

NOVA Lite® Cerebellum (Primate) Slides

Nur für "In-Vitro Diagnostik"

Nur für Export. Nicht zum Verkauf in den USA.

Bestell-Nr.: 508357, 508357.10

CLIA Kompliziertheit: Hoch

Verwendungszweck

Affen-Cerebellum-Gefrierschnitte für die indirekte Immunfluoreszenz (IFT) dienen zum Nachweis von zirkulierenden Antikörpern gegen Purkinje-Zellen oder andere Neuronen des Cerebellums im Humanserum. Der Test dient zur Unterstützung der Diagnose von einigen paraneoplastischen Syndromen, die hauptsächlich von Lungen-, Brust- und Ovarialtumoren ausgelöst werden können.

Informationen zum Test

Eine kleine Gruppe von Patienten mit paraneoplastischen Syndromen, speziell die mit kleinzelligen Lungenkarzinomen oder mit Ovarial- und Brusttumoren, produzieren Autoantikörper, die nicht nur mit dem Tumor, sondern auch mit dem neuronalen Gewebe reagieren. Anti-zerebelläre Autoantikörper können einfach und schnell mit der Immunfluoreszenz-Technik auf Ratten- Affen- oder Human-Cerebellum (Kleinhirn) nachgewiesen werden. Man findet zwei Gruppen von Antikörpern: die eine Gruppe färbt das Zytoplasma der Purkinje-Zellen und die andere die Kerne der Purkinje-Zellen und anderer Neuronen an. Sowohl bei dem Fluoreszenzmuster als auch bei dem klinischen Bild treten erhebliche Unterschiede auf, aber der Nachweis von hochtitrigen Antikörpern bei Patienten mit typischen Merkmalen ist sowohl bei der Diagnose als auch der Behandlung von großem Nutzen. Gelegentlich können auch Antikörper in Abwesenheit eines sichtbaren Tumors auftreten, deshalb müssen die Ergebnisse immer im Zusammenhang des gesamten klinischen Bilds interpretiert werden.

Testprinzip

Der Test beruht auf der indirekten Immunfluoreszenz-Technik. Die Patientenseren und entsprechende Kontrollen werden auf den Gefrierschnitten inkubiert. In einem Waschschrift werden die nichtreagierenden Antikörper entfernt und dann das Fluoreszenzkonjugat zugegeben. Überschüssiges Konjugat wird durch Waschen entfernt. Die Beurteilung der Objektträger erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Positive Patientenseren zeigen im Bereich der Bindungsstellen zwischen dem Gewebe und den Autoantikörpern eine apfelgrüne Fluoreszenz.¹

Inhalt der Testpackung

Affen-Cerebellum-Gefrierschnitte sind auf Objektträger mit je 4 Auftragsstellen aufgebracht. Die Objektträger sind einzeln in Folienbeutel, die ein Trockenmittel enthalten, verpackt.

Hinweise/Vorsichtsmaßnahmen

Die zu untersuchenden Patientenseren sollten als potentiell infektiös angesehen werden – entsprechende Umgangs- und Entsorgungsmethoden beachten. Der Test sollte nur von entsprechend geschultem Personal durchgeführt werden.

Lagerung

Unbenutzte Objektträger bei 2-8°C lagern, sie sind so bis zum angegebenen Datum verwendbar. NICHT EINFRIEREN! Nach dem Öffnen der Folienbeutel sollten die Objektträger sofort verwendet werden.

Proben

Blutproben über Venenpunktur sammeln und bei Raumtemperatur gerinnen lassen. Die Seren können bei 2-8°C bis zu 7 Tage vor dem Test gelagert werden.³ Für eine längere Lagerung empfiehlt es sich, die Seren aliquotiert bei mindestens -20°C einzufrieren. Serum nur einmal einfrieren und auftauen. Keine stark lipämische, hämolytische oder mikrobiell verunreinigte Seren verwenden, da dadurch erniedrigte Titer oder unklare Muster auftreten können.

Testdurchführung

Gelieferte Materialien

1. **508357** 1 x Affen-Cerebellum Objektträger mit 4 Auftragsstellen

Oder

2. **508357.10** 10 x Affen-Cerebellum Objektträger mit 4 Auftragsstellen
3. 1 - Arbeitsanleitung

Zusätzlich benötigtes Material

Zusätzlich benötigten Komponenten können bei INOVA Diagnostics bestellt werden: PBS-Puffer (Bestell-Nr.: 508002), IFA System Negativ-Kontrollserum (Bestell-Nr.: 508002), ANNA-1 Positiv-Kontrollserum (Bestell-Nr.: 504002), PCA-1 Positiv-Kontrollserum (Bestell-Nr.: 504509), FITC-IgG-(H+L) -Konjugat (affenadsorbiert) (Bestell-Nr.: 504011, 504071), 1%ige Evans-Blue-Lösung (Bestell-Nr.: 504049) und Eindeckmedium (508001, 508005, 508006).

Testdurchführung

Qualitätskontrolle

Die Negativ- und Positivkontrollen sollten bei jedem Testansatz mitgeführt werden.

1. Eindeckmedium: Das Eindeckmedium aus dem Kühlschrank nehmen und vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.
2. Patientenseren verdünnen
Screening: Patientenseren im Verhältnis 1/50 und 1/500 verdünnen. (z.B. 10µL Serum + 490µL PBS-Puffer und 5µL Serum + 2495µL PBS-Puffer).
Titration: Von im Screening positiven Proben eine serielle Verdünnungsreihe erstellen (z.B. 1/50, 1/100, 1/200; 1/400; usw.).
z.B. 100µL eines 1/50 verdünnten Patientenserums mit 100µL PBS-Puffer versetzen - ergibt eine 1/100 Verdünnung usw.
3. Objektträger vorbereiten. Die Objektträger auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen. Folienbeutel erst direkt vor dem Gebrauch öffnen! Die Objektträger aus dem Folienbeutel nehmen, entsprechend beschriften und in eine feuchte Kammer geben. Positiv- und Negativkontrollen und je 50-100µL der verdünnten Patientenseren auf die jeweiligen Auftragsstellen pipettieren.
4. Inkubation der Objektträger. Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18-28°C) in der feuchten Kammer inkubieren.
5. Waschen mit PBS-Puffer. Die Objektträger aus der feuchten Kammer nehmen und rasch mit PBS-Puffer (Spritzflasche) waschen, dabei nicht direkt in die Auftragsfelder spritzen. Die Objektträger in eine Halterung geben und in ein PBS-Pufferbad eintauchen. Die Objektträger 5-10min. im PBS-Puffer belassen, dabei rühren oder leicht schütteln.
6. Zugabe von Fluoreszenz-Konjugat. Überschüssigen PBS-Puffer abschütteln und die Objektträger um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen. Die Objektträger wieder in die feuchte Kammer legen und sofort, d.h. innerhalb von 15 sec, auf jede Auftragsstelle einen Tropfen Fluoreszenz-Konjugat, das entsprechend der Angaben verdünnt wurde, geben. Das Austrocknen des Substrats kann das Ergebnis beträchtlich beeinträchtigen. Die Verwendung des affenadsorbierten FITC-Konjugats (z.B. 504011, 504071) verbessert die Ergebnisse erheblich.
7. Inkubation der Objektträger. Die Objektträger 30 min. bei Raumtemperatur (18-28°C) in der feuchten Kammer im Dunkeln inkubieren.
8. Waschen mit PBS-Puffer. Erneut waschen wie unter Punkt 5 beschrieben. Wenn eine Gegenfärbung gewünscht wird, können bei diesem Waschschrift 2-3 Tropfen einer 1%igen Evans-Blue-Lösung pro 100mL PBS-Puffer zugegeben werden.
9. Deckgläschen aufsetzen. Jeweils nur einen Objektträger aus dem PBS-Pufferbad nehmen. Um die Auftragsstellen herum rasch abtrocknen und jeweils 1 Tropfen Eindeckmedium auf die Auftragsstelle geben. Das Deckgläschen sorgfältig auf den Objektträger legen, wobei Luftbläschen zu vermeiden sind. Eventuell vorhandene Luftblasen nicht versuchen zu entfernen. Überschüssiges Eindeckmedium mit Filterpapier entfernen.
10. Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten. Sie können im Dunkeln bei 2-8°C bis zu drei Tage ohne signifikanten Fluoreszenzverlust aufbewahrt werden.

Ergebnisse

Qualitätskontrolle

Ein Serum, das Autoantikörper gegen Purkinje-Zellen enthält, sollte eine kräftige, apfelgrüne Fluoreszenzfärbung des Zytoplasmas der Purkinje-Zellen erzeugen.

Ein Serum, das ANNA-1 Autoantikörper enthält, sollte eine kräftige, gesprenkelte, apfelgrüne Fluoreszenzfärbung der Kerne fast aller neuronaler Zellen, inklusive der Purkinje-Zellen, im Cerebellum (Kleinhirn), erzeugen.

Die Negativkontrolle zeigt eine matt-grüne Anfärbung des Gewebes ohne erkennbare Fluoreszenz.

Erscheint eine der Kontrollen nicht wie beschrieben, sollte der Testansatz verworfen und ein neuer Ansatz gemacht werden.

Interpretation der Ergebnisse

In Ref. 2 sind farbige Fotos mit Beispielen für diese Muster abgebildet. Die Ergebnisse sollten als positiv oder negativ ausgegeben werden.

Für das Screening auf Paraneoplastische Autoantikörper wird empfohlen, dass alle Proben, die eine positive Fluoreszenz bei einer 1/50-Verdünnung zeigen mit einer 1/500-Verdünnung erneut getestet werden. Normalerweise werden nur Autoantikörpertiter größer als 1/100 auf Affen-Cerebellum als klinisch relevant eingestuft.

Hinweis: Jedes Labor sollte eigene Richtlinien erstellen und festlegen wann ein positives Ergebnis klinisch relevant ist.

Grenzen des Verfahrens

1. Die im Fluoreszenzmikroskop verwendete Lichtquelle, Filter und Optik beeinflussen die Sensitivität des Tests. Die Qualität des Mikroskops wird maßgeblich durch die korrekte Wartung, speziell durch Zentrieren der Quecksilberlampe und deren Austausch nach der empfohlenen Brenndauer, beeinflusst.
2. Die Verwendung dieser Produkte mit IFT-Reagenzien anderer Hersteller wurde nicht überprüft, ist aber nicht zwangsläufig ausgeschlossen.
3. Der Test allein ist nicht als diagnostischer Beweis ausreichend. Alle Ergebnisse sollten immer nur im Zusammenhang mit anderen Laborbefunden (Serologie, Biopsie) und dem klinischen Bild des Patienten betrachtet werden.

Referenzen

1. Weller T. H. & Coons A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agent of Varicella and Herpes Zoster propagated in vitro: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **86**: 789-794.
2. Bradwell A. R. *et al* (2008). Atlas of Tissue Autoantibodies. Pub: The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
3. Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A. Milford Ward, G.D. Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Kurzarbeitsanleitung

1. Eindeckmedium auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
2. PBS-Pufferkonzentrat mit destilliertem Wasser verdünnen.
3. Patientenserum 1/50 und 1/500 mit PBS-Puffer verdünnen.
4. Objektträger auf Raumtemperatur (18-28°C) erwärmen lassen.
5. Je 50-100µL Kontrollen und verdünnte Patientenserum auftragen.
6. 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-28°C) in einer feuchten Kammer inkubieren.
7. Objektträger 5-10 min. mit PBS-Puffer waschen.
8. Objektträger aus dem PBS-Bad nehmen, um die Auftragsstellen herum gut abtrocknen, wieder in die feuchte Kammer legen und sofort auf jede Auftragsstelle einen Tropfen Konjugat auftropfen.
9. 30 Minuten bei Raumtemperatur (abdunkeln) inkubieren.
10. Wie unter Punkt 7 beschrieben waschen.
11. Objektträger Eindecken und Deckgläschen aufsetzen.
12. Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop auswerten.

NOVA Lite ist ein eingetragenes Warenzeichen von INOVA Diagnostics, Inc.
Copyright 2011 Alle Rechte vorbehalten ©

Hersteller:

INOVA Diagnostics, Inc.
9900 Old Grove Road
San Diego, CA 92131
United States of America

Technical Service (U.S. & Canada Only) : 877-829-4745
Technical Service (Outside the U.S.) : 00+ 1 858-805-7950
info@inovadx.com

Autorisierter Repräsentant:

Medical Technology Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert, Germany
Tel.: +49-6894-581020
Fax.: +49-6894-581021
www.mt-procons.com

628357DEU

January 2011
Revision 1

