



# CYFRA 21-1 EIA

REF

**211-10**

Instructions d'utilisation  
2009-06

Trousse de dosage immunoenzymatique  
Pour 96 tests

## USAGE PRÉVU

La trousse de dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est conçue pour la détermination quantitative de fragments solubles de cytokératine 19 dans le sérum humain.

## RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU DOSAGE

La cytokératine 19 fait partie d'une famille d'au moins vingt polypeptides différents de cytokératine. Les cytokératines forment la structure filamenteuse intermédiaire des cellules épithéliales (1, 2). Les filaments de cytokératine sont peu solubles mais, suite à la dégradation protéolytique, des fragments solubles de cytokératine se forment et se dégagent dans les liquides organiques.

CYFRA 21-1 est un dosage immunoenzymatique déterminant le taux de fragments de cytokératine 19 dans le sérum (3-6). Le dosage CYFRA 21-1 est réalisé à partir de deux anticorps monoclonaux (BM 19.21 et KS 19.1) spécifiques à la cytokératine 19 (3, 7-8). Des taux élevés de fragments de cytokératine 19 apparaissent dans le sérum de patients souffrant d'un cancer du poumon (5, 9-12), mais aussi dans d'autres cancers, notamment celui de la vessie (13). La principale indication du dosage CYFRA 21-1 est la surveillance de l'évolution du cancer pulmonaire à non petites cellules (NSCLC), (11).

## PRINCIPE DU TEST

Le CYFRA 21-1 est un dosage immunoenzymatique non compétitif en phase solide à base de deux anticorps monoclonaux (issus de la souris) dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts de fragments solubles de cytokératine 19 (7-8). Les étalons, les contrôles et les échantillons de patients sont incubés avec un anticorps monoclonal (MAB) anti-CYFRA 21-1 biotinylé et de la peroxydase de raifort (PR) marquée au MAB anti-CYFRA 21-1 dans des micropuits enduits de streptavidine. Après lavage, le réactif chromogène/substrat tamponné (peroxyde d'hydrogène et 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine) est ajouté

dans chaque puits jusqu'à ce que la réaction enzymatique se produise. Une couleur bleue se développe pendant la réaction enzymatique si l'antigène est présent. L'intensité de la couleur produite est proportionnelle à la quantité de CYFRA 21-1 présente dans les échantillons. L'intensité de la couleur est déterminée dans un spectrophotomètre pour microplaques à 620 nm (ou, alternativement, à 405 nm après ajout de solution d'arrêt).

Des courbes d'étalonnage sont créées pour chaque dosage en reportant la valeur d'absorbance en regard de la concentration de chaque étalon. Les concentrations de CYFRA 21-1 des échantillons sont alors lues sur la courbe d'étalonnage.

## RÉACTIFS

- Chaque trousse de dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 contient suffisamment de réactifs pour 96 tests.
- La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure de l'emballage.
- Ne pas utiliser la trousse après cette date.
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Conserver la trousse entre 2 et 8 °C. Ne pas la congeler.
- Les réactifs ouverts sont stables selon le tableau ci-dessous, à condition qu'ils ne soient pas contaminés, qu'ils soient stockés dans des conteneurs étanches d'origine et manipulés selon les instructions. Les replacer entre 2 et 8 °C immédiatement après usage.

Composant	Quantité	Stockage et stabilité après premier emploi
-----------	----------	--

### MICROPLA

<b>Microplaque de streptavidine</b>	1 plaque	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la plaque
-------------------------------------	----------	---

12 x 8 puits séparables enduits de streptavidine. Après ouverture, replacer immédiatement les barrettes inutilisées dans le sachet en aluminium contenant le dessiccateur. Refermer hermétiquement avec soin pour les garder au sec.

<b>CAL</b>	<b>CYFRA 21-1</b>	<b>A</b>
------------	-------------------	----------

<b>Étalon CYFRA 21-1 A</b>	1 x 8 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon
----------------------------	----------	---

Solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'albumine de sérum bovin, un colorant jaune inerte et un conservateur antimicrobien non-azide. Prêt à l'emploi. Sert également à la dilution des échantillons.

Composant	Quantité	Stockage et stabilité après premier emploi			
<b>Étalons CYFRA 21-1 B-F</b>	5 flacons, lyophilisés	Stabilité après reconstitution 4 semaines à 2 - 8 °C 4 mois à -20 °C ou moins			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>B</td></tr></table>	CAL	CYFRA 21-1	B	1 x 1 mL	
CAL	CYFRA 21-1	B			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>C</td></tr></table>	CAL	CYFRA 21-1	C	1 x 1 mL	
CAL	CYFRA 21-1	C			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>D</td></tr></table>	CAL	CYFRA 21-1	D	1 x 1 mL	
CAL	CYFRA 21-1	D			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>E</td></tr></table>	CAL	CYFRA 21-1	E	1 x 1 mL	
CAL	CYFRA 21-1	E			
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>F</td></tr></table>	CAL	CYFRA 21-1	F	1 x 1 mL	
CAL	CYFRA 21-1	F			

Les étalons lyophilisés contiennent un antigène CYFRA 21-1 dans une solution saline tamponnée au phosphate avec de l'albumine de sérum bovin, un colorant jaune inerte et un conservateur antimicrobien non-azide. À reconstituer avec de l'eau distillée ou déionisée avant usage. **REMARQUE** : La concentration exacte de CYFRA 21-1, propre à chaque lot, est indiquée sur l'étiquette des flacons.

<b>Contrôles CYFRA</b>	2 flacons, lyophilisés	Stabilité après reconstitution 1 semaine à 2 - 8 °C 4 mois à -20 °C ou moins			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>1</td></tr></table>	CONTROL	CYFRA 21-1	1	1 x 1 mL	
CONTROL	CYFRA 21-1	1			
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>CYFRA 21-1</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	CYFRA 21-1	2	1 x 1 mL	
CONTROL	CYFRA 21-1	2			

Les contrôles lyophilisés contiennent un antigène CYFRA 21-1 dans une matrice de sérum humain et un conservateur antimicrobien non-azide. À reconstituer avec de l'eau distillée ou déionisée avant usage.

Composant	Quantité	Stockage et stabilité après premier emploi
-----------	----------	--

<b>BIOTIN</b>	<b>Anti-CYFRA 21-1</b>
---------------	------------------------

<b>Biotine anti-CYFRA 21-1</b>	1 x 15 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon
--------------------------------	-----------	---

Anticorps monoclonal anti-CYFRA 21-1 de souris avec biotine, environ 1,25 µg/mL. Contient une solution saline tamponnée au Tris-HCl (pH 7,2), de l'albumine de sérum bovin, des agents bloquants, un détergent, un colorant bleu inerte et un conservateur antimicrobien non-azide. À mélanger avec le traceur avant usage.

<b>CONJ</b>	<b>Anti-CYFRA 21-1</b>
-------------	------------------------

<b>Traceur, HRP anti-CYFRA 21-1</b>	1 x 0,75 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon
-------------------------------------	-------------	---

Solution mère d'anticorps monoclonal de souris anti-CYFRA 21-1 avec HRP, environ 42 µg/mL. Contient des conservateurs antimicrobiens non-azides. À mélanger avec de la biotine anti-CYFRA 21-1 avant usage.

<b>SUBS</b>	<b>TMB</b>
-------------	------------

<b>Substrat HRP TMB</b>	1 x 12 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon
-------------------------	-----------	---

Contient du peroxyde d'hydrogène tamponné et de la 3, 3', 5, 5' tétraméthylbenzidine (TMB). Prêt à l'emploi.

<b>STOP</b>
-------------

<b>Solution d'arrêt</b>	1 x 15 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon
-------------------------	-----------	---

Contient 0,12 M d'acide chlorhydrique. Prêt à l'emploi.

Composant	Quantité	Stockage et stabilité après premier emploi
-----------	----------	--

WASHBUF	25X
---------	-----

<b>Concentré de lavage</b>	1 x 50 mL	2 à 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur la bouteille
----------------------------	-----------	--

Une solution saline tamponnée au tris-HCl avec Tween 20. Contient du Germall II comme conservateur. À diluer avec de l'eau distillée ou déionisée 25 fois avant usage.

### Indications d'instabilité

Le substrat TMB HRP doit être incolore, voire légèrement bleuté. Une couleur bleue indique que le réactif a été contaminé et doit être mis au rebut.

### AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour utilisation diagnostique *in vitro* :

- Respecter les instructions de la notice. La fiabilité des résultats du dosage ne peut pas être garantie en cas d'écarts par rapport aux instructions contenues dans la notice.
- Voir la publication du U.S. Department of Health and Human Services (Bethesda, Md., USA) n° (CDC) 88-8395 relative aux procédures de sécurité en laboratoire ou tout autre règlement local ou national.
- Manipuler tous les échantillons de sérum comme présentant un risque infectieux.
- Éviter tout contact avec les réactifs contenant du peroxyde d'hydrogène ou de l'acide chlorhydrique. En cas de contact avec l'un de ces réactifs, laver abondamment à l'eau.
- Respecter les réglementations locales relatives à la mise au rebut de tous les déchets.

### Attention

Chaque unité de donneur utilisée dans la préparation du réactif d'origine humaine a été testée et s'est avérée non réactive aux anticorps anti-VIH-1 et 2, aux anticorps anti-VHC et à l'antigène de surface anti-hépatite B (HBsAg). Aucune méthode ne pouvant exclure totalement la présence de maladies véhiculées par le sang, la manipulation et la mise au rebut des réactifs d'origine humaine de ce produit doivent tenir compte du risque infectieux.

## PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

Le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est conçu pour un usage avec du sérum. Prélever le sang par ponction veineuse et séparer le sérum conformément aux procédures ordinaires. Les échantillons peuvent être stockés entre 2 et 8 °C pendant 1 jour. Pour des périodes plus longues, stocker les échantillons à -40 °C ou moins. Éviter le cycle répété de congélation et décongélation des échantillons. En cas d'aliquotes, choisir un tube de taille appropriée (limiter l'espace vide dans le tube). Ramener les échantillons congelés à température ambiante et mélanger doucement avant analyse.

**Remarque:** L'agitation des échantillons au moyen de mélangeurs à cylindres doit être limitée à 1 minute maximum à une vitesse maximale de 16 tr/min. L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum. Les échantillons qui contiennent des particules grossières doivent être centrifugés à 10 000 x g pendant 10 minutes avant l'emploi pour éliminer les particules pouvant avoir été générées par la décongélation.

## PROCÉDURE

### Matériel requis non fourni

#### 1. Agitateur de microplaques

L'agitation doit être de moyenne à vigoureuse, environ 900 à 1 100 oscillations/min.

#### 2. Dispositif de lavage de microplaques

Laveur de microplaques automatique en mesure de réaliser 1 et 6 cycles de lavage et doté d'un volume de remplissage minimum de 350 µL/puits/cycle de lavage.

Le laveur manuel de barrettes Nunc Immuno-8 est recommandé si un laveur de microplaques automatique n'est pas utilisé.

#### 3. Spectrophotomètre pour microplaques

Avec une longueur d'onde de 620 nm ou 405 nm et une plage d'absorbance de 0 à 3,0.

#### 4. Pipettes de précision

Avec embouts plastiques jetables pour la distribution de volumes en microlitres. Une pipette à 8 canaux ou un distributeur avec embouts plastiques jetables pour la distribution de 100 µL sont recommandés mais non obligatoires. Pipettes pour la distribution de volumes en millilitres.

#### 5. Eau distillée ou déionisée

Pour la reconstitution d'étalons et de contrôles CYFRA 21-1 et pour la préparation de solution de lavage diluée.

## Remarques sur la procédure

1. Une compréhension approfondie de cette notice est nécessaire pour garantir le bon usage de la trousse immunoenzymatique CYFRA 21-1. Les réactifs fournis avec la trousse sont conçus pour être utilisés comme un tout. Ne pas mélanger des réactifs identiques provenant de trousses dont les numéros de lot sont différents. Ne pas utiliser les réactifs de la trousse après la date de péremption imprimée à l'extérieur de l'emballage.
2. Les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20 à 25 °C) avant emploi. Les échantillons congelés doivent être mélangés soigneusement mais en douceur après la décongélation. *L'agitation des échantillons au moyen d'agitateurs à cylindres doit être limitée à 1 minute maximum à une vitesse maximale de 16 tr/min. L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum. En cas d'aliquotes, choisir un tube de taille appropriée (limiter l'espace vide dans le tube).*
3. Avant de commencer à pipeter les étalons et les échantillons inconnus, il est conseillé de marquer les barrettes afin de pouvoir clairement identifier les échantillons pendant et après le dosage.
4. Le lavage efficace et complet assurant la séparation de l'antigène lié et non lié, ainsi que les réactifs des complexes anticorps-antigène liés en phase solide est l'une des étapes les plus importantes d'un dosage immunoenzymatique. Pour garantir un lavage efficace, s'assurer que tous les puits sont complètement remplis de solution de lavage pendant chaque cycle de lavage, que la solution de lavage est distribuée à un débit approprié, que l'aspiration des puits entre et après les cycles de lavage est complète et que les puits sont vides. Si du liquide reste, renverser la plaque et tapoter doucement contre du papier absorbant.
  - Laveur de barrettes automatique: observer soigneusement les instructions du fabricant relatives au lavage et à l'entretien et appliquer le nombre de cycles de lavage requis avant et après chaque étape d'incubation. Il est vivement recommandé d'utiliser le mode de traitement *barrette* et le mode de lavage *trop-plein* avec un volume de distribution de 800 µL. Le dispositif d'aspiration/lavage ne doit pas être laissé avec de la solution de lavage pendant de longues périodes car les aiguilles risquent de s'encrasser, entraînant une mauvaise distribution du liquide et une mauvaise aspiration.
5. Le substrat TMB HRP est très sensible à la contamination. Pour une stabilité optimale du substrat TMB HRP, verser la quantité requise du flacon dans un réservoir soigneusement nettoyé ou, de préférence, un plateau plastique jetable pour éviter toute contamination du réactif. Veiller à utiliser des embouts de pipette en plastique jetables propres (ou un embout de pipette de distribution).
6. Veiller à utiliser des embouts de pipette en plastique jetables propres et employer une technique de pipetage précise appropriée pendant la manipulation des échantillons et des réactifs. Prendre garde à ce que l'embout de la pipette ne touche pas la surface du liquide pour éviter toute contamination par transfert. Une technique de pipetage soignée est particulièrement importante pour la manipulation des échantillons et de la solution de substrat TMB HRB.

---

**Préparation des réactifs****Stabilité du réactif préparé**

---

**Étalons CYFRA 21-1**

4 semaines à 2 - 8 °C  
4 mois à -20 °C ou moins

Ajouter exactement 1,0 mL d'eau distillée dans chaque flacon. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes pour reconstituer et mélanger en douceur avant emploi.

**REMARQUE:** La concentration des étalons est indiquée sur les étiquettes et doit être utilisée pour le calcul des résultats. *L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum.*

---

**Contrôles CYFRA 21-1**

1 semaine à 2 - 8 °C  
4 mois à -20 °C ou moins

Ajouter exactement 1,0 mL d'eau distillée dans chaque flacon. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes pour reconstituer et mélanger en douceur avant emploi.

**REMARQUE:** Les plages des contrôles sont indiquées sur les étiquettes. *L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum.*

---

**Solution de lavage**

2 semaines entre 2 et 25 °C  
dans un conteneur hermétique

Verser 50 mL de concentré de lavage dans un conteneur propre et diluer 25 fois en ajoutant 1 200 mL d'eau distillée ou déionisée pour obtenir une solution de lavage tamponnée.

---

**Préparation des réactifs****Stabilité du réactif préparé****Solution d'anticorps**

1 jour à 2–8 °C

Préparer la quantité requise de solution d'anticorps en mélangeant 50 µL de traceur HRP anti-CYFRA 21-1 avec 1 mL de biotine anti-CYFRA 21-1 pour chaque barrette (voir tableau ci-dessous):

Nombre de barrettes	Traceur, HRP anti-CYFRA 21-1 (µL)	Biotine anti-CYFRA 21-1 (mL)
1	50	1
2	100	2
3	150	3
4	200	4
5	250	5
6	300	6
7	350	7
8	400	8
9	450	9
10	500	10
11	550	11
12	600	12

Veiller à utiliser un tube en verre ou plastique propre pour préparer la solution d'anticorps.

**PROCÉDURE DE DOSAGE**

Réaliser chaque test en double pour les étalons, les contrôles et les échantillons inconnus. Une courbe d'étalonnage doit être réalisée pour chaque dosage. Tous les réactifs et échantillons doivent se trouver à température ambiante (20 à 25 °C) avant usage.

1. Commencer à préparer les étalons CYFRA 21-1, les contrôles 1 & 2, la solution de lavage et la solution d'anticorps. La propreté des conteneurs est essentielle. Suivre les instructions soigneusement.
2. Transférer le nombre requis de barrettes de microplaques sur un cadre de barrettes (remettre immédiatement les autres barrettes dans la poche d'aluminium contenant un dessiccateur et refermer soigneusement). Laver chaque barrette une fois avec la solution de lavage. Ne pas laver plus de barrettes qu'il n'est possible d'en manipuler en 30 min.
3. L'agitation des échantillons au moyen d'agitateurs à cylindres doit être limitée à 1 minute maximum à une vitesse maximale de 16 tr/min. L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum. Pipeter 50 µL d'étalons CYFRA 21-1 (CAL A, B, C, D, E et F), de contrôles 1 & 2 et d'échantillons inconnus (Inc) dans les puits de barrettes selon le schéma suivant:

	1	2	3	4	5	6	7 etc.
A	Cal A	Cal E	1er Inc				
B	Cal A	Cal E	1er Inc				
C	Cal B	Cal F	2ème Inc				
D	Cal B	Cal F	2ème Inc				
E	Cal C	C1					
F	Cal C	C1					
G	Cal D	C2					
H	Cal D	C2					

- Ajouter 100 µL de solution d'anticorps à chaque puits au moyen d'une pipette de précision 8 à canaux de 100 µL (ou une pipette de précision de 100 µL). Prendre garde à ce que l'embout de la pipette ne touche pas la surface du liquide pour éviter toute contamination par transfert.
- Incuber la plaque pendant 1 heure ( $\pm$  5 min) à température ambiante (20-25 °C) en l'agitant constamment avec un agitateur de microplaques.
- Après incubation, aspirer et laver chaque barrette 6 fois.
- Ajouter 100 µL de substrat TMB HRP à chaque puits en utilisant la même procédure qu'à l'étape 4. Le substrat TMB HRP doit être ajouté aux puits aussi rapidement que possible et le temps entre l'ajout au premier et au dernier puits ne doit pas dépasser 5 min.
- Incuber pendant 30 min ( $\pm$  5 min) à température ambiante en agitant constamment. Éviter l'exposition à la lumière directe du soleil.
- Lire immédiatement l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre pour microplaques.

### Option

Si le laboratoire ne dispose pas d'un spectrophotomètre pour microplaques équipé d'un filtre à 620 nm, l'absorbance peut être déterminée en remplaçant l'étape 9 ci-dessus par la suivante :

- Alt. 9. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt, agiter et lire l'absorbance à 405 nm dans un spectrophotomètre pour microplaques dans les 15 min suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

## Plage de mesures

Le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 mesure les concentrations comprises entre 0,5 et environ 50 ng/mL. Si des concentrations de CYFRA 21-1 supérieures à la plage de mesures sont prévisibles, il est recommandé de diluer les échantillons avec l'étalon CYFRA 21-1 A avant l'analyse (voir « Calcul des résultats avec des échantillons dilués »).

## Contrôle de la qualité

Les contrôles CYFRA 21-1 1 et 2 servent à valider chaque série de dosages. Les plages de résultats attendus sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

Les résultats du dosage CYFRA 21-1 sont considérés comme valides si :

- les valeurs moyennes des doublons de contrôle sont dans la plage spécifiée.
- les répliques des étalons B à F et des contrôles n'excèdent pas un CV de 15 %.
- les répliques de l'étalon A (étalon zéro) n'ont pas plus de 0,06 unités DO de différence entre elles.

Si un dosage produit des résultats non valides pour un étalon ou un contrôle, contrôler tous les réactifs, la précision des pipettes, les performances du lecteur et du laveur de microplaques et recommencer l'analyse. Chaque laboratoire peut également préparer ses propres pools de sérum à différents taux et les utiliser comme contrôles internes afin de garantir la précision du dosage.

## Documentation de référence

Aucune documentation de référence commune n'étant disponible pour l'antigène CYFRA 21-1, les valeurs d'étalonnage du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 sont attribuées en fonction d'un ensemble de normes de référence internes.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Si un spectrophotomètre pour microplaques avec programme de calcul de données intégré est utilisé, se reporter au manuel correspondant pour créer un programme utilisant la concentration indiquée sur l'étiquette de chaque étalon CYFRA 21-1.

Pour le calcul automatique des résultats de CYFRA 21-1, il est recommandé d'utiliser l'une des méthodes suivantes:

- méthode d'ajustement de spline cubique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.
- interpolation avec évaluation point par point. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.
- méthode d'ajustement de courbe quadratique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.

# Fiche de protocole

**CYFRA 21-1 EIA** RÉF **211-10**

Préparer les composants juste avant emploi. Utiliser les conditions d'incubation et de lavage conformément aux instructions.

Étape	Flacon / plaque	Procédure																														
1. Préparer les étalons CYFRA 21-1	CAL   CYFRA 21-1 B, C, D, E, F	Ajouter 1 mL d'eau distillée ou déionisée dans chaque flacon. Laisser reposer pendant au moins 15 minutes, puis agiter doucement. <b>REMARQUE :</b> La concentration exacte de chaque étalon est indiquée sur l'étiquette. L'agitation d'étalons/contrôles au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum.																														
	CONTROL   CYFRA 21-1 1, 2																															
Préparer la solution de lavage	WASHBUF   25X	Diluer 50 mL de concentré de lavage avec 1 200 mL d'eau distillée ou déionisée.																														
Préparer la solution d'anticorps	CONJ   Anti-CYFRA 21-1	Mélanger 50 µL de traceur HRP anti-CYFRA 21-1 avec 1mL de biotine anti-CYFRA 21-1 par barrette :																														
	BIOTIN Anti-CYFRA 21-1																															
		<table border="1"><thead><tr><th>Nb. de Barrettes</th><th>Traceur HRP anti-CYFRA 21-1 (µL)</th><th>Biotine anti-CYFRA 21-1 (mL)</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>50</td><td>1</td></tr><tr><td>2</td><td>100</td><td>2</td></tr><tr><td>3</td><td>150</td><td>3</td></tr><tr><td>4</td><td>200</td><td>4</td></tr><tr><td>5</td><td>250</td><td>5</td></tr><tr><td>6</td><td>300</td><td>6</td></tr><tr><td>7</td><td>350</td><td>7</td></tr><tr><td>8</td><td>400</td><td>8</td></tr><tr><td>9</td><td>450</td><td>9</td></tr></tbody></table>	Nb. de Barrettes	Traceur HRP anti-CYFRA 21-1 (µL)	Biotine anti-CYFRA 21-1 (mL)	1	50	1	2	100	2	3	150	3	4	200	4	5	250	5	6	300	6	7	350	7	8	400	8	9	450	9
Nb. de Barrettes	Traceur HRP anti-CYFRA 21-1 (µL)	Biotine anti-CYFRA 21-1 (mL)																														
1	50	1																														
2	100	2																														
3	150	3																														
4	200	4																														
5	250	5																														
6	300	6																														
7	350	7																														
8	400	8																														
9	450	9																														

10	500	10
11	550	11
12	600	12

2.	Laver	<b>MICROPLA</b>	Laver chaque puits une fois avec la solution de lavage. Utiliser un laveur automatique ou manuel.
3.	Ajouter les étalons, les contrôles et les échantillons	<b>CAL CYFRA 21-1</b> A, B, C, D, E, F <b>CONTROL CYFRA 21-1</b> 1, 2	50 µL dans chaque puits. L'agitation des échantillons au moyen de mélangeurs à cylindres doit être limitée à 1 minute maximum à une vitesse maximale de 16 tr/min. L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum.
4.	Ajouter la solution d'anticorps	<b>SOLUTION D'ANTICORPS</b>	100 µL dans chaque puits
5.	Incuber	<b>MICROPLA</b>	1 heure d'agitation à 20-25 °C
6.	Laver	<b>MICROPLA</b>	Laver chaque puits six fois avec la solution de lavage Utiliser un laveur automatique ou manuel.
7.	Ajouter le substrat TMB HRP	<b>SUBS TMB</b>	100 µL dans chaque puits
8.	Incuber	<b>MICROPLA</b>	30 min d'agitation à 20-25 °C
9.	Lire l'absorbance	<b>MICROPLA</b>	620 nm
Alt.9	Ajouter la solution d'arrêt	<b>STOP</b>	100 µL dans chaque puits
Alt.10	Agiter	<b>MICROPLA</b>	Laisser mélanger à 20-25 °C
Alt.11	Lire l'absorbance	<b>MICROPLA</b>	Lire à 405 nm dans les 15 min

## Plage de mesures

Le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 mesure les concentrations comprises entre 0,5 et environ 50 ng/mL. Si des concentrations de CYFRA 21-1 supérieures à la plage de mesures sont prévisibles, il est recommandé de diluer les échantillons avec l'étalon CYFRA 21-1 A avant l'analyse (voir « Calcul des résultats avec des échantillons dilués »).

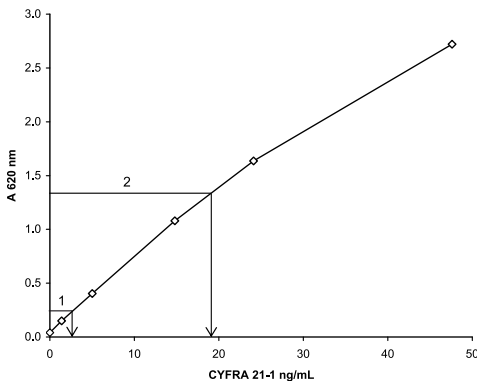
## Contrôle de la qualité

Les contrôles CYFRA 21-1 1 et 2 servent à valider chaque série de dosages. Les plages de résultats attendus sont indiquées sur les étiquettes des flacons.

Les résultats du dosage CYFRA 21-1 sont considérés comme valides si :

- les valeurs moyennes des doublons de contrôle sont dans la plage spécifiée.
- les répliques des étalons B à F et des contrôles n'excèdent pas un CV de 15 %.
- les répliques de l'étalon A (étalon zéro) n'ont pas plus de 0,06 unités DO de différence entre elles.

Si un dosage produit des résultats non valides pour un étalon ou un contrôle, contrôler tous les réactifs, la précision des pipettes, les performances du lecteur et du laveur de microplaques et recommencer l'analyse. Chaque laboratoire peut également préparer ses propres pools de sérum à différents taux et les utiliser comme contrôles internes afin de garantir la précision du dosage.



*Exemple, ne pas utiliser cette courbe pour déterminer les résultats du dosage.*

*La concentration exacte en CYFRA 21-1 est indiquée sur l'étiquette de chaque flacon d'étalon.*

## Documentation de référence

Aucune documentation de référence commune n'étant disponible pour l'antigène CYFRA 21-1, les valeurs d'étalonnage du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 sont attribuées en fonction d'un ensemble de normes de référence internes.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Si un spectrophotomètre pour microplaques avec programme de calcul de données intégré est utilisé, se reporter au manuel correspondant pour créer un programme utilisant la concentration indiquée sur l'étiquette de chaque étalon CYFRA 21-1.

Pour le calcul automatique des résultats de CYFRA 21-1, il est recommandé d'utiliser l'une des méthodes suivantes :

- méthode d'ajustement de spline cubique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.
- interpolation avec évaluation point par point. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.
- méthode d'ajustement de courbe quadratique. L'étalon A doit être inclus dans la courbe avec la valeur 0 ng/mL.

**REMARQUE :** Ne pas employer les méthodes d'évaluation à 4 paramètres ou à régression linéaire. Pour l'évaluation manuelle, une courbe d'étalonnage est créée en traçant les valeurs d'absorbance (A) obtenues pour chaque étalon CYFRA 21-1 par rapport à la concentration de CYFRA 21-1 correspondante (en ng/mL). Les concentrations de CYFRA 21-1 inconnues peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage d'après la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon de patient.

## Exemple de résultats

Échantillon	Valeur des étalons (ng/mL)	Valeur d'abs. moyenne (A)	CYFRA 21-1 ng/mL
Étalon A	0	0,041	
Étalon B	1,4	0,151	
Étalon C	5,0	0,405	
Étalon D	14,8	1,080	
Étalon E	24,1	1,635	
Étalon F	47,6	2,721	
Échantillon 1		0,259	2,9
Échantillon 2		1,366	19,4

## Calcul des résultats avec des échantillons dilués

Les échantillons dont les concentrations en CYFRA 21-1 dépassent la plage de mesures peuvent être dilués avec l'étalon CYFRA 21-1 A. La dilution recommandée est de 1/2.

- Dilution 1/2 = 100 µL d'échantillon + 100 µL d'étalon CYFRA 21-1 A
- La concentration en CYFRA 21-1 de l'échantillon dilué est alors calculée ainsi :
- Dilution 1/2 : 2 x valeur mesurée

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

Les patients souffrant d'un cancer confirmé peuvent présenter des valeurs de CYFRA 21-1 de l'ordre des autres patients en bonne santé. Des taux élevés de CYFRA 21-1 peuvent aussi être présents chez des personnes n'ayant pas de pathologie maligne (ex. pneumonie aiguë, tuberculose, maladies hépatiques et insuffisance rénale). Par conséquent, le taux de CYFRA 21-1 ne peut pas être utilisé comme preuve absolue de présence ou d'absence de pathologie maligne et le dosage immunoenzymatique de CYFRA 21-1 ne doit pas servir à dépister le cancer. Les résultats du test ne doivent qu'être interprétés en parallèle avec d'autres études et procédures dans le diagnostic de la maladie. Le test CYFRA 21-1 ne doit en aucun cas se substituer à l'examen clinique. La contamination de l'échantillon par de la salive peut provoquer des faux positifs de CYFRA 21-1. Des anticorps anti-réactifs (anticorps anti-souris humain ou anticorps hétérophiles) dans l'échantillon du patient peuvent parfois interférer avec le dosage, même si des agents bloquants spécifiques sont inclus dans le tampon. *Une agitation excessive peut produire des valeurs artificiellement diminuées de CYFRA 21-1. L'agitation au moyen d'agitateurs à cylindres doit donc être limitée à 1 minute maximum à une vitesse maximale de 16 tr/min. L'agitation d'échantillons au moyen d'agitateurs (Vortex) doit être limitée à 5 secondes maximum. En cas d'aliquotes, choisir le tube de taille appropriée (limiter l'espace vide dans le tube).*

## VALEURS ATTENDUES

Le taux de CYFRA 21-1 a été déterminé chez 497 de donneurs de sang. La valeur moyenne était de 0,7 ng/mL et la valeur médiane était de 0,6 ng/mL.

95 % des donneurs de sang avaient des valeurs de CYFRA inférieures à 1,6 ng/mL. Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence pour la population concernée.

## CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

### Précision

La précision totale a été calculée conformément à la directive EP5-12 du NCCLS (16), en utilisant quatre niveaux de pools de sérum humain congelés contenant du CYFRA 21-1 ajouté. Chaque échantillon a été pipeté de façon aléatoire en doublons et analysé deux fois par jour pendant 20 jours, soit 40 séries avec 40 modèles différents, par trois techniciens différents utilisant 2 lots de trousse de dosages immunoenzymatiques CYFRA 21-1.

Échantillon	Répliques	Moyenne µg/L	Intra-série ET (ng/mL)	Intra-série CV %	Entre ET (ng/mL)	Entre CV %
CYFRA 21-1 1	80	2,7	0,1	2,4	0,1	3,9
CYFRA 21-1 2	80	7,2	0,1	1,7	0,2	3,2
CYFRA 21-1 3	80	17,7	0,5	2,6	0,5	3,1
CYFRA 21-1 4	80	35,7	1,0	2,7	1,1	3,0

La précision totale calculée pour le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 a été établie à  $\leq 6$  % CV.

### Limite de détection

La limite de détection du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est de  $\leq 0,5$  ng/mL.

La limite de détection (LoD) correspond à la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % et représente la concentration la plus faible de l'antigène CYFRA 21-1 pouvant être distinguée de zéro. La directive EP17-A (17) du NCCLS a servi à concevoir les expériences de limite de détection. Une étude a été menée où l'étalon CYFRA 21-1 A (étalon zéro) et 4 échantillons de sujets en bonne santé ont été dilués à 0,2 ng/mL avec le diluant pour échantillon, puis testés par séries de 24 répliques en 4 séries sur deux jours. La limite de détection a été calculée ainsi :

$$\text{LoD (ng/mL)} = 0,2 \text{ ng/mL} \times (1,65 \times \text{ET}_0 + 1,65 \times \text{ET}_{0,2}) / (\text{DO}_{0,2} - \text{DO}_0)$$

La limite de détection de la trousse de dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 s'est révélée  $< 0,1$  ng/mL.

### Sensibilité fonctionnelle

La sensibilité fonctionnelle du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est de  $\leq 0,5$  ng/mL.

La sensibilité fonctionnelle est exprimée comme la concentration d'un analyte pour lequel le CV est 20 %. La directive EP5-A2 (16) du NCCLS a servi à concevoir les expériences permettant de déterminer la sensibilité fonctionnelle. Une étude a porté sur un panel de sensibilité de six membres testés par série de 2 répliques en 2 séries sur 20 jours avec deux lots de réactifs. La sensibilité fonctionnelle calculée pour le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 s'est révélée  $< 0,2$  ng/mL.

### Récupération

La récupération moyenne du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est de  $100 \pm 20$  %.

Une étude a été menée où les dilutions d'une solution d'antigène avec des concentrations connues de CYFRA 21-1 ont été ajoutées à des échantillons de sérum humain normal. La concentration de CYFRA 21-1 a été déterminée à l'aide du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 et le résultat de récupération (en pourcentage) a été calculé. Les données représentatives de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous\* :

Échantillon	Valeur du dosage endogène (ng/mL)	Antigène CYFRA 21-1 ajouté (ng/mL)	Valeur du dosage CYFRA 21-1 observée (ng/mL)	Pourcentage de récupération**%
1	0,5	2	2,3	93
		5	5,4	100
		16	15,4	91
		38	39,9	103
2	0,5	2	2,5	99
		5	5,2	96
		16	16,4	97
		38	39,6	102
3	0,6	2	2,6	102
		5	5,4	99
		16	16,1	95
		38	42,0	108
4	0,5	2	2,4	95
		5	5,3	98
		16	17,6	104
		38	43,1	111
5	0,5	2	2,4	96
		5	5,4	100
		16	17,1	101
		38	39,2	101

La récupération moyenne pour les quatre concentrations enrichies présentées ci-dessus s'est révélée de 100 %.

\* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

\*\*% Récupération = concentration observée de CYFRA 21-1 (ng/mL) / Conc. endogène de CYFRA 21-1 (ng/mL) + CYFRA 21-1 ajouté (ng/mL)

### Effet crochet

Aucun effet crochet à dose élevée n'a été observé pour des échantillons contenant jusqu'à 1 100 ng/mL d'antigène CYFRA 21-1.

## Linéarité de la dilution

La linéarité de dilution moyenne du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est de  $100 \pm 20 \%$ .

Une étude a été menée sur le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1, d'après le modèle de la directive EP6-A du NCCLS (CLSI) (18). Les échantillons de sérum ayant des valeurs de CYFRA 21-1 élevées ont été dilués avec l'étalon CYFRA 21-1 A (étalon zéro). La concentration de CYFRA 21-1 a été déterminée pour chaque dilution et le pourcentage de récupération (%) a été calculé. Les données représentatives de cette étude sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Échantillon	Facteur de dilution final	Valeur obtenue (ng/mL)	Valeur prévue (ng/mL)	Pourcentage de récupération** (%)
A	Non dilué	43,9	43,9	100
	1:1,25	34,8	35,1	99
	1:1,7	26,0	26,3	99
	1:2	21,5	21,9	98
	1:2,5	17,1	17,5	97
	1:5	9,0	8,8	102
	1:10	4,3	4,4	99
	1:20	2,2	2,2	102
B	Non dilué	36,9	36,9	100
	1:1,25	28,6	29,5	97
	1:1,7	21,1	22,1	96
	1:2	18,3	18,4	99
	1:2,5	14,5	14,8	98
	1:5	6,9	7,4	93
	1:10	3,2	3,7	86
	1:20	1,5	1,8	81
C	Non dilué	43,2	43,2	100
	1:1,25	34,1	34,6	99
	1:1,7	25,4	25,9	98
	1:2	21,0	21,6	97
	1:2,5	16,5	17,3	96
	1:5	7,8	8,6	91
	1:10	3,8	4,3	87
	1:20	1,8	2,2	83

Échantillon	Facteur de dilution final	Valeur obtenue (ng/mL)	Valeur prévue (ng/mL)	Pourcentage de récupération** (%)
D	Non dilué	43,7	43,7	100
	1:1,25	33,1	35,0	95
	1:1,7	25,9	26,2	99
	1:2	21,4	21,9	98
	1:2,5	16,6	17,5	95
	1:5	7,9	8,7	90
	1:10	3,8	4,4	86
	1:20	1,8	2,2	80
E	Non dilué	39,6	39,6	100
	1:1,25	30,6	31,7	97
	1:1,7	23,6	23,8	99
	1:2	19,7	19,8	100
	1:2,5	15,2	15,8	96
	1:5	7,3	7,9	92
	1:10	3,5	4,0	88
	1:20	1,6	2,0	82

La récupération moyenne sur les cinq échantillons dilués ci-dessus a été établie à 94 %.

\* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

\*\*% Récupération = conc. CYFRA 21-1 obtenue x facteur de dilution / conc. CYFRA 21-1 non dilué.

### Spécificité analytique

La spécificité moyenne du dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 est de 100 ± 15 %.

Des études de récupération ont été réalisées pour comparer les sérums contenant les composés suivants aux concentrations indiquées avec les sérums de contrôle. La directive EP7-A (19) du NCCLS a été utilisée pour concevoir les expériences d'interférence. Les substances et concentrations suivantes ont été testées sans produire d'interférences avec le test.

<b>Interférences endogènes du sérum</b>	<b>Concentration du test</b>
Triglycérides	30 mg/mL
Bilirubine	0,2 mg/mL
Hémoglobine	5 mg/mL
Protéine totale	120 mg/mL

<b>Interférences avec médicaments de chimiothérapie</b>	<b>Concentration du test</b>
Carboplatine	500 µg/mL
Cisplatine	165 µg/mL
Dexaméthasone	10 µg/mL
Doxorubicine	1,16 µg/mL
Leucovorine	2,68 µg/mL
Méthotrexate	45 µg/mL
Paclitaxel	3,5 ng/mL

### **Pathologies cliniques risquant de produire des interférences**

Le dosage immunoenzymatique CYFRA 21-1 a été évalué sur des échantillons contenant des HAMA et des facteurs rhumatoïdes (FR) pour tester sa spécificité. Le % de récupération de six échantillons positifs pour les HAMA et de cinq échantillons positifs pour les FR a été évalué avec l'antigène CYFRA 21-1 enrichi dans chaque échantillon à près de 5 et 25 ng/mL. Les résultats de récupération moyens sont résumés dans le tableau ci-dessous.\*

<b>Pathologie clinique</b>	<b>Nombre d'échantillons</b>	<b>% de récupération moyen</b>
HAMA	6	98
FR	5	101

\* Données représentatives ; les résultats de chaque laboratoire peuvent varier par rapport à ces données.

### **GARANTIE**

Toute modification de la procédure non recommandée par Fujirebio Diagnostics peut affecter les résultats, auquel cas Fujirebio Diagnostics décline toutes les garanties explicites, implicites ou légales, y compris la garantie implicite de qualité marchande et de conformité du produit.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression of specific cytokeratins in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982;31:11-24
2. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: Novel Keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 2001;114:2569-2575
3. Bodenmüller H, Ofenloch-Hähle B, Lane EB, Dessauer A, Böttger V, Donié F. Lung Cancer associated Keratin 19 fragments: Development and Biochemical Characterization of the new Serum Assay Enzymun-Test CYFRA 21-1. *Int J Biol Markers* 1994;9:75-81
4. Bodenmüller H. The Biochemistry of CYFRA 21-1 and other cytokeratin-tests. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1995;;221:60-66
5. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Müller C, Poley S, Hofmann K, Fateh-Moghadam. Comparison of Cytokeratin Fragment 19 (CYFRA 21-1) Tissue Polypeptide antigen (TPA) and Tissue Polypeptide Specific Antigen (TPS) as Tumor Markers in Lung Cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993;31:689-694
6. Bodenmüller H, Donié F, Kaufmann M, Banauch D, The tumor markers TPA, TPS, TPAcyk and CYFRA 21-1 react differently with the keratins 8, 18 and 19. *Int J Biol Markers* 1994;9:70-74.
7. Böttger V, Stasiak PC, Harrison DL, Mellerick DM, Lane EB. Epitope mapping of monoclonal antibodies to keratin 19 using keratin fragments, synthetic peptides and phage peptide libraries. *Eur J Biochem* 1995;231(2):475-85.
8. Stigbrand T et al. Epitope specificity of 30 monoclonal antibodies against cytokeratin antigens: the ISOBM TD5-1 Workshop. *Tumor Biol* 1998;19(2): 132-52.
9. Stieber P, Hasholzner U, Bodenmüller H, Nagel D, Sunder-Plassmann L, Dienemann H, Meier W, Fateh-Moghadam A. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. *Cancer* 1993;72(3):707-13.
10. Ebert W, Dienemann H, Fateh-Moghadam A, Scheulen M, Konietzko N, Schleich T, Bombardieri E. Cytokeratin 19 fragment CYFRA 21-1 compared with carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen and neuron-specific enolase in lung cancer. Results of an international multicentre study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994;32(3):189-99.
11. Stieber P, Zimmermann A, Reinmiedl J, Müller C, Hoffmann H, Dienemann H. CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non small cell lung carcinomas (NSCLC). *Anticancer Res* 1999;19(4A): 2665-8.

12. Pujol JL, Molinier O, Ebert W, Daurès JP, Barlesi F, Buccheri G, Paesmans M, Quoix E, Moro-Sibilot D, Szturmowicz M, Bréchet JM, Muley T, Grenier J. CYFRA 21-1 is a prognostic determinant in non-small-cell lung cancer: results of a meta-analysis in 2063 patients. *Br J Cancer* 2004;90(11):2097-105.
13. Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, Fabricius PG, Schambeck C, Weinzierl M, Poley S, Samtleben W, Hofmann K, Meier W, et al. Comparison of CYFRA 21-1, TPA and TPS in lung cancer, urinary bladder cancer and benign diseases. *Int J Biol Markers* 1994;9(2):82-8.
14. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Exposure to Blood Borne Pathogens.
15. US Department of Health and Human Services: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories: 4th Edition Washington DC: US Government Printing Office May, 1999.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline – Second Edition. EP5-A2 (2004).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. EP17-A (2004).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. EP6-A.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS/CLSI), Interference Testing in Clinical Chemistry, Approved Guideline, EP7-A.



---

CanAg<sup>®</sup> est une marque déposée de Fujirebio Diagnostics AB

**Fujirebio Diagnostics AB**

**Elof Lindälv's gata 13**

**PO Box 121 32**

**SE-402 42 Göteborg**

**Suède**

**Téléphone + 46 3185 70 30**

**Télécopie + 46 3185 70 40**

**info@fdab.com**

**www.fdab.com**