

## ANTI-ADRENAL ANTIBODY TEST SYSTEM

For In Vitro Diagnostic Use

AD AMC48 48 Tests  
AD AMC96 96 Tests

### Introduction:

Adrenal antibodies are associated with the idiopathic form of Addison's Disease, and are more common in males than females. Early detection of auto-antibodies in patient with sub-clinical Adrenal deficiency who develop an adrenal crisis during infection or appendicitis, can be life saving. Cases have been noted where young patients with unsuspected Addison's disease have died before a diagnosis had been reached. Many patients with adrenal antibodies also have an overlap of additional diseases such as thyroid disease, insulin-dependent diabetes, and secondary amenorrhoea. Screening for adrenal antibodies in these circumstances could be very beneficial as very low incidence of adrenal antibody are found in normals.

### Materials Provided:

Storage & Stability of Components:

- FITC IgG (H&L) Conjugate No. AD CGEM2 (3.0 ml) with Evans Blue Counterstain is to be stored at 2-8°C upon receipt. The conjugate is stable at this temperature until expiration date on the vial label.
  - The antigen slides of monkey adrenal sections must be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
  - Universal negative control No. AD NC (1.0 ml) should be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
  - Buffer Pack No. AD PBS1 - Phosphate Buffered Saline is stable at room temperature storage to the expiration date indicated on the label. The reconstituted Buffer does not contain preservatives and should be stored at 2-8°C. Care should be taken to avoid contamination.
  - Mounting Medium No. AD TMM3 is stable when stored at 2-8°C. Check label for specific expiration date.
- Note: All kit components are available separately. Please see the current ALPHADIA Catalog for more details.

### Additional Materials Required but not Provided:

Test tubes and rack or microtiter system  
Disposable pipettes  
Staining Dish and Slide Forceps  
Moisture Chamber  
Volumetric Flask (500 ml)  
Distilled H<sub>2</sub>O  
Fluorescence Microscope  
Paper Towels - lint free

### Reagent Preparation:

- Buffer Pack No. AD PBS1. Rehydrate buffer with 1 liter of sterile distilled water.

### Specimen Collection:

Serological specimens should be collected under aseptic conditions. Hemolysis is avoided through prompt separation of the serum from the clot. Serum should be stored at 2-8°C if it is to be analyzed within a few days. Serum may be held for 3 to 6 months by storage at -20°C or lower. Lipemic and strongly hemolytic serum should be avoided. When specimens are shipped at ambient temperatures, addition of a preservative such as 0.095% sodium azide is strongly recommended.

### Test Instruction:

**Screening:** dilute test sera 1:4 in PBS. **Titration:** set up doubling dilutions of serum starting at 1:4, 1:8 1:16, 1:32, etc.)

- Once slides reach room temperature tear slide envelope at notch. Carefully remove the slide and avoid touching the antigen areas. The slide is now ready to use.
- Place a drop of diluted serum (20 to 30 µl) and control over the antigen wells.
- Place slide with patient's serum and controls in a moist chamber for 30 minutes at room temperature (approximately 24°C).
- Remove slide from moisture chamber and allow the serum to run off onto a piece of paper towel. Using a wash bottle, gently rinse remaining sera from slide being careful not to aim the rinse stream directly on to the well.
- Wash in PBS for five minutes. Repeat using fresh PBS.
- Place a blotter on the lab table with absorbent side up. Remove slide from PBS and invert so that tissue side faces absorbent side of blotter. Line up wells to blotter holes. Place slide on top of blotter. **Do not allow tissue to dry.** Wipe back of slide with dry lint free paper towel. Apply sufficient pressure to slide while wiping to absorb buffer.
- Deliver 1 drop (25-30 µl) of conjugate per antigen well. Repeat steps 3-6.
- Place 4-5 drops of mounting medium on slide.
- Apply a 22 x 70 mm coverslip. Examine the slide under a fluorescent microscope. Note: To maintain fluorescence, store mounted slide in a moisture chamber placed in a dark refrigerator.

### Results:

A positive results is observed as a bright 3-4+ staining. This antibody is associated with Addison's disease and may be significant in the patient profile, as well as aid in the diagnosis and prognosis.

### Quality Control:

- Positive and negative serum controls must be included in each day's testing to confirm reproducibility, sensitivity and specificity of the test procedure.
- The negative serum control should result in little (1+) or no fluorescence. If this control shows bright fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
- In addition to positive and negative serum controls, a PBS control should be run to establish that the conjugate is free from nonspecific staining of the antigen substrate. If the antigen shows bright fluorescence in the PBS control repeat using fresh conjugate. If the antigen still fluoresces, either the conjugate or antigen may be at fault.


### Precautions:


- All human components have been tested by for (HBsAg) and HTLVIII/LAV by an FDA approved method and found to be negative. (Not repeatedly reactive). However, this does not assure the absence of HBsAg or HTLVIII/LAV. All human components should be handled with appropriate care.
- The sodium azide (0.095%) included in the controls and conjugate is toxic if ingested.
- Do not use components beyond their expiration date.
- Follow the procedural instructions exactly as they appear in this insert to insure valid results.
- For In Vitro Diagnostic Use.
- Handle slides by the edges since direct pressure on the antigen wells may damage the antigen.
- Once the procedure has started do not allow the antigen in the wells to dry out. This may result in false negative test results, or unnecessary artifacts.
- Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.
- Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
- Do not reuse slides.

### Bibliography:


- Doniach, D., Bottazzo, G.: Autoimmune Endocrine Disorders, Hsop Update 9(10): 6, 1983.
- Doniach, D., Bottazzo, G.: Polyendocrine autoimmunity, In: Franklin, E., ed. Clinical Immunology Update, Holland Elsevier, p. 95-121, 1981.

### US

<b>Component</b>	AD PBS1 PBS Powder Packets AD TMM3 Mounting Medium	<b>Precautionary Statement</b> <b>Prevention:</b> • Wash thoroughly after handling. • Wear eye/face protection
<b>Pictogram</b>		<b>Response:</b> • IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. • If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
<b>Signal Word</b>	<b>WARNING</b>	
<b>Hazard Statement</b>	Causes serious eye irritation.	<b>Storage/Disposal:</b> • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

<b>Component</b>	AD CGEM2, AD CGEM5 FITC (IFA) Conjugate with Evans Blue Counterstain AD CAM2 FITC IgA Conjugate	<b>Precautionary Statement</b> <b>Prevention:</b> • Wash thoroughly after handling. • Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection
<b>Pictogram</b>		<b>Response:</b> • IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. Take off contaminated clothing and wash before reuse. • Specific treatment, see supplemental first aid information. • If skin irritation occurs, get medical advice/attention • IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. • If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
<b>Signal Word</b>	<b>WARNING</b>	
<b>Hazard Statement</b>	Causes skin irritation. Causes serious eye irritation.	<b>Storage/Disposal:</b> • Dispose of content and/or container in accordance with local, regional, national, and/or international regulations.

### EU

<b>Component</b>	AD PBS1 PBS Powder Packets ADF TMM3 Medium Mounting	<b>Precautionary Statement</b> <b>Prevention:</b> P264 Wash thoroughly after handling. P280 Wear protective gloves and clothing.
<b>Pictogram</b>		<b>Response:</b> P305+P351+P338 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses if easy to do. Continue rinsing.
<b>Signal Word</b>	<b>WARNING</b>	
<b>Hazard Statement</b>	H319 Causes serious eye irritation	P337+P313 If irritation persists, get medical advice/attention.

**ALPHADIA sa/nv**  
DIAGNOSTIC PRODUCTS  
Avenue Vésale 26  
B1300 WAVRE  
BELGIUM  
TEL : 32 (0) 10 24 26 49  
FAX : 32 (0) 10 24 55 99  
contact@alphadia.be



<b>EC</b>	<b>REP</b>	Emergo Europe Prinsessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	---



**L'italiano**

**ANTI-ADRENAL ANTIBODY TEST SYSTEM**

Per uso diagnostico *in vitro*.

AD AMC48 48 Tests  
AD AMC96 96 Tests

**Introduzione:**

Gli autoanticorpi anti ghiandola adrenale sono associati con una forma idiopatica del morbo di Addison e sono più comuni nei maschi che nelle femmine. La rilevazione precoce degli autoanticorpi nei pazienti con una deficienza sub clinica di ghiandola adrenale, che sviluppano una crisi adrenale durante un'infezione o un'appendicite, può essere salva vita. Si sono osservati casi di giovani pazienti senza sintomi riconducibili alla malattia di Addison, che sono morti prima di raggiungere una diagnosi. Molti pazienti con anticorpi anti-adrenale hanno anche una sovrapposizione con altre malattie come la malattia della tiroide, il diabete insulino-dipendente e amenorrea secondaria. Lo screening per anticorpi anti ghiandola adrenale in queste circostanze potrebbe essere molto utile, in quanto nei pazienti normali l'incidenza di anticorpi anti surrenale è molto bassa.

**Materiali forniti:**

Conservazione e stabilità dei singoli componenti:

1. Coniugato FITC IgG H&L N° AD CGEM2 (3,0 ml) con Blu di Evans deve essere conservato a 2-8 °C fin dal momento del ricevimento. Il coniugato è stabile a questa temperatura fino alla data di scadenza sull'etichetta del flacone.
2. I vetrini con adese le sezioni di ghiandola surrenale di scimmia devono essere conservati a 2-8 °C o ad una temperatura più bassa fin dal momento del ricevimento. Controllare l'etichetta per la specifica data di scadenza.
3. Il controllo Universale negativo N°. AD NC (1,0 ml) deve essere conservato a 2-8 °C fin dal momento del ricevimento. Controllare l'etichetta per la specifica data di scadenza.
4. Confezione tampone PBS N°. AD PBS1 – La soluzione tampone fosfato è stabile fino a temperatura ambiente. Il tampone ricostituito non contiene conservanti e deve essere conservato a 2-8 °C. Si deve prestare molta attenzione per evitare la contaminazione.
5. Mezzo di montaggio N°. AD TMM3 è stabile se conservato a 2-8 °C. Controllare l'etichetta per la specifica data di scadenza.  
Nota: Tutti i componenti del kit sono disponibili separatamente. Si prega di consultare il catalogo del distributore locale.

**Ulteriori materiali necessari ma non forniti:**

- Provette e rack o sistema microliters
- Pipette monouso
- Contenitore per la colorazione e pinze per vetrini.
- Camera oscura.
- Matriaccio tarato (500 ml)
- Acqua distillata
- Microscopio a fluorescenza
- Tovaglioli di carta.

**Preparazione dei reagenti:**

1. Buffer Pack N°. AD PBS1. Reidratare la polvere con un litro di acqua distillata.

**Raccolta dei campioni:**

I campioni devono essere raccolti in condizioni asettiche. L'emolisi viene evitata grazie ad una pronta separazione del siero dal coagulo. Il siero deve essere conservato a 2-8°C se è da analizzare entro pochi giorni. Deve essere mantenuto a -20°C se lo si vuole conservare per tre-sei mesi. Sono da scartare sieri lipemici e fortemente emolitici. Quando i campioni sono trasportati a temperatura ambiente è vivamente consigliata l'aggiunta di un conservante quale timerosal 0,01% o sodio azide 0,095%.

**Istruzioni per il test:**

**Screening:** diluire i sieri da testare 1:4 in PBS.

**Titolazione:** approntare diluizioni al raddoppio a: 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, ecc..

1. Una volta che i vetrini hanno raggiunto la temperatura ambiente, strappare la bustina del vetrino a livello dell'incisione sulla confezione. Rimuovere il vetrino dalla busta, evitando di toccare i pozzetti con l'antigene. Il vetrino è ora pronto all'uso.
2. Mettere una goccia (20-30 µl) del siero diluito da testare e dei controlli su ciascun pozzetto con l'antigene.
3. Incubare in camera umida per 30 minuti a temperatura ambiente (circa 24°C).
4. Al termine dell'incubazione eliminare delicatamente i sieri dal vetrino. Lavare il vetrino con una spruzzetta contenente PBS, avendo cura di non dirigere il getto direttamente sul pozzetto.
5. Immergere i vetrini in una vaschetta contenente PBS per cinque minuti. Ripetere il lavaggio con PBS fresco.
6. Porre una maschera di carta bibula sul tavolo di laboratorio con il lato assorbente rivolto verso l'alto. Rimuovere il vetrino dal PBS e posizionarlo capovolto sulla maschera di carta bibula, facendo combaciare i pozzetti con i fori della maschera. NON LASCIARE ASCIUGARE I TESSUTI. Asciugare il retro del vetrino con carta bibula applicando una leggera pressione.
7. Mettere una goccia (25-30 µl) di coniugato per pozzetto. Ripetere le operazioni dal punto 3 al punto 6.
8. Mettere 4-5 gocce di mounting medium sul vetrino.
9. Applicare il vetrino coprioggetti 22 x 70 mm ed esaminare ad un microscopio a fluorescenza.  
NOTA: per conservare la fluorescenza mantenere il vetrino in camera umida, in frigorifero ed al buio.

**Risultati**


Un risultato positivo è dato da una fluorescenza pari a 3-4+ . La presenza di questi anticorpi è associata con la malattia di Addison e sono molto utili nella classificazione del paziente così come sono di aiuto nella diagnosi e nella prognosi della malattia.

**Controllo Qualità:**

1. I controlli positivi e negativi devono essere inclusi in ogni serie di test giornalieri allo scopo di confermare riproducibilità, sensibilità e specificità del test.
2. I sieri di controllo negativi dovrebbero risultare in un basso positivo (1+) o assenza di fluorescenza. Se questo controllo mostra fluorescenza intensa c'è un problema sul controllo o sull'antigene, o sul coniugato o nell'esecuzione del test.
3. Il controllo positivo dovrebbe avere una fluorescenza paragonabile al 3+/4+. Se questo controllo mostra fluorescenza bassa c'è un problema sul controllo, o sull'antigene, o sul coniugato o nell'esecuzione del test.
4. In aggiunta ai sieri di controllo positivi e negativi, deve essere processato un controllo PBS per stabilire che il coniugato sia libero da colorazioni non specifiche. Se gli antigeni dell'epidermide formano una forte fluorescenza nel controllo PBS, ripetere usando coniugato fresco. Se l'antigene rimane fluorescente c'è un problema sul coniugato o sull'antigene.

**Precauzioni:**

1. Tutti i componenti umani sono stati testati con il metodo RIA per (HB<sub>s</sub>Ag) e HTLVIII/LAV attraverso un metodo certificato FDA e sono risultati negativi. Ciononostante questo non assicura l'assenza di HB<sub>s</sub>Ag o HTLVIII/LAV. Tutti i componenti umani devono essere maneggiati con le opportune attenzioni.
2. L'azoturo di sodio (0,095%) contenuto nei controlli e coniugati è tossico se ingerito.
3. Non usare i componenti dopo la data di scadenza.
4. Seguire in maniera rigorosa le procedure inserite nel foglio di istruzioni per assicurare risultati validi.
5. Per uso diagnostico *in vitro*.
6. Maneggiare i vetrini per i bordi poiché la pressione diretta sui pozzetti dell'antigene può danneggiare l'antigene.
7. Una volta iniziata la procedura non far seccare l'antigene nei pozzetti. Ciò potrebbe dare risultati falsi negativi.

<b>Componente</b>	AD PBS1 PBS Confezione tampone AD TMM3 Mezzo di montaggio	<b>Consiglio di prudenza</b> <b>Prevenzione:</b> P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. <b>Risposta:</b> P305+P351+P338 IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. P337+P313 Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
<b>Pittogramma</b>		
<b>AVVERTENZA</b>	<b>ATTENZIONE</b>	
<b>Indicazione di Pericolo</b>	H319 Provoca grave irritazione oculare.	



**ALPHADIA sa/nv**  
DIAGNOSTIC PRODUCTS  
Avenue Vésale 26  
B1300 WAVRE  
BELGIUM  
TEL : 32 (0) 10 24 26 49  
FAX : 32 (0) 10 24 55 99  
contact@alphadia.be



<b>EC</b>	<b>REP</b>
-----------	------------

Emergo Europe  
Prinsessegracht 20  
2514 AP The Hague  
The Netherlands



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
<b>REF</b>	Catalog number Numero di catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
<b>LOT</b>	Lot Lotto Lote Lot Charge
<b>EC REP</b>	EC Authorized Representative Rappresentante Autorizzato CE Representante Autorizado CE CE Représentant autorisé EG autorisierter Bevollmächtigter
	EC Declaration of Conformity Dichiarazione di Conformità CE Declaración de Conformidad CE CE Déclaration de Conformité EG Konformitätserklärung
	Number of tests Numero di test Número de determinaciones Nombre de tests Anzahl der Teste
	See instructions for use Vedere le istruzioni per l'uso Consultar la instrucciones de uso Voir instructions Gebrauchsanweisung beachten
	Expiration date Data di scadenza Caducidad Date d'Expiration Halbbarkeitsdatum
	Store at 2-8 C / 35-46 F Conservare a 2-8°C/35-46 F Almacenar a 2-8°C / 35-46°F Conserver à 2-8°C Bei 2-8°C / 35-46°F lagern
	Caution Attenzione Precaución Précautions Achtung
	Potential biological risk Potenziale rischio biologico Riesgo potencial biológico Biohazard Risque Biologique Potentiel Potentielle biologische Gefährdung
<b>RFU</b>	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig
<b>IVD</b>	For in vitro diagnostic use Per uso diagnostico <i>in vitro</i> Para uso solo in vitro Usage in vitro Für in-vitro diagnostische Verwendung
<b>RUO</b>	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
<b>IUO</b>	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
<b>IFA/DFA</b> <b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate salin PBS
<b>SOR</b>	Sorbent Assorbent Sorbente Absorbant Sorbens

<b>SLIDE</b>	Tissue Substrate Slide Vetrini con substrate di tessuto Porto objetos de Sustrato de Tejido Lame portant le substrat tissulaire Gewebesubstrat-Objekträger
<b>MM</b>	Mounting Medium Mezzo di montaggio Medio de Montaje Liquide de montage Eindeckmedium
<b>10x</b>	Concentration Concentrazione Concentración Concentration Konzentration
<b>ENS</b>	Enhancement solution Soluzione di rinforzo Solución de realce Solution d'amplification Verstärkungslösung
<b>WASHB</b>	Wash Buffer Tampone di lavaggio Tampón de lavado Tampon de lavage Waschpuffer
<b>MPS 12x8</b>	Microplate Strips Strip per Micropiastra Tiras de micro placa Microplaque Mikrotiterplattenstreifen
<b>CONJ</b>	Conjugate Coniugato Conjugado Conjugué Konjugat
<b>SUB</b>	Substrate Substrato Sustrato Substrat Substrat
<b>STOP</b>	Stop Solution Soluzione bloccante Solución de Parada Solution d'arrêt Stopplösung
<b>CAL X</b>	Calibrator(s) Calibratore (i) Calibrador (s) Calibrateur(s) Kalibrator(en)
<b>CONTROL -</b>	Negative Control Controllo Negativo Control Negativo Contrôle Négatif Negative Kontrolle
<b>CONTROL +</b>	Positive Control Controllo Positivo Control Positivo Contrôle Positif Positive Kontrolle
<b>CONJ</b> <b>CNS</b>	Counterstain Colorante di contrasto Contraste Contre colorant Gegenfärbung
<b>CS</b>	Coverslip Coprioggetto Cubre portaobjetos Lamelles couvre-objet Deckgläser
<b>CONJ</b> <b>+</b>	Positive Conjugate Coniugato Positivo Conjugado Positivo Conjugué Positif Positivekonjugat
<b>CONJ</b> <b>-</b>	Negative Conjugate Coniugato Negativo Conjugado Negativo Conjugué Négatif Negativkonjugat
<b>DIL</b>	Sample Diluent Diluyente del campione Diluyente de muestra Tampon de dilution Probenverdünnungslösung