

NOVA Lite® Cerebellum (Primate) Slides

Uniquement pour "Diagnostics *In-Vitro*"

Exclusivement destiné à l'exportation. Ne pas vendre aux États-Unis.

Références : 508357, 508357.10

Complexité de CLIA: Haut

Application

Les coupes de cervelet de singe sont destinées au dépistage des autoanticorps dirigés contre les cellules de Purkinje et autres neurones du cervelet, circulants dans le sérum humain. Elles offrent une aide au diagnostic de certains syndromes paranéoplasiques résultants principalement de tumeurs du poumon, du sein et de l'ovaire.

Informations concernant le test

Une petite proportion des patients ayant des syndromes néoplasiques, particulièrement ceux associés aux carcinomes à petites cellules du poumon et aux tumeurs de l'ovaire/ du sein, produit des autoanticorps qui réagissent non seulement avec leur propre tumeur mais aussi avec les tissus neuronaux. Les autoanticorps anti-cervelet peuvent aisément être détectés par immunofluorescence indirecte sur cervelet de rongeurs, de singe ou humain. Il existe deux groupes principaux d'anticorps, ceux qui marquent le cytoplasme des cellules de Purkinje et ceux qui marquent les noyaux des cellules de Purkinje et d'autres neurones. Il y a une grande variabilité à la fois dans le marquage et dans les signes cliniques mais l'identification d'un titre élevé d'anticorps chez des patients présentant des signes cliniques typiques est utile à la fois pour le diagnostic et le suivi clinique. Les anticorps peuvent parfois être trouvés en absence de tumeurs apparentes, aussi les résultats doivent toujours être considérés dans le contexte clinique total.

Principe du test

Ces coupes font appel à une technique d'immunofluorescence indirecte. Les sérums de patients et les contrôles appropriés sont incubés sur les coupes de tissus. Les anticorps non spécifiques sont éliminés par lavage. Un conjugué approprié marqué à la fluorescéine est appliqué. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et la lecture des lames s'effectue à l'aide d'un microscope à fluorescence. La positivité des échantillons se traduit par un marquage fluorescent des régions de la coupe de tissu sur lesquelles sont accrochés les autoanticorps.¹

Contenu du coffret

Les coupes de 4 puits de cervelet de singe sont emballées individuellement dans un sachet aluminium contenant un dessiccateur.

Avertissements/Précautions

Les échantillons testés pouvant être infectés, il est nécessaire de les manipuler avec précaution. Seul un personnel formé est autorisé à utiliser ce produit.

Conditions de conservation

Les étuis non ouverts doivent être stockés à 2-8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date de péremption. NE PAS CONGELER. Lorsque les lames sont sorties de leur étui, les utiliser IMMEDIATEMENT.

Echantillons

Prélever de façon stérile et par ponction veineuse un échantillon de sang. Laisser le sang coaguler à température ambiante, puis séparer le sérum du caillot dès que possible pour éviter l'hémolyse. Les sérums peuvent être conservés à 2-8°C pendant 7 jours avant les tests³ ou aliquotés et congelés à -20°C minimum pour une conservation plus longue. Ne pas congeler et décongeler les sérums plus d'une fois. Il est recommandé d'utiliser des sérums non lipidiques, non hémolysés et non contaminés par des bactéries, qui induiraient des titres faibles ou des aspects de marquage non clairs.

Procédure

Matériel fourni

1. **508357** 1 x 4 puits recouverts Cervelet de singe

Or

2. **508357.10** 10 x 4 puits recouverts Cervelet de singe

3. 1 x fiche technique

Autre matériel nécessaire non fourni

Tampon PBS comme diluant des échantillons et pour les lavages.

Récipient pour le tampon PBS.

Micropipettes et cônes pour le dépôt des échantillons.

Chambre humide pour les étapes d'incubation

Microscope à fluorescence avec un filtre excitant à 495nm et un filtre barrière à 515nm.

Flacon plastique pour le lavage initial en PBS.

D'autres réactifs peuvent être obtenus chez INOVA Diagnostics: tampon PBS (508002), contrôle négatif para Sistemas IFA (508186), contrôle positif ANNA-1 (504002), contrôle positif PCA-1 (504509), conjugué FITC IgG adsorbé sur singe (504011, 504071), bleu d'Evans à 1% (504049) et milieu de montage (508001, 508005, 508006).

Procédure

Contrôle de qualité

Les contrôles positifs et négatifs doivent être utilisés dans chaque série.

1. Milieu de montage : Sortir le milieu de montage du réfrigérateur pour qu'il atteigne la température ambiante (18-28°C) avant d'être utilisé.
2. Dilution des échantillons
Dépistage : Diluer les échantillons au 1/50 et 1/500 en ajoutant 10µL de sérum à 490µL de tampon PBS et 5µL de sérum à 2495µL de tampon PBS respectivement.
Titration : Faire une série de dilutions en tampon PBS sur les échantillons dépistés positifs (1/50, 1/100, 1/200, et 1/400).
Par exemple : Prendre 100µL de la dilution au 1/50 et mélanger avec 100µL de tampon PBS pour donner une dilution au 1/100 (répéter pour les dilutions suivantes).
3. Lames. Les ramener à température ambiante avant de les sortir de leur emballage. Les marquer puis les déposer dans une chambre humide. Déposer immédiatement 50-100µL de contrôles ou de sérum de patient dilué au 1/50 et 1/500.
4. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C).
5. Lavage en PBS. Sortir les lames de la chambre humide et les rincer rapidement à l'aide d'une pissette contenant du tampon PBS. Ne pas diriger le jet directement sur les puits. Mettre les lames sur un portoir et les immerger en PBS sous agitation lente pendant 5 à 10 minutes.
6. Conjugué fluorescent. Eliminer l'excès de PBS et sécher le pourtour des puits à l'aide de buvards ou de papier absorbant. Remettre les lames en chambre humide et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué fluorescent. **NE PAS LAISSER LES PUIITS A L'AIR PENDANT PLUS DE 15 SECONDES.** L'utilisation du conjugué adsorbé sur singe (504011, 504071) permet d'obtenir de meilleurs résultats.
7. Incubation des lames. Incuber les lames pendant 30 minutes en chambre humide à température ambiante (18-28°C). Recouvrir la chambre humide de papier pour éviter l'exposition à la lumière.
8. Lavage en PBS. Procéder comme à la section 5. Il est possible de contrecolorer les lames en ajoutant 2 à 3 gouttes de bleu d'Evans à 1% pour 100mL de PBS avant immersion des lames.
9. Montage des lames. Sortir les lames une à une du PBS. Sécher rapidement le pourtour des puits puis déposer une goutte de milieu de montage dans chaque puits. Déposer la lamelle en évitant la formation de bulles d'air. Ne pas essayer d'éliminer les bulles d'air éventuellement apparues. Essuyer l'excès de milieu de montage.
10. Lecture des lames. La lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. Les lames peuvent être stockées pendant 3 jours à 2-8°C à l'obscurité sans affecter l'intensité de la fluorescence.

Résultats

Contrôle de qualité

Un échantillon positif pour des autoanticorps anti-cellules de Purkinje doit donner un marquage fluorescent vert pomme dans le cytoplasme des cellules de Purkinje.

Un échantillon positif pour des autoanticorps anti-noyaux de neurones (ANNA-1) doit donner un marquage fluorescent granulaire vert pomme pour la plupart des noyaux des neurones du cervelet, y compris des cellules de Purkinje.

Un échantillon négatif doit montrer un marquage vert pâle sur toute la lame sans fluorescence franche.

Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrit ci-dessus, le test est invalide et doit être répété.

Interprétation des résultats

Pour visualiser une photographie couleur de cet aspect se reporter aux référence 2 Les résultats sont rendus positifs ou négatifs.

Il est recommandé, pour le dépistage des autoanticorps paranéoplasiques, que les échantillons donnant un résultat positif au 1/50 soient retestés au 1/500. Seuls des titres élevés supérieurs au 1/100 sont significatifs du point de vue clinique sur des tissus de cervelet de singe.

Note : Chaque laboratoire doit établir le seuil à partir duquel il y aura signification clinique.

Limites du test

1. La qualité des filtres, des optiques et de la source lumineuse peut influencer la sensibilité du test. Les performances du microscope sont dépendantes de la maintenance et plus particulièrement du centrage de la lampe à vapeur de mercure et de son changement après la période recommandée.
2. Ces lames n'ont pas été testées avec des réactifs d'autres fournisseurs mais ceci ne doit pas être nécessairement exclu.
3. Ce test ne constitue pas un diagnostic en soi. D'autres facteurs comme l'histoire clinique du patient et d'autres résultats sérologiques ou de biopsie doivent être pris en considération.

Références

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. Publ. 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.

Résumé de la procédure

1. Placer le milieu de montage à température ambiante.
2. Diluer le PBS dans de l'eau distillée.
3. Diluer les sérums au 1/50 et 1/500 dans du PBS.
4. Ramener les lames à température ambiante (18-28°C).
5. Déposer 50-100µL de contrôles positifs et négatifs et des sérums de patients dilués dans les puits.
6. Incuber 30 minutes en chambre humide.
7. Laver 5 à 10 minutes en tampon PBS.
8. Sécher autour des puits et couvrir immédiatement chaque puits avec une goutte de conjugué.
9. Incuber comme à l'étape 6.
10. Laver comme à l'étape 7.
11. Monter les lames.
12. Visualiser sous un microscope à fluorescence.

NOVA Lite est une marque déposée de INOVA Diagnostics, Inc

Copyright 2011 Tous droits réservés ©

Fabricant:

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

Représentant Autorisé:

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

628357FRA

January 2011
Revision 1

