

NOVA Lite® Cerebellum (Primate) Slides

Per uso diagnostico *In Vitro*

Solo per esportazione. Non autorizzato alla vendita negli Stati Uniti.

Codice Prodotto: 508357, 508357.10

Complessità CLIA: elevata

Finalità d'uso

Le sezioni di cervelletto di scimmia vengono utilizzate nei dosaggi in immunofluorescenza indiretta (IFA), per lo screening degli anticorpi anti-cellule del Purkinje ed altri neuroni cerebellari circolanti nel siero umano, come sussidio nella diagnosi di alcune sindromi paraneoplastiche, che originano principalmente da carcinomi polmonari, tumori al seno e tumori dell'ovaio.

Riassunto e Spiegazione del test

Una piccola percentuale dei pazienti con sindromi paraneoplastiche, in particolar modo quelli associati a carcinomi polmonari a piccole cellule nonché ai tumori al seno o all'ovaio, producono autoanticorpi che reagiscono non solamente con la loro forma tumorale, ma anche con tessuti neuronali. Gli autoanticorpi anti-cervelletto sono evidenziabili mediante immunofluorescenza indiretta nel cervelletto umano, di scimmia o di roditori. Esistono due principali gruppi di anticorpi, quelli che colorano il citoplasma delle cellule del Purkinje e quelli che colorano i nuclei delle cellule del Purkinje ed altri neuroni. Esiste una considerevole variabilità, sia nella colorazione che nelle caratteristiche cliniche. Tuttavia, l'identificazione di elevati titoli anticorpali nei pazienti che rientrano nella descrizione clinica assume una certa importanza sia in termini diagnostici che nella gestione della patologia. Talvolta gli anticorpi possono essere riscontrati in assenza di tumori apparenti. I risultati vanno quindi valutati in base al quadro clinico globale.

Principio della Metodica

Viene impiegata una tecnica di immunofluorescenza indiretta in cui i campioni dei pazienti e i relativi controlli sono incubati sui vetrini con le sezioni. Gli anticorpi non specifici sono eliminati con il lavaggio, quindi viene applicato un coniugato fluoresceinato. I vetrini vengono poi lavati per eliminare il coniugato non legato. Per la lettura dei vetrini si utilizza un microscopio a fluorescenza. I campioni positivi presentano una fluorescenza di colore verde brillante che corrisponde alle aree della sezione dove l'autoanticorpo si è legato.¹

Reagenti

Sezioni di cervelletto di scimmia su vetrini da 4 pozzetti avvolti singolarmente in un involucro contenente agente essiccante

Avvertenze/Precauzioni

I prelievi di sangue devono essere effettuati per via venosa. Lasciare che il sangue si coaguli in modo naturale. Separare il siero il più rapidamente possibile onde evitare l'emolisi. Il siero può essere conservato a 2-8°C per un massimo di 7 giorni prima del dosaggio³, oppure per periodi più lunghi, aliquotare e conservare a -20°C o temperature inferiori. NON congelare e scongelare più di una volta. Evitare l'uso di sieri lipemici, emolizzati o contaminati da batteri in quanto si potrebbero avere titoli più bassi o pattern di colorazione non chiari.

Condizioni di conservazione

I vetrini non aperti devono essere conservati a 2-8°C e possono essere usati fino alla data di scadenza indicata. NON CONGELARE. Una volta estratti dal loro involucro, i vetrini devono essere usati immediatamente.

Raccolta dei campioni

I prelievi di sangue devono essere effettuati per via venosa. Lasciare che il sangue si coaguli in modo naturale. Separare il siero il più rapidamente possibile onde evitare l'emolisi. Il siero può essere conservato a 2-8°C per un massimo di 7 giorni prima del dosaggio³, oppure per periodi più lunghi, aliquotare e conservare a -20°C o temperature inferiori. NON congelare e scongelare più di una volta. Evitare l'uso di sieri lipemici, emolizzati o contaminati da batteri in quanto si potrebbero avere titoli più bassi o pattern di colorazione non chiari.

Procedura

Materiali forniti

1. **508357** 1 - Vetrini con 4 pozzetti con cervelletto di scimmia
Or
2. **508357.10** 10 - Vetrini con 4 pozzetti con cervelletto di scimmia
3. Scheda tecnica

Materiale necessario ma non fornito

PBS per diluire i campioni e per i lavaggi

Recipiente per contenere il PBS

Micropipette e puntali monouso per dispensare i campioni dei pazienti

Camera umida per le fasi d'incubazione

Microscopio a fluorescenza con filtro a 495nm (exciter) e filtro a 515nm (barrier).

Bottiglia di plastica a pressione per lavaggio iniziale in PBS

È possibile ottenere da INOVA Diagnostics alcuni componenti aggiuntivi: il PBS (508002), il Controllo Negativo Sistemi IFA (508186), il controllo positivo per ANNA-1 (504002), il controllo positivo per PCA-1 (504509), il coniugato IgG (H&L) adsorbito con tessuto di scimmia (504011, 504071), la soluzione di montaggio (508001, 508005, 508006) e la soluzione Blu di Evans all'1% (504049).

Procedura

Controllo qualità

I controlli negativi e positivi devono essere usati ogni volta che sono dosati i campioni.

1. Soluzione di montaggio: Togliere la soluzione di montaggio dal frigorifero per portarla a temperatura ambiente (18-28°C) prima dell'uso.
2. Diluire i campioni dei pazienti
Screening: Diluire i campioni 1/50 aggiungendo 10µL di siero a 490µL di PBS e 1/500 aggiungendo 5µL di siero a 2495µL di PBS.
Titolazione: Effettuare diluizioni seriali dei campioni positivi con PBS (1/50, 1/100, 1/200, 1/400 ecc.).
Per esempio: Prendere 100µL della diluizione 1/50 e diluire con 100µL di PBS per ottenere una diluizione 1/100. Ripetere questa procedura per ulteriori diluizioni.
3. Vetrini con substrato. I vetrini devono raggiungere la temperatura ambiente (18-28°C) prima di essere tolti dalla confezione. Etichettare correttamente i vetrini, metterli nella camera umida e aggiungere il controllo positivo e negativo nei rispettivi pozzetti. Aggiungere 50-100µL dei campioni diluiti nei pozzetti rimanenti.
4. Incubazione vetrini. Incubare i vetrini per 30 minuti in camera umida a temperatura ambiente (18-28°C).
5. Lavaggio PBS. Togliere i vetrini dalla camera umida e risciacquarli brevemente con il PBS in una bottiglia di plastica a pressione. Non spruzzare direttamente nei pozzetti. Posizionare i vetrini in un rack e immergerli nel PBS, poi agitare per 5-10 minuti.
6. Aggiunta del coniugato fluorescente. Eliminare l'eccesso di PBS e asciugare intorno ai pozzetti con le carte assorbenti fornite. Riportare i vetrini nella camera umida e coprire immediatamente ogni pozzetto con una goccia di coniugato fluorescente diluito. **NON LASCIARE I POZZETTI SCOPERTI PER OLTRE 15 SECONDI.** L'essiccamento del substrato compromette seriamente i risultati. L'uso di un coniugato adsorbito con tessuto di scimmia (p.es. 504011, 504071) potenzierà notevolmente i risultati.
7. Incubazione vetrini. Incubare i vetrini per 30 minuti in camera umida a temperatura ambiente (18-28°C) al buio.
8. Lavaggio con PBS. Lavare nuovamente e asciugare come nella fase 5. **COLORAZIONE DI CONTRASTO OPZIONALE.** Aggiungere 2-3 gocce di Blu di Evans all'1% per 100mL di PBS prima di immergere i vetrini.
9. Montaggio con il vetrino coprioggetti. Rimuovere un vetrino alla volta dal lavaggio PBS. Asciugare rapidamente intorno ai pozzetti e aggiungere una goccia della soluzione di montaggio in ciascun pozzetto. Mettere con cura il vetrino sul vetrino coprioggetti, evitando le bolle d'aria, ma se ci sono non tentare di rimuoverle. Rimuovere la soluzione di montaggio in eccesso intorno al bordo del vetrino coprioggetti.
10. Lettura dei vetrini con il microscopio a fluorescenza. I vetrini possono essere conservati a 2-8°C al buio fino a 3 giorni, senza una significativa perdita di fluorescenza.

Risultati

Controllo qualità

Un siero con autoanticorpi anti-cellule del Purkinje deve presentare una fluorescenza color verde brillante nel citoplasma delle cellule del Purkinje.

Un siero con autoanticorpi ANNA-1 deve presentare una fluorescenza granulare color verde brillante della maggior parte dei nuclei neuronali nel cervelletto, comprese le cellule del Purkinje.

Il controllo negativo deve presentare una colorazione verde scura in tutto il tessuto, senza fluorescenza visibile.

Se i controlli non risultano come sopra descritto, il test non è valido e deve essere ripetuto.

Interpretazione dei risultati

Vedi i riferimento 2 per un esempio fotografico a colori del pattern. I risultati vengono descritti come positivi o negativi. Nello screening degli autoanticorpi paraneoplastici, si raccomanda di ripetere il dosaggio dei pazienti che danno un risultato positivo 1/50 anche alla diluizione 1/500. Infatti vengono normalmente considerati clinicamente significativi solamente i titoli più elevati (>1/100) su tessuto di cervelletto di scimmia.

NB: Ogni laboratorio deve stabilire a che punto un risultato positivo è considerato clinicamente significativo.

Limitazioni del test

1. La fonte luminosa, i filtri e l'ottica dei microscopi a fluorescenza di diverse marche influiranno sulla sensibilità del kit. La performance del microscopio è influenzata notevolmente da una corretta manutenzione, e in particolare dalla centratura e dalla sostituzione della lampada a vapori di mercurio dopo il periodo di tempo consigliato.
2. L'idoneità all'uso del kit con reagenti IFA di altri fabbricanti non è stata valutata ma l'uso con tali reagenti non deve essere necessariamente escluso.
3. Questo test da solo non permette la formulazione di una diagnosi. E' necessario prendere in considerazione tutti gli altri fattori compresa l'anamnesi clinica dei pazienti e altri risultati sierologici o della biopsia.

Bibliografia

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.

Riassunto del metodo

1. Portare la soluzione di montaggio a temperatura ambiente.
2. Diluire il PBS con acqua distillata.
3. Diluire i sieri dei pazienti 1/50 e 1/500 con PBS.
4. Portare i vetrini a temperatura ambiente (18-28°C).
5. Dispensare 50-100µL dei controlli positivi e negativi e dei sieri dei pazienti diluiti nei rispettivi pozzetti.
6. Incubare in camera umida per 30 minuti.
7. Lavare per 5-10 minuti in PBS.
8. Asciugare bene intorno ad ogni pozzetto e coprire immediatamente ogni pozzetto con una goccia di coniugato.
9. Incubare come nella fase 6 al buio.
10. Lavare come nella fase 7 e asciugare.
11. Montare.
12. Leggere il vetrino con il microscopio a fluorescenza.

NOVA Lite è un marchio registrato di INOVA Diagnostics, Inc.

Copyright 2011 Tutti i diritti riservati ©

Fornitore:

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

Rappresentante Autorizzato:

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

628357ITA

January 2011
Revision 1

