

NOVA Lite® Cerebellum (Primate) Slides

Per uso diagnostico *In Vitro*

Solo para exportación. No comercializable en Estados Unidos.

Codice Prodotto: 508357, 508357.10

Complessità CLIA: elevata

Finalità d'uso

Las secciones de cerebelo de mono se utilizan para ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA), para el screening de anticuerpos circulantes en suero humano contra células de Purkinje y otras neuronas del cerebelo como una ayuda al diagnóstico de algunos síndromes paraneoplásicos principalmente producidos por tumores pulmonares, ováricos y del seno.

Sumario y Explicación de la prueba

Existe una pequeña proporción de pacientes con síndromes paraneoplásicos (sobretudo los asociados con carcinomas pulmonares de células pequeñas y tumores ováricos y del seno), que producen unos autoanticuerpos que reaccionan no sólo contra su propio tumor sino también contra tejidos neuronales. Los autoanticuerpos anti-cerebelo se pueden detectar mediante inmunofluorescencia indirecta en tejido de cerebelo de ratón, mono o humano. Hay dos grupos principales de anticuerpos, aquellos que tiñen el citoplasma de las células de Purkinje y aquellos que tiñen el núcleo de las células de Purkinje y otras neuronas. Existe una gran variabilidad en la tinción y en las características clínicas, pero la identificación de títulos elevados de autoanticuerpos en pacientes con síntomas típicos es de gran ayuda tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de la enfermedad. Algunas veces aparecen anticuerpos en ausencia de tumores aparentes, por lo tanto los resultados se deben analizar en el contexto del cuadro clínico.

Procedimiento de trabajo

Se utiliza una técnica de inmunofluorescencia indirecta, en la que las muestras de los pacientes y los controles adecuados se incuban en los portaobjetos con substrato. Los anticuerpos no específicos se eliminan mediante lavado y, a continuación, se aplican conjugados fluoresceinados adecuados. El conjugado no unido se elimina mediante lavado. Los portaobjetos se examinan en un microscopio de fluorescencia. Las muestras positivas producen una fluorescencia de color verde brillante que corresponde a las áreas de la sección en las que se ha unido el autoanticuerpo.¹

Reactivos

Secciones de cerebelo de mono en portaobjetos de 4 pocillos envueltas individualmente en una bolsa de aluminio que contiene desecante.

Advertencias/ Precauciones

Todos los sueros humanos suministrados en el kit han sido sometidos a screening para donantes, resultando negativos a la presencia del antígeno de superficie de la hepatitis B y a la presencia de los anticuerpos ante los virus HIV1, HIV2 y HCV. Sin embargo los sobredichos ensayos no garantizan la ausencia de agentes infecciosos. Deben establecerse métodos de manipulación y eliminación adecuados para todos los materiales potencialmente infecciosos y los procedimientos deben permitirse sólo a personal experto y autorizado.

El Azul de Evans y los controles del kit contienen el 0,09% de azida sódica como conservante y deben manipularse con precaución – no trague ni permita el contacto con la piel o las mucosas. En caso de contacto, lave con abundante agua y consulte a un médico. Con el plomo y el cobre pueden formarse azidas metálicas explosivas. Cuando se elimine el reactivo, lave con mucha agua los recipientes para evitar la acumulación de azida. El presente producto debe ser utilizado por personal especializado. Se recomienda observar estrictamente el procedimiento indicado.

Condiciones de almacenamiento

Los portaobjetos no abiertos se deben almacenar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad detallada en la etiqueta. NO CONGELAR. Una vez abiertas las bolsas, los portaobjetos se deben usar inmediatamente.

Recolección de Muestras

Las muestras de sangre deben proceder de extracciones venosas, dejadas coagular naturalmente. Separe el suero lo más rápidamente posible para evitar la hemólisis. El suero puede conservarse a 2-8°C durante un máximo de 7 días antes del ensayo³, o para periodos más largos, distribuir el suero en alícuotas y conservarlo a -20°C, o a temperatura inferior. NO congelar y descongelar los sueros más de una vez. Evitar el uso de sueros lipémicos, hemolizados o contaminados por microbios, puesto que puede dar lugar a títulos más bajos o patrones de coloración poco claros.

Procedimiento

1. **508357** 1 x Portaobjetos Cerebelo de mono, 4 pocillos
Or
2. **508357.10** 10 x Portaobjetos Cerebelo de mono, 4 pocillos
3. 1 instrucciones de empleo

Material necesario no incluido

PBS para dilución de muestras y lavados.

Recipiente para tampón PBS.

Micropipetas y puntas desechables para dispensar las muestras de los pacientes.

Cámara húmeda para las fases de incubación

Microscopio de fluorescencia con filtro de excitación de 495nm y filtro de barrera de 515nm.

Botella de plástico a presión para el lavado inicial en PBS.

Otros componentes que se pueden adquirir en INOVA Diagnostics: PBS (508002), Control Negativo IFA Sistema (508186), control positivo ANNA-1 (504002), control positivo PCA-1 (504509), el conjugado IgG FITC adsorbido con tejido de mono (504011, 504071), azul de Evans al 1% (504049) y medio de montaje (508001, 508005, 508006).

Procedimiento del test

Control de calidad

Los controles negativos y positivos deben efectuarse cada vez que se dosifican las muestras.

1. Medio de montaje: Sacar el medio de montaje de la nevera y dejar que se atempere (18-28°C) antes de usarlo.
2. Diluir las muestras de pacientes.
Screening: Diluir la muestra del paciente a 1/50 añadiendo 10µL de seuro a 90µL PBS y a 1/500 agregando 5µL del suero a 2495µL PBS.
Titulación: Realizar diluciones seriadas de las muestras que se han encontrado positivas en tampón PBS (p.ej. 1/50, 1/100, 1/200 y 1/400 etc.).
Por ejemplo: Utilizar 100µL de la dilución 1/50, mezclar con 100µL PBS para obtener una dilución 1/100 (repetir para las siguientes diluciones).
3. Portaobjetos con substrato. Los portaobjetos, antes de quitarlos del envase, tienen que alcanzar la temperatura ambiente (18-28°C). Etiquetar los portaobjetos correctamente, colocarlos en la cámara húmeda y añadir el control positivo y el negativo en los respectivos pocillos. Añadir 50-100µL de las muestras diluidas en los pocillos restantes.
4. Incubación de portaobjetos. Incubar los portaobjetos durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28°C).
5. Lavado PBS. Quitar los portaobjetos de la cámara húmeda y aclararlos brevemente con el PBS en una botella de plástico a presión. No rociar directamente en los pocillos. Situar los portaobjetos en un rack y sumergirlos en el PBS, luego agitar durante 5-10 minutos.
6. Adición del conjugado. Eliminar el exceso de PBS y secar el contorno de los pocillos con los papeles absorbentes suministrados. Volver a situar los portaobjetos en la cámara húmeda y cubrir de inmediato cada pocillo con una gota de conjugado. NO DEJAR LOS POCILLOS DESCUBIERTOS DURANTE MÁS DE 15 SEGUNDOS. El secado del substrato perjudica seriamente los resultados (p.ej. 504011, 504071).
7. Incubación de portaobjetos. Incubar los portaobjetos durante 30 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente (18-28°C) a oscuras.
8. Lavado con PBS. Lavar nuevamente y secar como en la fase 5. **COLOR DE CONTRASTE OPCIONAL:** Añadir 2-3 gotas de Azul de Evans al 1% por 100mL de PBS antes de sumergir los portaobjetos.

- Montaje con cubreobjetos. Quite uno a uno los portaobjetos de la solución PBS de lavado. Seque rápidamente el contorno de los pocillos y añada una gota de solución de montaje en cada pocillo. Coloque con cuidado el portaobjetos en el cubreobjetos, evitando que se formen burbujas de aire, pero sin intentar eliminar las que se hayan formado. Elimine el exceso de solución de montaje del contorno del cubreobjetos.
- Lectura de los portaobjetos con el microscopio de fluorescencia. Los portaobjetos pueden conservarse a 2-8°C a oscuras durante un máximo de 3 días, sin una pérdida significativa de fluorescencia.

Resultados

Control de calidad

Una muestra de suero que contenga autoanticuerpos contra células de Purkinje debe dar una tinción fluorescente brillante de color verde manzana en el citoplasma de las células de Purkinje.

Una muestra de suero que contenga autoanticuerpos anti ANNA-1 debe dar una tinción fluorescente verde manzana con un patrón granular en la mayor parte de núcleos neuronales en el cerebelo, incluyendo las células de Purkinje.

Un control negativo debe dar una tinción verde en todo el tejido sin una fluorescencia definida.

Si los controles no dan los patrones descritos, el ensayo no es válido y se debe repetir.

Interpretación de los Resultados

Ver referencia 2 para ejemplos fotográficos en color de los patrones. Los resultados se describen como positivos o negativos.

Cuando se estudian autoanticuerpos paraneoplásicos en muestras de pacientes que dan un resultado positivo a una dilución 1/50 se recomienda repetirlo con una dilución 1/500. Sólo los títulos superiores a 1/100 sobre tejido de cerebelo de mono, se consideran clínicamente significativos.

NB: Cada laboratorio debe establecer en que punto un resultado positivo se considera clínicamente significativo.

Limitaciones del Procedimiento

- La fuente luminosa, los filtros y la óptica de los microscopios de fluorescencia de diferentes marcas influirán en la sensibilidad del kit. Las prestaciones del microscopio dependen considerablemente de un mantenimiento correcto y, en particular, del centrado y de la sustitución de la lámpara de vapores de mercurio tras el periodo de tiempo aconsejado.
- La idoneidad para el uso del kit con reactivos IFA de otros fabricantes no se ha evaluado, pero el uso con estos reactivos no debe excluirse necesariamente.
- Este ensayo por sí mismo no permite formular un diagnóstico. Es necesario tomar en consideración todos los otros factores, incluida la historia clínica de los pacientes y otros resultados serológicos o de la biopsia.

Referencias

- 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.
- Bradwell A. R. *et al* (2008). Atlas of Tissue Autoantibodies. Publ. The Binding Site Ltd., Birmingham UK.
- Protein Reference Handbook of Autoimmunity (3rd Edition) 2004. Ed. A. Milford Ward, G.D. Wild. Publ. PRU Publications, Sheffield. 14.

Resumen del procedimiento

- Atemperar el medio de montaje.
- Diluir el PBS con agua destilada.
- Diluir las muestras del paciente 1/50 y 1/500 con PBS.
- Atemperar los portaobjetos (18-28°C).
- Dispensar 50-100µL control positivo y negativo y las muestras de suero diluidas a los pocillos adecuados.
- Incubar en cámara húmeda durante 30 minutos.
- Lavar durante 5-10 minutos con PBS.
- Secar alrededor de los pocillos y dispensar inmediatamente una gota de conjugado.
- Incubar como en el paso 6.
- Lavar como en el paso 7.
- Montar.
- Visualizar bajo microscopio de fluorescencia.

NOVA Lite es una marca registrada de INOVA Diagnostics, Inc.
Copyright 2011 Todos los derechos reservados ©

Fabricante:

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

Representante Autorizado:

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

628357ESP

January 2011
Revision 1

