



CYFRA 21-1 EIA

REF

211-10

Istruzioni per l'uso
2009-06

Dosaggio immunoenzimometrico
96 tests

FINALITÀ DEL DOSAGGIO

Il kit EIA CYFRA 21-1 è un dosaggio immunoenzimometrico per la determinazione quantitativa dei frammenti solubili di citocheratina 19 nel siero umano.

INTRODUZIONE E DESCRIZIONE DEL DOSAGGIO

La citocheratina 19 appartiene alla famiglia che comprende almeno venti diversi polipeptidi della citocheratina. Le citocheratine formano la struttura filamentosa intermedia delle cellule epiteliali (1, 2). I frammenti di citocheratina sono scarsamente solubili ma, in seguito alla degradazione proteolitica, si formano frammenti di citocheratina solubili che vengono rilasciati nei liquidi corporei.

CYFRA 21-1 è un dosaggio immunoenzimometrico che determina il livello dei frammenti di citocheratina 19 nel siero (3-6). Il kit EIA CYFRA 21-1 si basa su due anticorpi monoclonali (BM 19.21 e KS 19.1) specifici per la citocheratina 19 (3, 7-8). Livelli elevati di frammenti di citocheratina 19 vengono osservati nel siero dei pazienti con cancro del polmone (5, 9-12) e in presenza di altri tumori, come per esempio il cancro della vescica (13). L'indicazione più importante per il dosaggio CYFRA 21-1 è il monitoraggio dell'andamento della malattia nel cancro del polmone non a piccole cellule (NSCLC), (11).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit EIA CYFRA 21-1 è un dosaggio immunoenzimometrico in fase solida, non competitivo basato su due anticorpi monoclonali (di origine murina) e diretti contro due determinanti antigenici separati dei frammenti solubili di citocheratina 19 (7-8). I calibratori, i controlli e i campioni dei pazienti vengono incubati con Anti-CYFRA 21-1 MAb biotinilato e Anti-CYFRA 21-1 MAb marcato con perossidasi di rafano

in microstrip rivestite con streptavidina. Dopo il lavaggio, il reagente substrato/ cromogeno tamponato (perossido di idrogeno e 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidina) viene erogato in tutti i pozzetti attivando in tal modo la reazione enzimatica. Durante la reazione enzimatica, se è presente l'antigene si sviluppa una colorazione blu. L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di CYFRA 21-1 presente nei campioni.

L'intensità del colore viene misurata per mezzo di un lettore spettrofotometrico di micropiastre alla lunghezza d'onda di 620 nm (oppure a 405 nm dopo l'aggiunta di reattivo bloccante).

Le curve di calibrazione vengono estrapolate dai valori di assorbanza ottenuti alla concentrazione di ogni calibratore. Le concentrazioni di CYFRA 21-1 nei campioni dei pazienti vengono quindi lette sulla curva di calibrazione.

REATTIVI

- Ogni kit EIA CYFRA 21-1 contiene reattivi sufficienti per eseguire 96 dosaggi.
- La data di scadenza del kit è specificata sull'etichetta posta sull'esterno della scatola del kit.
- Non usare il prodotto oltre la data di scadenza.
- Non mescolare i reattivi provenienti da kit di lotti diversi.
- Conservare il kit a 2–8°C. Non congelare.
- I reattivi una volta aperti sono stabili alle condizioni descritte nella tabella che segue a condizione che non siano contaminati, vengano conservati nei flaconi originali opportunamente chiusi e manipolati come prescritto. Riportare i reattivi a 2-8 °C immediatamente dopo l'uso.

| Componenti | Quantità | Conservazione e stabilità dopo apertura |
|--|-----------|---|
| MICROPLA | | |
| Micropiastra sensibilizzata con streptavidina | 1 Piastra | 2–8°C fino alla scadenza riportata sulla micropiastra |
| 12 x 8 pozzetti a frattura prestabilita sensibilizzati con streptavidina. Dopo l'apertura riporre immediatamente le strip non usate nella busta di alluminio contenente l'essiccatore. Risigillare con cura affinché il prodotto si mantenga asciutto. | | |

| Componente | Quantità | Conservazione e stabilità dopo apertura |
|---|----------|--|
| CAL CYFRA 21-1 A | | |
| Calibratore A CYFRA 21-1 | 1 x 8 ml | 2-8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |

Soluzione salina in tampone fosfato contenente sieroalbumina bovina, un colorante giallo inerte e un conservante anti-microbico non azidico. Pronto all'uso. Deve anche essere usato per la diluizione dei campioni.

| | | |
|-----------------------------------|-------------------------|--|
| Calibratori B-F CYFRA 21-1 | 5 flaconi, liofilizzati | Stabilità dopo ricostituzione 4 settimane a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C |
|-----------------------------------|-------------------------|--|

| | |
|---|----------|
| CAL CYFRA 21-1 B | 1 x 1 ml |
|---|----------|

| | |
|---|----------|
| CAL CYFRA 21-1 C | 1 x 1 ml |
|---|----------|

| | |
|---|----------|
| CAL CYFRA 21-1 D | 1 x 1 ml |
|---|----------|

| | |
|---|----------|
| CAL CYFRA 21-1 E | 1 x 1 ml |
|---|----------|

| | |
|---|----------|
| CAL CYFRA 21-1 F | 1 x 1 ml |
|---|----------|

I calibratori liofilizzati contengono l'antigene CYFRA 21-1 in soluzione salina in tampone fosfato contenente sieroalbumina bovina, un colorante giallo inerte e un conservante anti-microbico non azidico. Ricostituire con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso. **NOTA:** l'esatta concentrazione di CYFRA 21-1 varia da lotto a lotto ed è riportata sull'etichetta di ogni flacone.

| | | |
|------------------------|-------------------------|--|
| CYFRA Controlli | 2 flaconi, liofilizzati | Stabilità dopo ricostituzione 1 settimana a 2-8°C 4 mesi ad almeno -20°C |
|------------------------|-------------------------|--|

| | |
|---|----------|
| CONTROL CYFRA 21-1 1 | 1 x 1 ml |
|---|----------|

| | |
|---|----------|
| CONTROL CYFRA 21-1 2 | 1 x 1 ml |
|---|----------|

I controlli liofilizzati contengono l'antigene CYFRA 21-1 in una matrice di siero umano contenente un conservante anti-microbico non azidico. Ricostituire con acqua distillata o deionizzata prima dell'uso.

| Componenti | Quantità | Conservazione e stabilità dopo apertura |
|------------|----------|---|
|------------|----------|---|

| | |
|---------------|------------------------|
| BIOTIN | Anti-CYFRA 21-1 |
|---------------|------------------------|

| | | |
|--------------------------------|-----------|--|
| Biotina Anti-CYFRA 21-1 | 1 x 15 ml | 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |
|--------------------------------|-----------|--|

Biotina Anti-CYFRA 21-1 anticorpo monoclonale di origine murina, approssimativamente 1,25 µg/ml. Contiene soluzione salina in tampone Tris-HCl (pH 7,2), sieroalbumina bovina, agenti bloccanti, detergente, un colorante blu e un conservante anti-microbico non azidico. Miscelare con tracciante prima dell'uso.

| | |
|-------------|------------------------|
| CONJ | Anti-CYFRA 21-1 |
|-------------|------------------------|

| | | |
|--|-------------|--|
| Tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 | 1 x 0,75 ml | 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |
|--|-------------|--|

Soluzione stock di anticorpo monoclonale HRP Anti-CYFRA 21-1 di origine murina, approssimativamente 42 µg/ml. Contiene conservanti anti-microbici non azidici. Miscelare con Biotina Anti-CYFRA 21-1 prima dell'uso.

| | |
|-------------|------------|
| SUBS | TMB |
|-------------|------------|

| | | |
|---------------------------|-----------|--|
| Substrato TMB HRP- | 1 x 12 ml | 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |
|---------------------------|-----------|--|

Contiene perossido di idrogeno tamponato e 3, 3', 5, 5' tetra-metilbenzidina (TMB). Pronto all'uso.

| |
|-------------|
| STOP |
|-------------|

| | | |
|---------------------------|-----------|--|
| Reattivo bloccante | 1 x 15 ml | 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |
|---------------------------|-----------|--|

Contiene 0,12 M di acido cloridrico. Pronto all'uso.

| Componenti | Quantità | Conservazione e stabilità dopo apertura | | |
|--|----------|---|-----------|--|
| <table border="1"> <tr> <td>WASHBUF</td> <td>25X</td> </tr> </table> | WASHBUF | 25X | 1 x 50 ml | 2–8°C fino alla scadenza riportata sul flacone |
| WASHBUF | 25X | | | |

Soluzione salina tamponata Tris-HCl con Tween 20. Contiene Germall II come conservante. Diluire con acqua distillata o deionizzata x 25 prima dell'uso.

Indicatori di instabilità

La soluzione substrato TMB HRP deve essere incolore o leggermente azzurra. Una intensa colorazione blu significa che il reattivo è stato contaminato e pertanto non deve essere usato.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro

- Seguire le istruzioni riportate nel foglietto illustrativo. L'affidabilità dei risultati non può essere garantita se le istruzioni non vengono seguite scrupolosamente.
- Fare riferimento alla pubblicazione N. (CDC) 88-8396 sulle procedure per la sicurezza in laboratorio del U.S. Department of Health and Human Services (Md., USA) o a qualsiasi altra normativa locale o nazionale.
- Manipolare i campioni dei pazienti come potenzialmente infetti.
- Evitare il contatto con reattivi contenenti perossido di idrogeno o acido cloridrico. In caso di contatto con qualsiasi di questi reattivi, lavare abbondantemente con acqua.
- Seguire le normative locali relative allo smaltimento del materiale di scarto.

Precauzioni

Tutte le unità di sangue utilizzate nella preparazione di reattivi di origine umana sono state testate e sono risultate non reattive per l'anticorpo HIV-1/2, l'anticorpo anti-HCV e per l'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). Tuttavia, poiché nessun metodo è in grado di escludere completamente la presenza di infezioni trasmissibili attraverso il sangue, si consiglia di manipolare e smaltire i reattivi di origine umana derivati da questo prodotto come potenzialmente infettivi.

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il kit EIA CYFRA 21-1 deve essere utilizzato con siero. Prelevare il sangue per via venosa e separare il siero adottando le procedure consuete. I campioni possono essere conservati a 2-8°C per 1 giorno. Per periodi più lunghi conservare i campioni ad almeno -40°C. Evitare il congelamento e il scongelamento ripetuto dei campioni. In caso di suddivisione in aliquote, selezionare il contenitore di dimensioni corrette, ossia limitare lo spazio vuoto all'interno del contenitore. Portare i campioni congelati a temperatura ambiente e miscelarli delicatamente prima dell'analisi.

Nota: la miscelazione dei campioni con mixer a rulli deve essere limitata a 1 minuto con una velocità massima di 16 giri al minuto. La miscelazione dei campioni con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata a non più di 5 secondi. I campioni che contengono grossi particolati devono essere centrifugati a 10.000 x g per 10 minuti prima dell'uso per eliminare tutti gli aggregati che si possono formare durante il processo di scongelamento.

PROCEDIMENTO OPERATIVO

Materiali richiesti per il dosaggio ma non forniti con il kit

1. Agitatore di micropiastre

L'agitazione va effettuata con modalità mediamente vigorose ad approssimativamente 900-1100 oscillazioni/min.

2. Lavatore di micropiastre

Lavatore di micropiastre automatico in grado di effettuare 1 e 6 cicli di lavaggio con un volume di riempimento minimo di 350 µl/pozzetto/ciclo di lavaggio.

Qualora non si utilizzi un lavatore di micropiastre automatico, si raccomanda il lavatore di strip manuale Nunc Immuno-8.

3. Spettrofotometro per micropiastre

Con una lunghezza d'onda di 620 nm e/o 405 nm e un intervallo di assorbanza da 0 a 3,0.

4. Pipette di precisione

Con puntali monouso in grado di erogare microlitri. Utili ma non indispensabili per erogare 100 µl sono le pipette a 8 canali o le pipette graduate con puntali di plastica monouso. Pipette in grado di erogare millilitri.

5. Acqua distillata o deionizzata

Per la ricostituzione dei calibratori e dei controlli CYFRA 21-1 e per la preparazione della soluzione di lavaggio diluita.

Note

1. Una comprensione globale di questo libretto di istruzioni è necessaria per garantire l'uso appropriato del kit EIA CYFRA 21-1. I reattivi forniti con il kit devono essere utilizzati come una sola unità. Non mescolare reattivi identici tratti da kit con differente numero di lotto. Non usare i reattivi del kit oltre la data di scadenza indicata sull'esterno della scatola del kit.
2. Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso. I campioni congelati devono essere delicatamente ma accuratamente mescolati dopo il scongelamento. *La miscelazione dei campioni con mixer a rulli deve essere limitata al massimo a 1 minuto con una velocità massima di 16 giri al minuto. La miscelazione dei campioni con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata al massimo a 5 secondi. In caso di suddivisione in aliquote selezionare il contenitore con dimensioni corrette, ossia limitare lo spazio vuoto all'interno del contenitore.*
3. Prima di erogare i calibratori e i campioni ignoti è consigliabile segnare le strip in modo tale da poterle facilmente identificare durante e dopo il dosaggio.
4. La necessità di un lavaggio efficiente e accurato per la separazione di antigene legato e non legato e reattivi dai complessi anticorpi antigeni legati da una fase solida è una delle fasi più importanti in un dosaggio EIA. Per garantire un lavaggio efficiente, assicurarsi che tutti i pozzetti siano completamente riempiti fino al bordo superiore con la soluzione di lavaggio a ogni ciclo di lavaggio, che la soluzione di lavaggio venga erogata con un buon flusso, che l'aspirazione del liquido nei pozzetti tra un lavaggio e l'altro e alla fine dei lavaggi sia completa e che i pozzetti siano vuoti. In caso rimanga del liquido residuo, capovolgere la micropiastra premendola accuratamente su carta assorbente.
 - Lavaggio automatico: attenersi scrupolosamente alle istruzioni del produttore relativamente alla pulizia e alla manutenzione ed effettuare il numero richiesto di cicli di lavaggio prima e dopo ogni incubazione. Si raccomanda di usare la modalità di processo *strip* e la modalità di lavaggio *overflow* con un volume di erogazione di 800 µl. I sistemi di lavaggio e di aspirazione non devono essere lasciati per lunghi periodi a contatto con la soluzione di lavaggio in quanto gli ugelli potrebbero ostruirsi compromettendo l'efficienza delle operazioni di erogazione e aspirazione.
5. Il substrato TMB HRP è molto sensibile alla contaminazione. Per garantire una stabilità ottimale del substrato TMB HRP, versare la quantità necessaria dal flacone in un contenitore accuratamente pulito o preferibilmente in una vaschetta di plastica monouso in modo da evitare la contaminazione del reattivo. Usare puntali in plastica monouso (o puntali di dispensatori).
6. Assicurarsi di usare pipette con puntali di plastica monouso e un'appropriata tecnica di pipettamento quando si manipolano campioni e reattivi. Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la superficie del liquido per non provocare la contaminazione tra i pozzetti (carry over). Una appropriata tecnica di pipettamento è particolarmente importante quando si maneggiano i campioni e il substrato TMB HRP.

Preparazione dei reattivi

Stabilità dei reattivi ricostituiti

Calibratori CYFRA 21-1

4 settimane a 2–8°C
4 mesi ad almeno -20°C

Aggiungere 1,0 ml di acqua distillate o deionizzata a ogni flacone. Far riposare per almeno 15 minuti per permettere una perfetta ricostituzione e mescolare delicatamente prima dell'uso. **NOTA:** la concentrazione dei calibratori è riportata sulle etichette e deve essere usata per il calcolo dei risultati. *La miscelazione dei calibratori con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata a non più di 5 secondi.*

Controlli CYFRA 21-1

1 settimana a 2–8°C
4 mesi ad almeno -20°C

Aggiungere 1,0 ml di acqua distillate o deionizzata a ogni flacone. Far riposare per almeno 15 minuti per permettere una perfetta ricostituzione e mescolare delicatamente prima dell'uso. **NOTA:** l'intervallo dei controlli è riportato sulle etichette. *La miscelazione dei controlli con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata a non più di 5 secondi.*

Soluzione lavaggio

2 settimane a 2–25°C in un contenitore accuratamente chiuso

Versare 50 ml di concentrato di lavaggio in un contenitore pulito e diluire x25 aggiungendo 1200 ml di acqua distillata o deionizzata ottenendo in tal modo una soluzione di lavaggio tamponata.

Preparazione dei reattivi**Stabilità dei reattivi ricostituiti****Soluzione anticorpo**

1 giorno a 2-8 °C

Preparare la quantità necessaria di soluzione anticorpo mescolando 50 µl di tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 con 1 ml di Biotina Anti-CYFRA 21-1 per ogni strip (vedere tabella seguente):

| N. di strip | Tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 (µl) | Biotina 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 |

Assicurarsi di usare un contenitore di plastica o di vetro pulito per la preparazione della soluzione di anticorpo.

PROCEDIMENTO ANALITICO

Eseguire in duplicato il dosaggio dei calibratori, controlli e dei campioni ignoti. Eseguire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica. Tutti i reattivi e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima di eseguire il dosaggio.

1. Cominciare a preparare i Calibratori CYFRA 21-1, i Controlli 1 e 2, la soluzione di lavaggio e la soluzione anticorpo. È importante usare contenitori puliti. Seguire attentamente le istruzioni.
2. Trasferire il numero necessario di strip nell'apposito supporto (riporre immediatamente le restanti strip nella busta di alluminio contenente un essiccante e sigillare con cura). Lavare ogni strip una volta con la soluzione di lavaggio. Non lavare un numero maggiore di strip di quelle che possono essere usate in 30 minuti.
3. La miscelazione dei campioni con mixer a rulli deve essere limitata al massimo a 1 minuto con una velocità massima di 16 giri al minuto. La miscelazione dei campioni con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata al massimo a 5 secondi. Pipettare 50 µl dei calibratori CYFRA 21-1 (CAL A, B, C, D, E e F), dei controlli 1 e 2 e dei campioni (ignoti) nei pozzetti seguendo lo schema indicato:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 ecc |
|---|----------|----------|--------------|---|---|---|-------|
| A | Cal A | Cal E | 1° Ignoto | | | | |
| B | Cal A | Cal E | 1° Ignoto | | | | |
| C | Cal B | Cal F | 2° Ignoto | | | | |
| D | Cal B | Cal F | 2° Ignoto | | | | |
| E | Cal C | C1 | | | | | |
| F | Cal C | C1 | | | | | |
| G | Cal D | C2 | | | | | |
| H | Cal D | C2 | | | | | |

4. Aggiungere 100 µl di soluzione anticorpo a ogni pozzetto utilizzando una pipetta di precisione da 100 µl a 8 canali (o una pipetta di precisione da 100 µl). Tenere il puntale della pipetta leggermente al di sopra del bordo superiore del pozzetto, evitando di toccare la superficie del liquido per non provocare la contaminazione tra i pozzetti (carry over).
5. Incubare la micropiastra per 1 ora (± 5 min) a temperatura ambiente (20-25°C) con agitazione costante mediante agitatore di micropiastre.
6. Dopo l'incubazione, aspirare e lavare ogni strip 6 volte.
7. Aggiungere 100 µl di substrato TMB HRP a ogni pozzetto usando la stessa procedura descritta al punto 4. Il substrato TMB HRP deve essere erogato nei pozzetti il più velocemente possibile e il tempo di erogazione tra il primo e l'ultimo pozzetto non deve superare i 5 minuti.
8. Incubare per 30 minuti (± 5 minuti) a temperatura ambiente con agitazione costante. Evitare l'esposizione diretta alla luce del sole.
9. Leggere immediatamente l'assorbanza a 620 nm usando uno spettrofotometro per micropiastre.

Opzione

Se il laboratorio non dispone di uno spettrofotometro per micropiastre in grado di leggere a 620 nm, l'assorbanza può essere determinata come descritto al punto 9 seguente:

- Alternativa 9. Aggiungere 100 µl di reattivo bloccante, mescolare e leggere l'assorbanza a 405 nm in uno spettrofotometro per micropiastre entro 15 minuti dall'erogazione del reattivo bloccante.

Intervallo di misura

EIA CYFRA 21-1 misura concentrazioni comprese tra 0,5 e approssimativamente 50 ng/ml. Se si prevedono concentrazioni di CYFRA 21-1 superiori, si raccomanda di diluire i campioni con Calibratore A CYFRA 21-1 prima dell'analisi (vedere "Calcolo dei risultati con i campioni diluiti").

Controllo di qualità

I controlli CYFRA 21-1 numero 1 e 2 possono essere usati per la validazione delle serie analitiche. Gli intervalli dei risultati attesi sono indicati sulle etichette dei flaconi. I risultati del dosaggio di CYFRA 21-1 devono essere considerati validi se:

- i valori medi dei duplicati dei controlli sono all'interno degli intervalli specificati;
- le repliche dei duplicati dei Calibratori B-F e dei controlli non danno un CV superiore a 15%;
- le repliche dei duplicati del Calibratore A (zero) non presentano uno con l'altro variazioni di OD superiori alle 0,06 unità.

Se per i calibratori e i controlli si ottengono valori al di fuori degli intervalli indicati, bisogna effettuare un controllo completo della funzionalità dei reattivi, della precisione delle pipette e della funzionalità del lettore e l'analisi deve essere ripetuta. Si raccomanda a tutti i laboratori di preparare i propri pool di sieri a diverse concentrazioni da usare come controlli interni per garantire la precisione del dosaggio.

Riferimenti

Poiché non esistono riferimenti comuni per l'antigene CYFRA 21-1, i valori dei calibratori EIA CYFRA 21-1 vengono definiti sulla base di un set di standard di riferimento interno.

CALCOLO DEI RISULTATI

Se viene usato uno spettrofotometro per micropiastre con procedimento di calcolo programmato, consultare il manuale dello spettrofotometro e creare un programma utilizzando le concentrazioni riportate sulle etichette di ogni calibratore CYFRA 21-1. Per il calcolo automatico dei risultati di CYFRA 21-1 si raccomanda di usare uno dei seguenti metodi:

- Metodo di adattamento per curva dello spline cubico. Il Calibratore A deve essere incluso nella curva con il valore 0 ng/ml.
- Interpolazione con valutazione punto a punto. Il Calibratore A deve essere incluso nella curva con il valore 0 ng/ml.
- Metodi di adattamento per curva quadratica. Il Calibratore A deve essere incluso nella curva con il valore 0 ng/ml.

Protocollo

EIA CYFRA 21-1 REF 211-10

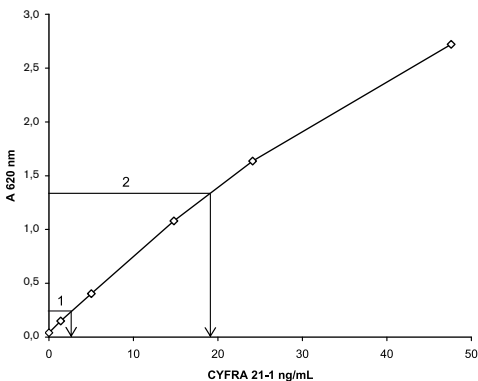
Preparare i componenti direttamente prima dell'uso. Utilizzare le condizioni di lavaggio e incubazione in base alle istruzioni.

| Fase | Flacone/Piastra | Procedura | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|---|-------------|--------------------------------------|------------------------------|---|----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|
| 1. Preparare CYFRA 21-1 Calibratori | CAL CYFRA 21-1 B, C, D, E, F | Aggiungere 1,0 ml di acqua distillata o deionizzata a ogni flacone. Lasciare riposare per almeno 15 minuti e miscelare delicatamente. NOTA: la concentrazione esatta di ogni calibratore è indicata su ogni etichetta. La miscelazione dei calibratori / dei controlli con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata a non più di 5 secondi. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | CONTROL CYFRA 21-1 1, 2 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparare la soluzione di lavaggio | WASHBUF 25X | Diluire 50 ml di concentrato di lavaggio con 1200 ml di acqua distillata o deionizzata. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Preparare la soluzione anticorpo | CONJ Anti-CYFRA 21-1 | Mescolare 50 µl di tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 con 1 ml di biotina anti-CYFRA 21-1 per strip: | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | BIOTIN Anti-CYFRA 21-1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | <table border="1"><thead><tr><th>N. di Strip</th><th>tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 (µl)</th><th>biotina 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> | N. di Strip | tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 (µl) | biotina 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 |
| N. di Strip | tracciante, HRP Anti-CYFRA 21-1 (µl) | biotina 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 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

NOTA: non utilizzare i metodi di valutazione 4-parametrica o di regressione lineare. Per la valutazione manuale, viene costruita una curva di calibrazione tracciando i valori di assorbanza (A) ottenuti per ogni calibratore CYFRA 21-1 contro le corrispondenti concentrazioni di CYFRA 21-1 (in ng/ml). Le concentrazioni ignote di CYFRA 21-1 possono quindi essere lette dalla curva di calibrazione utilizzando il valore medio di assorbanza di ogni campione del paziente.

Esempio di risultati

| Campione | Valori calibratore (ng/ml) | Valori di assorbanza Media (A) | CYFRA 21-1 ng/ml |
|---------------|----------------------------|--------------------------------|------------------|
| Calibratore A | 0 | 0,041 | |
| Calibratore B | 1,4 | 0,151 | |
| Calibratore C | 5,0 | 0,405 | |
| Calibratore D | 14,8 | 1,080 | |
| Calibratore E | 24,1 | 1,635 | |
| Calibratore F | 47,6 | 2,721 | |
| Campione 1 | | 0,259 | 2,9 |
| Campione 2 | | 1,366 | 19,4 |



Esempio, non usare questa curva per determinare i risultati del dosaggio.

La concentrazione esatta di CYFRA 21-1 è indicata sull'etichetta di ogni flacone di calibratore.

Calcolo dei risultati con i campioni diluiti

I campioni con concentrazioni CYFRA 21-1 superiori all'intervallo di misurazione possono essere diluiti con il Calibratore A di CYFRA 21-1. La diluizione raccomandata è 1/2.

- Diluizione 1/2 = 100 µl di campione + 100 µl di Calibratore A di CYFRA 21-1
La concentrazione CYFRA 21-1 dei campioni diluiti viene quindi calcolata nel seguente modo:
- Diluizione 1/2 : 2 x il valore misurato

LIMITI DEL DOSAGGIO

I pazienti con cancro confermato possono avere valori di CYFRA 21-1 nello stesso intervallo dei soggetti sani. Livelli elevati di CYFRA 21-1 possono essere riscontrati anche nei soggetti con malattia benigna, p.es. polmonite acuta, tubercolosi, malattie del fegato e insufficienza renale. Pertanto, la concentrazione di CYFRA 21-1 non può essere intesa come evidenza assoluta della presenza o della assenza di patologia tumorale e il dosaggio EIA CYFRA 21-1 non deve essere impiegato nello screening del cancro. I risultati del dosaggio devono essere interpretati solo unitamente ad altri sistemi di indagine della diagnosi della malattia e il dosaggio di CYFRA 21-1 non può sostituire altri metodi consolidati di valutazione clinica.

La contaminazione del campione con la saliva può causare livelli falsamente elevati di CYFRA 21-1. Anticorpi diretti contro agenti contenuti nei reattivi (anticorpi umani anti-topo (HAMA) e anticorpi eterofili) presenti nel siero dei pazienti possono occasionalmente interferire nel dosaggio, anche se specifiche sostanze bloccanti sono contenute nel tampone. *Una miscelazione eccessiva può comportare valori di CYFRA 21-1 artificialmente ridotti, pertanto la miscelazione dei campioni con mixer a rulli deve essere limitata al massimo a un 1 minuto con una velocità massima di 16 giri al minuto. La miscelazione dei campioni con mixer a vibrazione elettrica (Vortex) deve essere limitata a non più di 5 secondi. In caso di suddivisione in aliquote, selezionare il contenitore di dimensioni corrette, ossia limitare lo spazio vuoto all'interno del contenitore.*

VALORI ATTESI

Il livello di CYFRA 21-1 è stato determinato in 497 donatori di sangue. Il valore medio è risultato pari a 0,7 ng/ml e il valore mediano pari a 0,6 ng/ml.

Il 95% dei donatori di sangue presentava valori di CYFRA inferiori a 1,6 ng/ml. Si consiglia che ogni laboratorio stabilisca i propri valori di riferimento relativi alla popolazione di interesse.

PRESTAZIONI METODOLOGICHE

Precisione

La precisione totale è stata determinata conformemente alla direttiva EPS-A2 NCCLS (CLSI) (16) utilizzando quattro livelli di pool di siero umano congelato con l'aggiunta di CYFRA 21-1. Ogni campione è stato pipettato su base casuale in duplicati e analizzato due volte al giorno per 20 giorni, ossia 40 analisi con 40 diversi modelli da parte di tre diversi tecnici utilizzando due lotti di kit EIA CYFRA 21-1 differenti.

| Campione | Repliche | Media µg/l | Intra-saggio SD (ng/ml) | Intra-saggio CV % | Totale SD (ng/ml) | Totale 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 precisione totale determinata per il dosaggio EIA CYFRA 21-1 è risultata pari a $\leq 6\%$ CV.

Limiti del dosaggio

Il limite di determinazione di EIA CYFRA 21-1 è $\leq 0,5$ ng/ml.

Il limite di determinazione (LoD) corrisponde al limite più elevato del 95% dell'intervallo di confidenza e rappresenta la più bassa concentrazione di antigene CYFRA 21-1 che si può distinguere da zero. La direttiva EP17-A (17) NCCLS è stata usata per definire i test LoD. Si è effettuato uno studio dove il Calibratore A (zero) di CYFRA 21-1 e 4 campioni da soggetti sani diluiti fino a una concentrazione di 0,2 ng/ml con il diluente del campione sono stati dosati in replicati di 24 per serie analitica in 4 sedute analitiche differenti in due giorni separati. Il LoD è stato calcolato come segue:

$$\text{LoD (ng/ml)} = 0,2 \text{ ng/ml} \times (1,65 \times \text{SD}_0 + 1,65 \times \text{SD}_{0,2}) / (\text{OD}_{0,2} - \text{OD}_0)$$

Il limite di determinazione del kit EIA CYFRA 21-1 è stato calcolato essere $< 0,1$ ng/ml.

Sensibilità funzionale

La sensibilità funzionale del dosaggio EIA CYFRA 21-1 è $\leq 0,5$ ng/ml.

La sensibilità funzionale è espressa come la concentrazione di un analita alla quale il CV è 20%. La direttiva EP5-A2 (16) NCCLS è stata usata per definire i dosaggi per la determinazione della sensibilità funzionale. È stato condotto uno studio dove un pannello a sei sensibilità diverse è stato dosato in replicati di 2 in due sedute analitiche diverse per venti giorni con due lotti di reattivi. La sensibilità funzionale determinata per EIA CYFRA 21-1 è risultata di $< 0,2$ ng/ml.

Recupero

Il recupero medio del dosaggio EIA CYFRA 21-1 è $100 \pm 20\%$.

È stato condotto uno studio dove a diluizioni di una soluzione antigene a concentrazioni note di CYFRA 21-1 sono stati aggiunti dei sieri umani normali. La concentrazione di CYFRA 21-1 è stata determinata dosando EIA CYFRA 21-1 con calcolo del risultante recupero percentuale. Dati indicativi di questo studio sono indicati nella seguente tabella *:

| Campione | Valore endogeno (ng/ml) | Aggiunta dell'antigene CYFRA 21-1 (ng/ml) | Valori di CYFRA 21-1 ottenuti (ng/ml) | Recupero percentuale**% |
|----------|-------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------|
| 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 |

Il recupero medio ottenuto nelle quattro concentrazioni arricchite è stato del 100%.

*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

**Recupero % = $\frac{\text{Concentrazione di CYFRA 21-1 osservata (ng/ml)}}{\text{Concentrazione di CYFRA 21-1 endogena (ng/ml) + CYFRA 21-1 aggiunto (ng/ml)}}$

Effetto gancio

Nessun effetto gancio è stato osservato per campioni contenenti fino a 1100 ng/ml dell'antigene CYFRA 21-1.

Linearità

Il valore medio di linearità di diluizione di EIA CYFRA 21-1 è $100 \pm 20\%$.

È stato condotto uno studio per EIA CYFRA 21-1 in accordo con la direttiva EP6-A NCCLS (CLSI) (18). Campioni di siero con elevati valori di CYFRA 21-1 sono stati diluiti con il Calibratore A CYFRA 21-1 (zero). La concentrazione di CYFRA 21-1 è stata determinata per ogni diluizione ed è stato calcolato il recupero percentuale (%). Dati indicativi di questo studio sono indicati nella seguente tabella *:

| Campione | Fattore di diluizione finale | Valore ottenuto (ng/ml) | Valore atteso (ng/ml) | Recupero percentuale ** (%) |
|----------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| A | Non diluito | 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 diluito | 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 diluito | 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 |

| Campione | Fattore di diluizione finale | Valore ottenuto (ng/ml) | Valore atteso (ng/ml) | Recupero percentuale ** (%) |
|----------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| D | Non diluito | 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 diluito | 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 |

Il recupero medio nei cinque campioni diluiti mostrati nella tabella è = 94%.

*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

**Recupero % = $\frac{\text{Concentrazione di CYFRA 21-1 ottenuta per Fattore di diluizione}}{\text{Concentrazione di CYFRA 21-1 non diluita}}$.

Specificità analitica

La specificità media del dosaggio EIA CYFRA 21-1 è $100 \pm 15\%$.

Sono stati condotti studi sul recupero al fine di confrontare i sieri contenenti i seguenti composti alle concentrazioni indicate con sieri di controllo. La direttiva EP17-A (19) NCCLS è stata usata per definire gli esperimenti volti a verificare le interferenze. Le seguenti sostanze e concentrazioni sono state analizzate e hanno dimostrato di non interferire nel dosaggio.

| Interferenze da sostanze endogene nel siero | Concentrazione nel dosaggio |
|--|------------------------------------|
| Trigliceridi | 30 mg/ml |
| Bilirubina | 0,2 mg/ml |
| Emoglobina | 5 mg/ml |
| Proteine totali | 120 mg/ml |

| Interferenze da farmaci chemioterapici | Concentrazione nel dosaggio |
|---|------------------------------------|
| Carboplatino | 500 µg/ml |
| Cisplatino | 165 µg/ml |
| Desametasone | 10 µg/ml |
| Doxorubicina | 1,16 µg/ml |
| Leucovorin | 2,68 µg/ml |
| Metotressato | 45 µg/ml |
| Paclitaxel | 3,5 ng/ml |

Condizioni cliniche potenzialmente interferenti

Il dosaggio EIA CYFRA 21-1 è stato valutato usando campioni contenenti HAMA e fattore reumatoide (RF) per ulteriormente verificarne la specificità. Sei campioni positivi per HAMA e cinque positivi per RF sono stati dosati per il recupero % dopo aggiunta dell'antigene CYFRA 21-1 arricchito in ogni campione alla concentrazione di circa 5 e 25 ng/ml. I recuperi medi sono elencati nella seguente tabella.*

| Condizioni cliniche | Numero di campioni | Media % recupero |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| HAMA | 6 | 98 |
| RF | 5 | 101 |

*Dati indicativi; i risultati ottenuti nei singoli laboratori possono essere diversi da questi dati.

AVVERTENZE

Ogni variazione o modifica del procedimento analitico non indicato da Fujirebio Diagnostics può alterare questi risultati. In tal caso Fujirebio Diagnostics non si assume alcuna delle responsabilità espresse, implicite o legali, inclusa la responsabilità implicita della commerciabilità e della idoneità d'uso.

BIBLIOGRAFIA

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® è un marchio registrato di Fujirebio Diagnostics AB

Fujirebio Diagnostics AB
Elof Lindälv's gata 13
PO Box 121 32
SE-402 42 Göteborg
Svezia
Telefono + 46 31 85 70 30
Fax + 46 31 85 70 40
info@fdab.com
www.fdab.com