



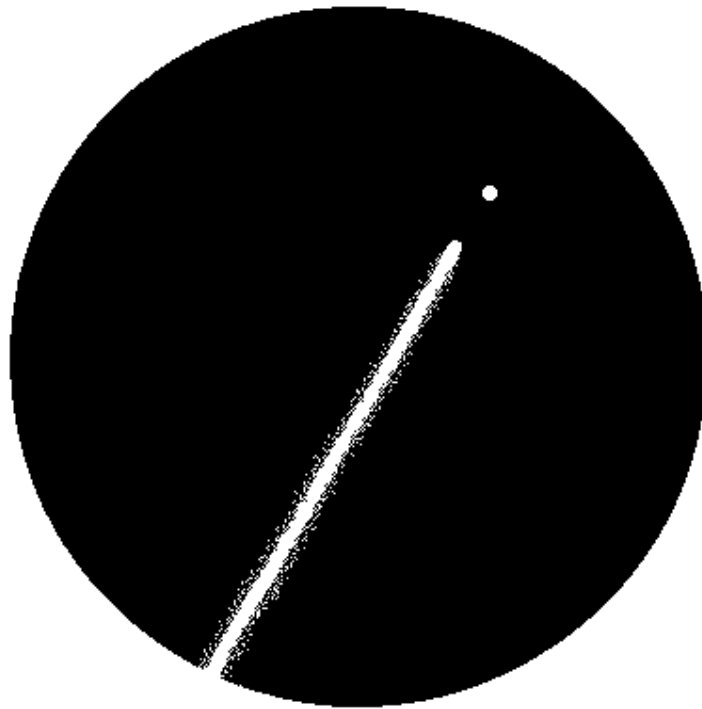
p53-Autoantikörper ELISA

2. Generation

Kat.-Nr. DIA 0302 E





Datenblatt





Version: 005-01.01.04



1 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	Bestimmung des Cut-off	9
10	Auswertung	9
10.1	Quantifizierung des Antikörpertiters	10
11	Trouble shooting	12
12	Testcharakteristika	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



1 Einleitung

Das p53-Tumorsuppressorgen ist von besonderem Interesse für die onkologische Diagnostik, da in ca. 60% aller Tumoren Mutationen in diesem Gen auftreten (1). Die häufigsten genetischen Aberrationen stellen dabei Punktmutationen dar (2,3). Diese Mutationen haben eine p53-Proteinakkumulation innerhalb der Zelle zur Folge. Mutationen im p53-Gen können sehr früh bei der Karzinogenese nachgewiesen werden.

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 (4-14) bei Krankheiten wie beispielsweise Darmtumoren, Ovarialtumoren, Mundhöhlenkarzinomen, Tumoren im Hals-Kopf-Bereich, Lungentumoren und Leberzellkarzinomen. Durchschnittlich entwickelt einer von vier Patienten mit solch einem diagnostizierten Karzinom p53 Autoantikörper. Der Nachweis von p53-Autoantikörpern gilt als spezifischer Malignitätsmarker und ist verbunden mit einer schlechteren Prognose (7). Häufig korrelieren p53-Autoantikörper mit einer kürzeren Überlebensrate und einem höheren Risiko für Rezidive. 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).

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.

Der p53-Autoantikörper-Status kann wertvolle Informationen über den Krankheitsverlauf einzelner Patienten liefern, denn p53-Autoantikörper wurden häufiger bei Patienten nachgewiesen, die nach einer Tumorbehandlung oder einer Tumorsektion ein Rezidiv entwickelten.

Veränderungen des p53 Autoantikörpertiters können mit dem Krankheitsverlauf der Tumorpatienten korrelieren. Bei 23% (53/229) der Patienten mit kolorektalem Karzinom wurden p53 Autoantikörper nachgewiesen. Der Antikörpertiter variierte hierbei zwischen 300 und 500.000 willkürlich gewählten Einheiten. In Verlaufsstudien zeigte sich, daß Konzentrationsänderungen der p53 Autoantikörper den Krankheitsverlauf widerspiegeln (8). Ähnlich zeigten 24% von Ovarialkarzinom-Patienten (41/174) Antikörpertiter, die zwischen einigen hundert und 1.000.000 Units variierten. Auch hier wurden Schwankungen des Antikörpertiters während des Krankheitsverlaufs beobachtet (9). In einer von Vogl et al. durchgeführten Studie (10) war der p53 Autoantikörper von hoher Spezifität bezüglich der

Malignität bei Patienten mit Ovarial-Karzinom. Hohe Antikörpertiter korrelierten mit einer schlechten Prognose.

Ein schnellen und spezifischen Abfall des p53 Autoantikörpertiters wurde von Zalzman und Mitarbeitern bei Lungenkrebspatienten beobachtet, die mittels Chemotherapie erfolgreich behandelt wurden (11). Ähnlich beschreiben Takeda und Kollegen eine signifikante Korrelation zwischen der erfolgreichen Tumor Resektion und dem postoperativen Verschwinden von p53 Autoantikörper bei Darmkrebspatienten (12).

Hauptindikation zur Bestimmung von p53 Autoantikörpern ist die Bestätigung klinischer Daten bezüglich eines Tumorverdachtes und zusätzliche Informationen zum Krankheitsverlauf des Tumorpatienten. Eine postoperative Abnahme des Antikörpertiters kann eine komplette Tumor-Resektion und erfolgreiche (nachfolgende) Chemotherapie anzeigen. In Fällen, in denen etablierte Tumormarker eine geringe Sensitivität besitzen (wie beispielsweise CEA in frühen Stadien maligner Darmtumoren), liefert der p53 Autoantikörper, der unabhängig von CEA ist, 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 ist zum Monitoring von Patienten geeignet, die unter einer Krankheit leiden, die sich zu einer Darmkrebserkrankung weiterentwickeln kann (wie z.B. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa).

Beim Einsatz von Sonographie-Techniken zur Früherkennung von Ovarialkarzinomen, die eine relativ hohe Sensitivität bei gleichzeitig niedriger Spezifität besitzen, kann der p53 Autoantikörper als Marker die diagnostische Spezifität verbessern (10).

Rohayem et al. verglichen die Fähigkeit dreier auf dem Markt befindlicher p53 Autoantikörper ELISA bezüglich ihrer diagnostischen Zuverlässigkeit. Die zuverlässigste Unterscheidung zwischen zwei Populationen (72 Tumorpatienten und 72 gesunden Blutspendern) gelang mit dem dianova ELISA wobei signifikante Unterschiede zu den beiden anderen Systemen beobachtet wurden (15).

Mit dem vorliegenden p53-Autoantikörper-ELISA von dianova GmbH kann auf eindeutige Art und Weise der p53-Autoantikörper-Status im Serum von Tumorpatienten bestimmt werden, außerdem erleichtert die quantitative Bestimmung des Serumtiters die Beurteilung von seropositiven Patienten im Follow-Up. Dies bietet völlig neue Möglichkeiten zur Untersuchung dieses Markers in Forschung und Klinik.

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-konjugiertes 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

Gebrauchsfertige Lösung (2 ml) von Humanserum mit geprüfter anti-p53-Autoantikörper-Konzentration.

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]

Detektor-Antikörper

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

Substratlösung

Gebrauchsfertige 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 (Konzentrat, 3 Flaschen à 15 ml). Gebrauchslösung: 15 ml Konzentrat + 285 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)

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
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).

Für eine quantitative Bestimmung des Antikörpertiters sollten die Anweisungen in 11.2 („Quantifizierung des Antikörpertiters“) befolgt werden.

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 15 ml Konzentrat mit 285 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); Kalibrator und Negativ-Kontrolle werden unverdünnt eingesetzt. Benötigt werden 100 µl/Einzelwert; 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 Leerwert (100µl Probenverdünnungspuffer) jeweils 100 µl pro 'Well' (der Kontrollen (**Kalibrator**, **Negativ-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 wiederholt.
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 von blau 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 620 nm oder 750 nm empfohlen). Mikrotiterplatte vor photometrischer Messung von unten abwischen und darauf achten, dass keine Luftblasen in den Vertiefungen vorhanden sind.

9 Bewertung der Einzelmeßwerte

Gemessen wird bei einer Wellenlänge von 450nm. **Die Extinktion (E_{450}) des Leerwertes wird von allen E_{450} Messwerten abgezogen.**

9.1 Vertrauensbereich der Kontrollen

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

	Kalibrator	Negativ-Kontrolle
E_{450}	> 0,7	< Cut-off

9.2 Bestimmung des Cut-off

100 μ l des unverdünnten Kalibrators dieses Lots enthalten eine p53 Autoantikörper Bindungsaktivität von 1 U. Der Cut-off berechnet sich durch Multiplizieren der Extinktion des unverdünnten Kalibrators mit dem **Faktor 0,15** (Cut-off = 0,15 U/Test und entspricht bei einer Verdünnung von 1:100 0,15 U/ μ l Patientenserum)

Wird beispielsweise für den Kalibrator eine Extinktion (E_{450}) von 1,00 gemessen, so errechnet sich der Cut-off folgendermaßen:

$$\text{Cut-off} = 1,00 \times 0,15 = 0,15.$$

10 Auswertung

Die Ergebnisse werden anhand des Cut-off ausgewertet.

Negative Proben: Alle Seren mit einer Extinktion kleiner oder gleich der des Cut-off sind negativ. (sieh auch 9.2 Bestimmung des Cut-off).

$$E_{450\text{Probe}} < E_{450\text{Kalibrator}} \times 0,15$$

Positive Proben: Alle Seren mit einer Extinktion größer der des Cut-off sind positiv. Dabei können durchaus Werte auftreten, die eine höhere Extinktion als der Kalibrator aufweisen. Diese Seren besitzen demnach einen Autoantikörpertiter > 1U/ μ l (siehe auch 10.1 Quantifizierung des Antikörpertiters).

$$E_{450\text{Probe}} > E_{450\text{Kalibrator}} \times 0,15$$

Kritischer Bereich: Oberhalb des Cut-off wird ein kritischer Bereich definiert ($E_{\text{cut-off}} + 20\%$). Beträgt der Cut-off beispielsweise (E_{450}) = 0,15, so liegt der kritische Bereich zwischen 0,15 und 0,18. Proben, die eine Extinktion innerhalb des kritischen Bereichs aufweisen, sollten noch einmal überprüft werden. Sollten diese nach erneuter Messung wieder im kritischen Bereich liegen, so ist eine Überprüfung des Patienten nach 5-8 Wochen zu empfehlen.

$$E_{450\text{Kalibrator}} \times 0,18 > E_{450\text{Probe}} > E_{450\text{Kalibrator}} \times 0,15$$

Bisherige Daten zeigen, daß alle Patienten, bei denen p53-Autoantikörper detektiert wurden, auch eine maligne Erkrankung aufwiesen.

10.1 Quantifizierung des Antikörpertiters

Die Bestimmung des Antikörpertiters erfolgt anhand einer Eichkurve, die mit dem mitgelieferten Standard (Kalibrator) für jeden Testlauf neu erstellt wird. Der Antikörpertiter wird in Units [U] angegeben.

1 Unit ist definiert als p53-Autoantikörper-Bindungsaktivität des mitgelieferten humanen Serumstandards (Kalibrator).

Für die exakte Quantifizierung ist ein identisches Pipettierschema einzuhalten, damit die enzymatisch katalysierte Färbereaktion in allen Wells nach identischer Zeit abgestoppt wird (Mehrkanalpipette, Reagenzientrog).

Eichkurve

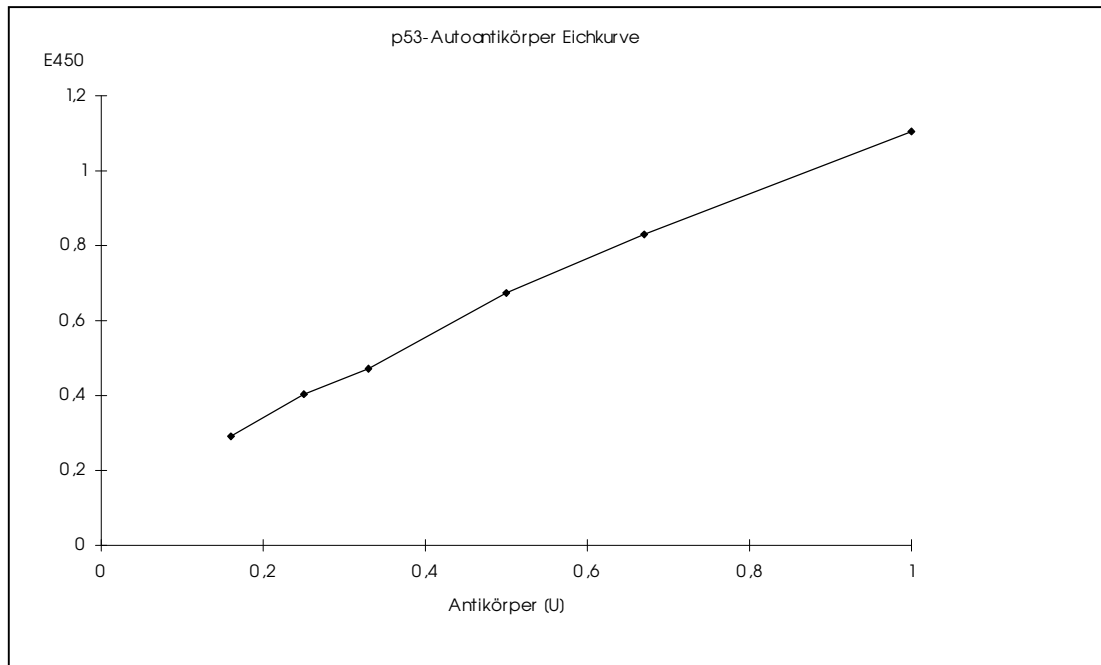
Aus dem Kalibrator wird mit Proben-Verdünnungspuffer eine Standardreihe angesetzt; empfohlen werden 4-6 Meßwerte. Die Extinktion (E_{450}) des unverdünnten Kalibrators entspricht genau einer Unit (1U).

Verdünnung Kalibrator	unverdünnt	1:1,5	1:2	1:3	1:4	1:6
Titer [U/Test]	1	0,67	0,5	0,33	0,25	0,16
Proben-Verdünnungspuffer (μ l)	-	33	50	67	75	84
Kalibrator (μ l)	100	67	50	33	25	16

Beispiel für die Erstellung einer Eichkurve

Standard	Verdünnung	Messwert E_{450}	Extinktion E_{450}	Titer [U]
Leerwert		0,03		
Kalibrator	unverdünnt	1,14	1,11	1
Kalibrator	1 : 1,5	0,86	0,83	0,67
Kalibrator	1 : 2	0,70	0,67	0,5
Kalibrator	1 : 3	0,50	0,47	0,33
Kalibrator	1 : 4	0,43	0,40	0,25
Kalibrator	1 : 6	0,32	0,29	0,16

Für die Eichkurve wird die Extinktion (E_{450}) gegen den Antikörpertiter [U] aufgetragen. Dabei sind lineare Skalen zu verwenden [lin-lin]. Die Auswertung kann mittels eines Auswertungsprogrammes erfolgen, das die einzelnen Punkte miteinander verbindet [point to point].



(diese Eichkurve nicht zur Auswertung benutzen)

Proben

Zur quantitativen Bestimmung werden die positiven Seren in Proben-Verdünnungspuffer so verdünnt, daß die Meßwerte innerhalb der Eichkurve liegen. 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.

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

$$\frac{\text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U/Test}]}{100 (\mu\text{l/Test})} = \text{Antikörpertiter}_{\text{Serum unverdünnt}} [\text{U}/\mu\text{l}]$$

Beispiel zur Auswertung

Cut-off = 0,15 U/μl

	E ₄₅₀ (Probe-Leerwert)	Antikörpertiter Eichkurve [U/Test]	Verdünnung	Antikörpertiter Serum [U/μl]
Kalibrator Cut-off	1,11 0,17			
Probe 1 Probe 2 Probe 3	0,06 0,29 1,11	* 0,167 1,0	1 : 100 1 : 100 1 : 100	* 0,17 1,00
Probe 4 Probe 4 Probe 4	2,48 1,17 0,74	* * 0,55	1 : 100 1 : 500 1 : 1000	* * 5,50

* außerhalb Eichkurve

11 Trouble shooting
Starker Hintergrund (E_{Kalibrator, unverdünnt} > 2,0)

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

Zu schwache Extinktion des Kalibrators (E_{Kalibrator, unverdünnt} < 0,7)

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_{Negativ-Kontrolle} ≥ E_{Cut-off}

Wenn die Negativ-Kontrolle eine gleiche oder höhere Extinktion als der Cut-off aufweist, 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. Sollte z.B. die Negativ-Kontrolle in Reihe 1 und der Kalibrator erst in Reihe 12 aufgetragen werden, so könnten unterschiedliche Inkubationszeiten auftreten. Es empfiehlt sich bei der Messung vieler Proben, den Kalibrator und die Negativ-Kontrolle nicht nur zu Anfang, sondern auch in der Mitte oder/und am Ende der Platte nochmals aufzutragen, um diese Verzögerung zu erfassen.

12 Test-Charakteristika

Kalibrierung

Die Kalibrierung wurde in relativen Einheiten vorgenommen. Der Antikörpertiter des unverdünnten Kalibrators entspricht genau einer Unit (1U).

Bei jedem Ansatz müssen die Extinktion der Kontrollen im Vertrauensbereich liegen (siehe 9.1 Vertrauensbereich der Kontrollen).

Nachweisempfindlichkeit

Die untere Nachweisgrenze ist definiert als der Wert der dreifachen Standardabweichung einer analytfreien Probe. Sie gibt den geringsten eindeutig erfaßbaren Antikörpertiter an. Die untere Nachweisgrenze des Diagnostikums p53 Autoantikörper ELISA liegt bei ca. 0,02 U/Test.

Analytische Spezifität

Der p53 Autoantikörper ELISA weist spezifisch die gegen p53 gerichteten IgG-Antikörper nach. Kreuzreaktionen mit anderen Antikörpern konnten nicht nachgewiesen werden.

Linearität

Die Linearität des Tests wird durch Bestimmung der Extinktionswerte des Positivstandards für 6 Verdünnungen (unverdünnt, 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6) gemessen. Hierfür werden jeweils Doppelwerte bestimmt. Der p53 Autoantikörper ELISA ist in einem Bereich von 0,2-1 U/Test linear.

Reproduzierbarkeit

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit werden die Intra- und Inter-Assay-Variationskoeffizienten der Referenzprobe 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 Bestimmungen durchgeführt. Der Inter-Assay Variationskoeffizient ist < 15%.

Normalbereich

Die Bestimmung des oberen Grenzwertes des Normalbereiches (Cut-off) beruht auf der Häufigkeitsverteilung von p53 Autoantikörper in einem Kollektiv von 400 gesunden Blutspendern. Der Cut-off wurde als das Doppelte des Mittelwertes dieses Kollektives definiert. In diesem Kollektiv wurde ein Serum positiv gemessen (0,25%).

13 Literatur

1. HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C.
p53 mutations in human cancers
SCIENCE **253**, 49-53 (1991)
2. BURKART C.
Das Tumorsuppressorprotein p53
Deutsches Ärzteblatt **91**: 679-684 (1994)
3. SOUSSI T.
The humoral immune response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: implications for diagnosis and therapie
Immunology Today **17** (8): 354-356 (1996)
4. GADDUCCI, A., FERDEGHINI, M., BUTTITTA, 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 supressor 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)
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)

14 Arbeitsanleitung (Kurzfassung)

Vorgang	Inkubation
<ul style="list-style-type: none"> • Herstellung der Waschlösung 15 ml Konzentrat + 285 ml dest. Wasser • Herstellung des Proben-Verdünnungspuffers Zugabe von 12 ml dest. Wasser pro Flasche • Verdünnung der Serumproben 1 : 100 mit Proben-Verdünnungspuffer • Hydratisierung der benötigten Streifen (Einpipettieren von 200 µl/Well' Waschlösung, 3 Minuten stehenlassen, dekantieren) • Inkubation mit 100 µl/Well' Kalibrator, Neagativ-Kontrolle, bzw. vorverdünnte Proben (Empfehlung: jeweils Doppelwertansätze) • 5 x Waschen mit 200 µl/Well' Waschlösung • Inkubation mit 100 µl/Well' Detektor-Antikörper • 5 x Waschen mit 200 µl/Well' Waschlösung • Inkubation mit 100 µl/Well' Substratlösung (!!! Im Dunkeln !!!) • Zugabe von 50 µl/Well' Stopplösung • Photometrische Messung bei 450 nm (empfohlene Referenz: 620 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>