN DE VELDE C.J.H., MELIEF C.J.M.
Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer
Br J Cancer **72**: 637-641 (1995)
8. ANGELOPOULOU K, STRATIS M, DIAMANDIS EP
Humoral immune response against p53 protein in patients with colorectal carcinoma
Int. J. Cancer **70**: 46-51 (1997)
9. ANGELOPOULOU K, ROSEN B, STRATIS M, YU H, SOLOMOU M, DIAMANDIS EP
Circulating antibodies against p53 protein in patients with ovarian carcinoma. Correlation with clinopathologic features and survival
Cancer **78**: 2146-2152 (1996)
10. VOGL FD, FREY M, KREIENBERG R, RUNNEBAUM IB
Autoimmunity against p53 predicts invasive cancer with poor survival in patients with an ovarian mass
British J. Cancer, **83** 1338-1343 (2000)
11. ZALCMAN G, SCHLICHTHOLZ B, TREDANIEL J, URBAN T, LUBIN R, DUBOIS I ET AL
Monitoring of p53 autoantibodies in lung cancer during therapy: relationship to response to treatment.
Clin. Cancer Res., **4**: 1359-1366 (1998)



**STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE**

12. TAKEDA A, SHIMADA H, NAKAJIMA K, IMASEKI H, SUZUKI T, ASANO T, OCHIAI T, ISONO
Monitoring of p53 autoantibodies after resection of colorectal cancer: relationship to operative curability.
Eur J Surg., **167**: 50-53 (2001)
13. CASTELLI M, CIANFRIGLIA F, MANIERI A, PALMA L, PEZZUTO R, FALASCA G, DELPINO A
Anti p53 and anti heat shock proteins antibodies in patients with malignant or pre-malignant lesions of the oral cavity.
Anticancer Res, **21**: 753-758 (2001)
14. SITRUK V, VAYSSE J, CHEVRET S, GANNE-CARRIE N, CHRISTIDIS C, TRINCHET J, BEAUGRAND M
Prevalence and prognostic value of serum anti-p53 antibodies in hepatocellular carcinoma. A study of 159 patients.
Gastroenterol Clin Biol, **24**: 1159-1163 (2000)
15. ROHAYEM J, CONRAD K, ZIMMERMANN T, FRANK K-H
Comparison of the Diagnostic Accuracy of Three Commercially Available Enzyme Immunoassays for Anti-p53 Antibodies
Clin Chem, **45**: 2014-2016 (1999)
16. FLAMMANN HT, KUHN H-M,
p53 Autoantibodies and Cancer: Specificity, Diagnosis and Monitoring.
IN: CANCER AND AUTOIMMUNITY (EDS. SHOENFELD Y, GERSHWIN ME) ELSEVIER, AMSTERDAM.
PP. 181-191 (2000)
17. KUHN H, KROMMINGA A, FLAMMANN H, FREY M, LAYER P, ARNDT R
p53 autoantibodies in patients with autoimmune diseases: a quantitative approach
Autoimmunity, **31**: 229-235 (1999)



STEINBEIS-TRANSFERZENTRUM
FÜR ANGEWANDTE BIOLOGISCHE CHEMIE

14 Arbeitsanleitung (Kurzfassung)

Vorgang	Inkubation
<ul style="list-style-type: none">Herstellung der Waschlösung 50 ml Konzentrat + 950 ml dest. WasserHerstellung des Proben-Verdünnungspuffers Zugabe von 12 ml dest. Wasser pro FlascheVerdünnung der Serumproben 1 : 100 mit Proben-VerdünnungspufferHydratisierung der benötigten Streifen (Einpipettieren von 200 µl/"well" Waschlösung, 3 Minuten stehenlassen, dekantieren)Inkubation mit 100 µl/"well" Kalibratorverdünnungen, Neagativ-Kontrolle, verdünnte Positiv-Kontrolle sowie vorverdünnte Proben (Empfehlung: jeweils Doppelwertansätze)5 x Waschen mit 200 µl/"well" WaschlösungInkubation mit 100 µl/"well" Detektor-Antikörper5 x Waschen mit 200 µl/"well" WaschlösungInkubation mit 100 µl/"well" Substratlösung (!!! Im Dunkeln !!!)Zugabe von 50 µl/"well" StopplösungPhotometrische Messung bei 450 nm (empfohlene Referenz: 630 nm oder 750 nm)Gesamtdauer des Tests: ca. 3 Stunden	<p>60 Min., RT</p> <p>60 Min., RT</p> <p>30 Min., RT</p>