

ISLET CELL ANTIBODY TEST SYSTEM

For In Vitro Diagnostic Use

AD IMP48 48 Tests
AD IMP96 96 Tests

Introduction

Islet Cell antibodies have been associated with a group of "Autoimmune" endocrine disorders, more specifically with insulin dependent diabetes. Organ-specific autoimmunity (AI) is characterized by the presence of antibodies in patients that can be detected years before the onset of the clinical symptoms.¹ These antibodies are useful monitors to detect well before metabolic test can detect hormonal deficiencies. The situation becomes far more complex in the case of "stimulating" antibodies that produce hormonal excess, and hormonal receptor antibodies.

Patients with autoimmune thyroiditis, adrenalitis or gastritis have an increased risk of developing insulin dependent diabetes at any age. Overlapping of antibodies is one of the most important features in this group of disorders (AI).¹ The extreme being "polyendocrine" syndromes where all the endocrine glands may be involved in the same patient. Since the discovery of the islet-cell antibodies in insulin dependent diabetes (IDDM) there has been growing interest as to their significance. Overlapping between disorders has been recognized clinically for over 60 years, with the need to screen for these antibodies gaining more attention. So far, islet cell antibodies have only been detected in association with overt autoimmunity, almost exclusively in insulin dependent diabetes, sometimes before onset as well as after the patient has been diagnosed. In these cases, single or polyglandular autoimmune disease coexists.² This discovery lends strong credence to the concept of a true form of autoimmune diabetes mellitus. These islet cell antibodies may prove to be a marker for identifying autoimmune diabetes.^{1,2}

Materials Provided:

Storage & Stability of Components:

1. FITC IgG H&L Conjugate No. AD CGEM2 with Evans Blue (3.0 ml) is to be stored at 2-8°C upon receipt. The conjugate is stable at this temperature until expiration date on the vial label.
2. The antigen slides of primate pancreas sections must be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
3. Islet Cell positive control No. AD PCIL (0.5 ml) should be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
4. Universal negative control No. AD NC (1.0 ml) should be stored at 2-8°C upon receipt. Check label for specific expiration date.
5. Buffer Pack No. AD PBS1 - Phosphate Buffered Saline is stable at room temperature storage. Check label for specific expiration date. The reconstituted Buffer does not contain preservatives and should be stored at 2-8°C. Care should be taken to avoid contamination.
6. 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 Corporation 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 H₂O
Fluorescence Microscope
Paper Towels - lint free

Reagent Preparation:

1. 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 0.01% (thimerosal) or 0.095% sodium azide is strongly recommended.

Test Instruction:

Screening: dilute test serums 1:4 in PBS.

Titration: set up doubling dilutions of serum starting at 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.

1. 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.
2. Place a drop of diluted serum (20 to 30 µl) and controls over the antigen wells.
3. Place slide with patient's serum and controls in a moist chamber for 30 minutes at room temperature (approximately 24°C).
4. 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.
5. Wash in PBS for five minutes. Repeat using fresh PBS.
6. 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.
7. Deliver 1 drop (25-30 µl) of conjugate per antigen well. Repeat steps 3-6.
8. Place 4-5 drops of mounting medium on slide.
9. 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.

Quality Control:

1. Positive and negative serum controls must be included in each day's testing to confirm reproducibility, sensitivity and specificity of the test procedure.

2. The negative serum control should result in little (+) or no fluorescence. If this control shows bright fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
3. The positive serum control should result in bright 3+ to 4+ fluorescence. If this control shows little or no fluorescence, either the control, antigen, conjugate or technique may be at fault.
4. 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.

Results:


Cytoplasmic immunofluorescence of the Islet Cells can be observed. The staining of the Islet cells may become more visible on titration. Due to overlapping autoimmune responses, the islet cell may appear masked at the lower screening dilution.

Limitations of Procedure

1. No diagnosis should be based on a single serologic test since various host factors must be taken into consideration.
2. This test is for In Vitro Diagnostic Use.

Precautions

1. All human components have been tested by radioimmunoassay for (HB_sA_g) and HTLVIII/LAV by an FDA approved method and found to be negative. (Not repeatedly reactive). However, this does not assure the absence of HB_sA_g or HTLVIII/LAV. All human components should be handled with appropriate care.
2. The sodium azide (0.095%) included in the controls and conjugate is toxic if ingested.
3. Do not use components beyond their expiration date.
4. Follow the procedural instructions exactly as they appear in this insert to insure valid results.
5. Handle slides by the edges since direct pressure on the antigen wells may damage the antigen.
6. 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.
7. Use separate pipette tips for each sample and reagent to avoid cross contamination.
8. Reagents should be inspected for evidence of bacterial or fungal contamination.
9. Do not reuse substrate slide.

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

BIBLIOGRAPHY:

1. Dornach, D.: Autoimmune Endocrine disorders: Hospital Update, Volume 9, No. 10 October 1983.
2. MacCuish, A.C., Irvine, W.J., Barnes, E.W., Ducan, L.J.P.: Antibodies to Pancreatic Islet Cells in Insulin-Dependent Diabetes with Coexistent Autoimmune Disease. The Lancet, Saturday, December 28th 1974.

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



EC	REP	Emergo Europe Princessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	---



ISLET CELL ANTIBODY TEST SYSTEMRéservé au diagnostic *in vitro*.
 AD IMP48 48 Tests
 AD IMP96 96 Tests
Intitulé du test:

Test de détection des anticorps anti-îlots de Langerhans par IFI

Application:

Test d'immunofluorescence indirecte pour la détection des anticorps anti-îlots de Langerhans dans le sérum de patients.

Principe:

La principale réaction du test implique des anticorps circulant dans le sérum du patient qui s'attachent à leurs antigènes homologues. Ceci se produit pendant la période d'incubation alors que le sérum recouvre la surface de l'antigène. Une réaction secondaire suit alors une période de rinçage qui élimine tous les anticorps humains libres. Le réactif utilisé lors de la réaction secondaire est un conjugué d'anti-globuline humaine marquée à la fluorescéine. La surface de l'antigène est ensuite soigneusement rincée pour éliminer l'excès de conjugué libre, et visualisée sous un microscope à fluorescence adapté.

Matériel fourni:

Conservation et stabilité des composants

1. Lames d'antigènes de pancréas de singe (conserver entre 2 - 8 °C).
2. Contrôle îlots de Langerhans positif (conserver entre 2 - 8 °C).
3. Contrôle négatif universel (conserver entre 2 - 8 °C).
4. Conjugué ITCF anti-IgG H&L avec Bleu d'Evans (conserver entre 2 - 8 °C). No AD CGEM2
5. Sachet de tampon No AD PBS1 - Tampon phosphate salin (tampon reconstitué qui ne contient pas d'agents conservateurs et doit être conservé entre 2 - 8 °C).
6. Le liquide de montage No AD TMM3 est stable lorsqu'il est conservé entre 2 - 8 °C.

Matériel supplémentaire requis mais non fourni:
 Tubes à essai et portoir ou plaques de microtitration
 Tips jetables.

 Bac de coloration et pinces pour lames
 Chambre humide
 Ballon volumétrique (500 ml)
 H2O distillée
 Microscope à fluorescence
 Serviettes en papier (non pelucheuses)
Préparation des réactifs:

Sachet de tampon No AD PBS1. Réhydrater le tampon avec 1 litre d'eau distillée stérile.

Prélèvement des échantillons:

Les échantillons de sang doivent être prélevés dans des conditions aseptiques. Une hémolyse est évitée par une séparation rapide du sérum du caillot. Le sérum doit être conservé entre 2 - 8 °C en cas d'analyse prévue dans un délai de quelques jours. On peut garder le sérum pendant 3 à 6 mois en le conservant à une température maximale de -20 °C. Éviter les sérums lipémiques et fortement hémolytiques. Lorsque les échantillons sont expédiés à température ambiante, l'ajout d'un agent conservateur tel que 0,01 % (thimérol) ou 0,095 % d'azide de sodium est fortement conseillé.

Instructions du test:

Test de screening: diluer les sérums du test au 1:4 dans du PBS

Titrages: effectuer des dilutions sérielles du sérum à partir de 1:4 (à savoir, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.)

1. Une fois les lames parvenues à température ambiante, ouvrir le conditionnement des lames en le déchirant à l'encoche. Retirer la lame avec soin et éviter de toucher les parties où se situent les antigènes. La lame est maintenant prête à l'emploi.
2. Déposer une goutte de sérum dilué (20 à 30 µl) et des contrôles sur les puits contenant les antigènes.
3. Placer la lame comportant le sérum du patient et les contrôles dans une chambre humide à température ambiante pendant 30 minutes (environ 24 °C).
4. Enlever la lame de la chambre humide et pour permettre au sérum de s'écouler sur une serviette en papier. À l'aide d'une pissette, rincer délicatement le reste de sérum de la lame en prenant soin de détourner le jet de rinçage du puits.
5. Laver dans du PBS pendant cinq minutes. Répéter l'opération en utilisant du PBS frais.
6. Placer un buvard sur la table de laboratoire avec le côté absorbant tourné vers le haut. Retirer la lame du PBS et la retourner de manière à placer le côté frottis en face du côté absorbant du papier buvard. Absorber le tampon entre les puits à l'aide du buvard. Placer la lame sur le buvard. Ne pas laisser les frottis sécher. Essuyer le dos de la lame avec une serviette en papier sèche et non pelucheuse. Exercer suffisamment de pression sur la lame tout en l'essuyant pour absorber le tampon.
7. Déposer 1 goutte (25 à 30 µl) de conjugué dans chaque puits. Répéter les étapes 3 à 6.
8. Déposer 4 à 5 gouttes de liquide de montage sur la lame.
9. Déposer une lamelle couvre-objet de 22 x 70 mm. Examiner la lame sous un microscope à fluorescence.

Remarque: Pour maintenir la fluorescence, conserver la lame montée dans une chambre humide placée à l'obscurité dans un réfrigérateur.

Contrôle de qualité:

1. Des contrôles de sérum positifs et négatifs doivent être inclus dans chaque série pour confirmer la reproductibilité, sensibilité et spécificité du mode opératoire du test.
2. Le contrôle de sérum négatif devrait faire apparaître peu (1+) ou pas de fluorescence. La mise en évidence d'une fluorescence vive par ce contrôle peut résulter du contrôle, de l'antigène, du conjugué ou de la technique.
3. Le contrôle de sérum positif devrait être à l'origine d'une fluorescence vive de 3+ à 4+. La mise en évidence d'une fluorescence faible ou inexistante par ce contrôle peut résulter du contrôle, de l'antigène, du conjugué ou de la technique.
4. En plus des contrôles de sérums positif et négatif, effectuer un contrôle PBS pour s'assurer que le conjugué ne provoque pas de coloration non spécifique du substrat antigénique. Si

l'antigène montre une fluorescence vive du contrôle PBS, répéter l'opération à l'aide d'un nouveau conjugué. Une fluorescence de l'antigène peut résulter d'une dégradation du conjugué ou de l'antigène

Résultats:


On peut observer une fluorescence du cytoplasme des îlots de Langerhans. La coloration des îlots de Langerhans peut devenir plus visible sous l'effet de la dilution. En raison des réactions autoimmunes croisées, les îlots de Langerhans peuvent paraître masqués à dilution plus faible du test de screening.

Limites de la procédure:

Aucun diagnostic ne doit reposer sur un seul test sérologique, divers facteurs hôtes devant être pris en compte.

Précautions:

1. Le HBsAg et le HTLV-III/LAV de tous les composants d'origine humaine ont été testés par dosage radioimmunologique, par une méthode approuvée par la FDA, et se sont avérés négatifs. Ceci ne garantit toutefois pas l'absence de HBsAg ou de HTLV-III/LAV. Tous les composants d'origine humaine doivent être manipulés avec les précautions appropriées.
2. Les contrôles et le conjugué contiennent de l'azide de sodium (0,095%).
3. Ne pas utiliser les composants après leur date de péremption.
4. Suivre les instructions de la méthode exactement comme elles figurent dans cette notice afin de garantir des résultats valables.
5. Réservé au diagnostic *in vitro*.
6. Manipuler les lames par les bords car une pression appliquée directement sur les puits contenant les antigènes peut altérer l'antigène.
7. Une fois la procédure lancée, ne pas laisser sécher les antigènes des puits. Ceci peut entraîner l'obtention de résultats faussement négatifs ou l'apparition d'artefacts superflus.
8. Le titre est la dilution du sérum de patients la plus élevée qui montre une faible fluorescence de 1+ du cytoplasme des îlots de Langerhans.
9. Utiliser des tips pour chaque échantillon et réactif pour éviter une contamination croisée.
10. Les réactifs doivent être inspectés afin d'éviter une possible contamination bactérienne ou contamination fongique.
11. Ne pas réutiliser les lames.

Composant	AD PBS1 PBS sachet poudre AD TMM3 Liquide de montage	Déclaration de précaution Prévention: P264 Se laver les mains soigneusement après manipulation. P280 Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
Pictogramme		Réponse: P305+P351+P338 EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. P337+P313 Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.
Mot de signal	ATTENTION	
Mention de danger	H319 Provoque une sévère irritation des yeux.	

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


EC	REP	Emergo Europe Princessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	---





ISLET CELL ANTIBODY TEST SYSTEM

Die Tests sind für die *diagnostische Verwendung in vitro* bestimmt.

AD IMP48 48 Tests
AD IMP96 96 Tests

Testtitel:

IFT Anti-Inselzellen-Antikörpertest

Verwendungszweck:

Indirekter Immunofluoreszenztest zur Erkennung von Inselzellen- Antikörpern im Patientenserum

Prinzip:

Die primäre Testreaktion erfasst im Serum des Patienten zirkulierende Antikörper, die sich an ihre homologen Antigene anlagern. Dies findet in der Inkubationszeit statt, während das Serum die Antigenoberfläche bedeckt. Auf einen Auswaschvorgang, in dem alle ungebundenen humanen Antikörper entfernt werden, folgt eine sekundäre Reaktion. Das in der sekundären Reaktion verwendete Reagens ist ein fluoresceinmarkiertes Antihumanglobulinkonjugat. Die Antigenoberfläche wird danach vollständig von ungebundenem Konjugat freigespült und unter einem geeigneten Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Bereitgestellte Materialien:

- Lagerung und Stabilität von Komponenten
- 1. Antigenobjektträger, Gewebeschnitte des Affen-Pankreas (bei 2-8 °C lagern)
- 2. Inselzellen-Positivkontrolle (bei 2-8 °C lagern)
- 3. Universelle Negativkontrolle (bei 2-8 °C lagern)
- 4. FITC IgG H&L mit Evans-Blau Konjugat (bei 2-8 °C lagern) AD CGEM2
- 5. Pufferpackung Nr. AD PBS1 – Phosphatgepufferte Salzlösung (rekonstituierter Puffer enthält keine Konservierungsmittel und sollte bei 2-8 °C gelagert werden)
- 6. Einbettungsmittel Nr. AD TMM3 lässt sich bei 2-8 °C stabil lagern.

Weitere erforderliche, aber nicht bereitgestellte Materialien:

- Reagenzgläser und Gestell- oder Mikrotitersystem
- Einmalgebrauchspipetten
- Färbeschale und Objektträgerpinzette
- Feuchtkammer
- Messkolben (500 ml)
- Destilliertes H2O
- Fluoreszenzmikroskop
- Nichtfasernde Papiertücher

Reagensvorbereitung:

- 1. Pufferpackung Nr. AD PBS1. Puffer mit 1 Liter sterilem destilliertem Wasser rehydratisieren.

Probennahme:

Serologische Proben sollten unter aseptischen Bedingungen genommen werden. Hämolyse wird durch umgehende Trennung des Serums vom Koagulat vermieden. Serum sollte bei 2-8 °C gelagert werden, wenn es innerhalb weniger Tage analysiert werden soll. Serum lässt sich bei -20 °C oder darunter 3 bis 6 Monate lang lagern. Lipämisches und stark hämolytisches Serum sollte vermieden werden. Wenn Proben bei Raumtemperatur bereitgestellt werden, wird die Zugabe eines Konservierungsmittels wie 0,01% (Thimerosal) oder 0,095% Natriumazid sehr empfohlen.

Testanweisung:

- Screening: verdünnen Sie Testsera 1:4 in PBS.
 - Titrationen: setzen Sie Serumverdünnungen mit jeweils verdoppelter Verdünnung an, beginnend bei 1:4 (d. h. 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, usw.)
 - 1. Wenn die Objektträger Raumtemperatur erreicht haben, reißen Sie die Objektträgerhülle an der Kerbe auf. Entnehmen Sie den Träger vorsichtig, ohne die Antigenbereiche zu berühren. Der Objektträger ist nun einsatzbereit.
 - 2. Geben Sie jeweils einen Tropfen gelöstes Serum (20 bis 30 µl) und Kontrolle auf die Antigenkavitäten.
 - 3. Legen Sie den Objektträger mit dem Patientenserum und den Kontrollen 30 Minuten lang in eine Feuchtkammer bei Raumtemperatur (ungefähr 24 °C).
 - 4. Nehmen Sie den Objektträger aus der Feuchtkammer, und lassen Sie das Serum auf ein Stück Papiertuch ablaufen. Spülen Sie verbleibende Sera mit einer Waschflasche vom Objektträger, wobei Sie sorgfältig darauf achten, den Spülstrahl nicht direkt auf die Kavität zu richten.
 - 5. Fünf Minuten in PBS waschen. Wiederholen Sie den Vorgang mit frischem PBS.
 - 6. Legen Sie ein Löschblatt auf den Labortisch, mit der absorbierenden Seite nach oben. Nehmen Sie den Objektträger aus dem PBS und drehen Sie ihn um, so dass die Gewebeseite der absorbierenden Seite des Löschblatts zugewandt ist. Richten Sie die Kavitäten auf die Löschblatlöcher aus. Legen Sie den Objektträger auf die Löschblattoberseite. Das Gewebe darf nicht trocknen. Wischen Sie die Trückerückseite mit einem nichtfasernden Papiertuch ab. Üben Sie beim Abwischen zum Absorbieren des Puffers genügend Druck auf den Objektträger aus.
 - 7. Geben Sie 1 Tropfen (25-30 µl) Konjugat auf jede Antigenkavität. Wiederholen Sie die Schritte 3-6.
 - 8. Geben Sie 4-5 Tropfen Einbettungsmittel auf den Objektträger.
 - 9. Setzen Sie ein Deckglas von 22 x 70 mm auf. Untersuchen Sie den Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop.
- Hinweis: Um die Fluoreszenz aufrechtzuerhalten, lagern Sie den präparierten Objektträger in einer Feuchtkammer in einem dunklen Kühlschrank.

Qualitätskontrolle:

- 1. Positive und negative Serumkontrollen müssen täglich beim Testen einbezogen werden, um die Reproduzierbarkeit, Empfindlichkeit und Spezifität der Testprozedur zu bestätigen.
- 2. Die negative Serumkontrolle sollte zu geringer (1+) oder ausbleibender Fluoreszenz führen. Sollte sich bei dieser Kontrolle helle Fluoreszenz zeigen, ist die Kontrollprobe, das

Antigen, das Konjugat oder die Vorgehensweise möglicherweise fehlerhaft.
3. Die positive Serumkontrolle sollte zu heller Fluoreszenz von 3+ bis 4+ führen. Sollte sich bei dieser Kontrolle geringe oder keine Fluoreszenz zeigen, ist die Kontrollprobe, das Antigen, das Konjugat oder die Vorgehensweise möglicherweise fehlerhaft.
4. Zusätzlich zu positiven und negativen Serumkontrollen sollte eine PBS-Kontrolle durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass das Konjugat frei von unspezifischer Färbung des Antigenstrats ist. Wenn das Antigen bei der PBS-Kontrolle helle Fluoreszenz zeigt, wiederholen Sie mit frischem Konjugat. Wenn das Antigen noch immer fluoresziert, ist das Konjugat oder das Antigen möglicherweise fehlerhaft.

Ergebnisse:

Es lässt sich cytoplasmatische Immunofluoreszenz der Inselzellen beobachten. Die Färbung der Inselzellen wird bei Titration eventuell stärker sichtbar. Aufgrund von überlappenden Autoimmunreaktionen kann die Inselzelle bei der niedrigeren Screening-Verdünnung verdeckt erscheinen.

Grenzen des Testverfahrens:

Keine Diagnose sollte auf nur einem einzigen serologischen Testergebnis basieren, da verschiedene Wirtsfaktoren zu berücksichtigen sind.

Vorsichtsmaßnahmen:

- 1. Alle humanen Bestandteile wurden mit Radioimmuntest auf (HBsAg) und HTLVIII/LAV mit einer FDA-anerkannten Methode negativ getestet. (Nicht wiederholt reaktiv.) Dies gewährleistet jedoch nicht die Abwesenheit von HBsAg oder HTLVIII/LAV. Alle humanen Bestandteile sollten mit angemessener Sorgfalt gehandhabt werden.
- 2. Den Kontrollproben und dem Konjugat ist Natrium azide (0,095%) beigefügt.
- 3. Verwenden Sie keine Bestandteile über das Verfallsdatum hinaus.
- 4. Befolgen Sie die methodischen Anweisungen genau wie in dieser Beilage beschrieben, um gültige Ergebnisse zu gewährleisten.
- 5. Die Tests sind für die diagnostische Verwendung in vitro bestimmt.
- 6. Fassen Sie die Objektträger an den Kanten an, da direkter Druck auf die Antigenkavitäten das Antigen beschädigen kann.
- 7. Nach Beginn der Prozedur darf das Antigen in den Kavitäten nicht austrocknen. Dies kann zu falsch negativen Testergebnissen oder unnötigen Artefakten führen.
- 8. Der Titer ist die höchste Verdünnung von Patientenserum, bei der sich eine schwache Fluoreszenz (1+) des Inselzellencytoplasmas zeigt.
- 9. Verwenden Sie getrennte Pipette Tips für jede Probe und Reagenz zu treffen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- 10. Reagenzien geprüft werden sollen auf Anzeichen von Bakterien- oder Pilzbefall.
- 11. Nicht wiederverwenden Objektträger.

Komponente	AD PBS1 PBS pufferpackung AD TMM3 Einbettungsmittel	Sicherheitshinweis Prävention: P264 Nach Gebrauch ... gründlich waschen. P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
Piktogramm		Antwort: P305+P351+P338 BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach
Signalwort	ACHTUNG	lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach
Gefahrenhinweis	H319 Verursacht schwere Augenreizung.	Möglichkeit entfernen.. Weiter spülen. P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

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



EC	REP	Emergo Europe Princessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
----	-----	---



ISLET CELL ANTIBODY TEST SYSTEM

Per uso *diagnostico in vitro*.

AD IMP48 48 Tests
 AD IMP96 96 Tests

Titolo del test:

Test IFA per anticorpi anti-cellula delle isole pancreatiche

Uso previsto:

Test di immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi anti-cellula delle isole pancreatiche nel siero del paziente

Principi:

La reazione primaria del test implica la circolazione nel siero del paziente di anticorpi che si legano ai loro antigeni omologhi. Ciò si verifica durante il periodo di incubazione, quando il siero ricopre la superficie dell'antigene. Successivamente ad un periodo di risciacquo necessario per la rimozione degli anticorpi umani non legati, avviene una reazione secondaria. Il reagente utilizzato nella reazione secondaria è un coniugato antiglobulina umana marcato con fluoresceina. La superficie dell'antigene viene quindi completamente risciacquata in modo da eliminare il coniugato non legato e quindi osservata con un idoneo microscopio a fluorescenza.

Materiali in dotazione:

Conservazione e stabilità dei componenti

1. Vetrini con antigeni di pancreas di scimmia (conservare a una temperatura di 2-8°C).
2. Controllo positivo cellula delle isole pancreatiche (conservare a una temperatura di 2-8°C).
3. Controllo negativo universale (conservare a una temperatura di 2-8°C).
4. Coniugato FITC IgG H&L con Blu di Evans (conservare a una temperatura di 2- 8°C). n. AD CGEM2
5. Confezione tampone n. AD PBS1 - Tampone fosfato. Il tampone ricostituito non contiene conservanti e deve essere conservato a una temperatura di 2-8°C.
6. La soluzione di montaggio n. AD TMM3 rimane stabile se conservata a una temperatura di 2-8°C.

Materiali aggiuntivi richiesti ma non indotazione:

Provette per test e cestello o sistema per microtitolazione

Pipette monouso

Vaschetta per colorazione e pinze per vetrini

Camera umida

Pallone volumetrico (500 ml)

Acqua distillata

Microscopio a fluorescenza

Carta assorbente che non lasci residui

Preparazione del reagente:

1. Confezione tampone n. AD PBS1. Reidratate il tampone con 1 litro di acqua distillata sterile.

Raccolta dei campioni:

Raccogliere i campioni sierologici in condizioni asettiche. L'emolisi viene evitata separando tempestivamente il siero dal coagulo. Conservare il siero a una temperatura di 2-8°C se questo deve essere analizzato entro pochi giorni. È possibile conservare il siero per un periodo di 3-6 mesi a una temperatura pari o inferiore a -20° C. Evitare il siero lipemico e fortemente emolitico. Se i campioni vengono spediti a temperatura ambiente, si raccomanda 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 tampone fosfato.

Titolazioni: impostare diluizioni di siero al raddoppio a partire da 1:4 (cioè 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, ecc.)

1. Quando i vetrini raggiungono la temperatura ambiente, strappare l'involucro in corrispondenza dell'apposita tacca. Rimuovere con cautela il vetrino dall'involucro evitando di toccare le aree su cui è presente l'antigene. Il vetrino è pronto per l'uso.
2. Versare una goccia di siero diluito (da 20 a 30 µl) e i controlli sui pozzetti dell'antigene.
3. Posizionare il vetrino con il siero del paziente e i controlli in una camera umida a temperatura ambiente (circa 24°C) per 30 minuti.
4. Rimuovere il vetrino dalla camera umida e per fare gocciare il siero su un pezzo di carta assorbente. Risciacquare delicatamente il siero rimanente sul vetrino con spruzzetta per lavaggio facendo attenzione a non dirigere il getto direttamente sul pozzetto.
5. Lavare in tampone fosfato per cinque minuti. Ripetere la procedura utilizzando tampone fosfato fresco.
6. Posizionare un tampone di carta assorbente sul tavolo del laboratorio con il lato assorbente rivolto verso l'alto. Rimuovere il vetrino dal tampone fosfato e capovolgerlo in modo che il lato su cui è applicato il campione di tessuto sia a contatto con il lato assorbente del tampone. Allineare i pozzetti con i fori del tampone. Posizionare il vetrino sulla parte superiore del tampone. Non lasciare asciugare il tessuto. Pulire la parte posteriore del vetrino con carta assorbente asciutta che non lasci residui. Assorbire il tampone fosfato con la carta esercitando una leggera pressione ed accertarsi che il vetrino sia asciutto.
7. Versare 1 goccia (25-30 µl) di coniugato in ciascun pozzetto di antigene. Ripetere le fasi da 3 a 6.
8. Versare 4-5 gocce di soluzione di montaggio sul vetrino.
9. Applicare un vetrino coprioggetto da 22 x 70 mm. Esaminare il vetrino al microscopio a fluorescenza.

Nota: per mantenere la fluorescenza, conservare il vetrino montato in una camera umida all'interno di un refrigeratore al buio.

Controllo di qualità:

1. I controlli di siero positivo e negativo devono essere inclusi in tutti i test del giorno per confermare la riproducibilità, la sensibilità e la specificità della procedura.
2. Il controllo di siero negativo deve visualizzare una fluorescenza minima (1+) o nulla. Una eventuale fluorescenza evidente di questo controllo indica un problema a livello di controllo, di antigene, di coniugato o di procedura tecnica.

3. Il controllo di siero positivo deve visualizzare una fluorescenza evidente da 3+ a 4+. Una eventuale fluorescenza minima o nulla di questo controllo indica un problema a livello di controllo, di antigene, di coniugato o di procedura tecnica.
4. In aggiunta ai controlli di siero positivi e negativi, eseguire un controllo con tampone fosfato per stabilire se il coniugato è libero da colorazioni non specifiche del substrato dell'antigene. Se l'antigene mostra una fluorescenza evidente nel controllo con tampone fosfato, ripetere la procedura utilizzando coniugato fresco. La presenza continua di fluorescenza indica un problema a livello del coniugato o dell'antigene stesso.

Risultati:


Può essere osservata immunofluorescenza citoplasmatica delle cellule delle isole pancreatiche. La colorazione delle cellule delle isole pancreatiche può divenire più visibile con la titolazione. A causa della sovrapposizione delle risposte autoimmuni, con diluizioni di screening inferiori le cellule delle isole pancreatiche possono apparire mascherate.

Limitazioni della procedura:

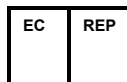
La diagnosi non deve essere mai basata sul risultato di un singolo test sierologico, in quanto è necessario prendere in considerazione diversi fattori dell'ospite.

Precauzioni:

1. Tutti i componenti umani sono stati testati mediante test radioimmunologico per (HBsAg) e HTLVIII/LAV con metodo approvato dalla FDA e sono risultati negativi (non reattivi ripetutamente). Tuttavia, questo non garantisce l'assenza di HBsAg o HTLVIII/LAV. Tutti i componenti umani devono essere manipolati con estrema cautela.
2. Sodio azide (0,095%) è compresa in controlli e coniugato.
3. Non utilizzare componenti scaduti.
4. Per garantire risultati validi, seguire le istruzioni procedurali esattamente come vengono descritte in questo inserto.
5. Per uso diagnostico in vitro.
6. Manipolare i vetrini prendendoli dai bordi in quanto la pressione diretta sui pozzetti dell'antigene può danneggiare l'antigene stesso.
7. Dopo aver iniziato la procedura, non fare asciugare l'antigene nel pozzetto. Ciò può comportare risultati falsi negativi o artefatti inutili.
8. titolo è la diluizione più alta del siero del paziente che mostra una fluorescenza debole (1+) del citoplasma della cellula delle isole pancreatiche.
9. Separate le punte della pipetta per ogni campione e dei reagenti per evitare la contaminazione incrociata.
10. I reattivi devono essere controllati per la prova di contaminazione batterica o fungina.
11. Non riutilizzare vetrini con substrate.

Componente	AD PBS1 PBS confezione tamponi AD TMM3 soluzione di montaggio	Consiglio di prudenza Prevenzione: P264 Lavare accuratamente ... dopo l'uso. P280 Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Risposta: 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.
Pittogramma		
AVVERTENZA	ATTENZIONE	
Indicazione di Pericolo	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



Emergo Europe
 Princessegracht 20
 2514 AP The Hague
 The Netherlands





ISLET CELL ANTIBODY TEST SYSTEM

Para uso *diagnóstico in vitro*.

AD IMP48 48 Tests
AD IMP96 96 Tests

Nombre de la prueba:
Prueba de anticuerpos anti células de los islotes IFA

Aplicación:
Ensayo de inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos anti células de los islotes en suero del paciente

Principio:
La principal reacción de la prueba consiste en la unión de anticuerpos circulantes del suero del paciente a sus antígenos homólogos. Esto sucede durante el período de incubación en el que el suero recubre la superficie de antígeno. Tras un período de lavado para eliminar los anticuerpos humanos que no se han unido se procede a una reacción secundaria. El reactivo utilizado en la reacción secundaria es un conjugado de anticuerpos contra la globulina humana marcada con fluoresceína. A continuación, la superficie de antígeno se aclara a fondo para eliminar el conjugado que no se ha unido y se examina en un microscopio de fluorescencia adecuado.

Materiales suministrados:
Almacenamiento y estabilidad de los componentes
1. Portaobjetos con antígeno de páncreas de mono (almacenar a 2-8 °C).
2. Control positivo de células de islote (almacenar a 2-8 °C).
3. Control negativo universal (almacenar a 2-8 °C).
4. Conjugado IgG (H y L) con azul de Evans de FITC (almacenar a 2-8 °C).n.º AD CGEM2
5. Sobre de tampón n.º AD PBS1 - tampón fosfato salino (PBS, el tampón reconstituido no contiene conservantes y debe almacenarse a 2-8 °C).
6. El medio de montaje n.º AD TMM3 es estable cuando se almacena a 2-8 °C.

Otros materiales necesarios pero no suministrados:
Tubos de ensayo y gradilla, o sistema de micro-titulación
Pipetas desechables
Placa de tinción y pinzas para portaobjetos
Cámara húmeda
Matraz volumétrico (500 ml)
Agua destilada
Microscopio de fluorescencia
Toallas de papel que no dejen pelusa

Preparación del reactivo:
1. Sobre de tampón n.º AD PBS1. Rehidratar el tampón con 1 litro de agua destilada estéril.

Toma de muestras:
Las muestras serológicas deben extraerse en condiciones asépticas. La hemólisis se evita separando rápidamente el suero del coágulo. Si se va a analizar en pocos días, el suero debe almacenarse a 2-8 °C. Puede conservarse de 3 a 6 meses a una temperatura de -20 °C o inferior. No conviene utilizar sueros lipémicos o fuertemente hemolíticos. Si las muestras se guardan a temperatura ambiente, es altamente recomendable añadir un conservante, como por ejemplo timerosal al 0,01% o azida sódica al 0,095%.

Instrucciones de la prueba:
Criba (screening): diluya los sueros de prueba 1:4 en PBS.
Titulaciones: prepare diluciones de suero seriadas en proporción 2x a partir de 1:4 (es decir, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, etc.).
1. Una vez que el portaobjetos alcance la temperatura ambiente, rasgue el envoltorio tirando de la pestaña. Saque cuidadosamente el portaobjetos, evitando tocar las zonas de antígeno. El portaobjetos está listo para usar.
2. Ponga una gota del suero diluido (de 20 a 30 µl) y de los controles en los pocillos de antígeno.
3. Coloque el portaobjetos con el suero del paciente y los controles en una cámara húmeda a temperatura ambiente (aproximadamente 24 °C) durante 30 minutos.
4. Retire el portaobjetos de la cámara húmeda, sujételo de canto sobre una toalla de papel para vaciar el suero. Utilice un frasco lavador para aclarar suavemente los restos de suero del portaobjetos procurando no dirigir el chorro directamente hacia el pocillo.
5. Lávelo en PBS durante cinco minutos. Repita la operación con PBS nuevo.
6. Coloque un secante sobre la poyata de laboratorio con la cara absorbente hacia arriba. Retire el portaobjetos del PBS, dele la vuelta de modo que la cara de tejido quede orientada hacia la cara absorbente del secante. Alinee los pocillos con los orificios del secante. Coloque el portaobjetos sobre el secante. No deje que el tejido se seque. Seque el dorso del portaobjetos con una toalla de papel que no deje pelusa. Al secarlo, aplique al portaobjetos la presión necesaria para absorber el tampón.
7. Ponga 1 gota (25-30 µl) de conjugado en cada pocillo de antígeno. Repita los pasos 3 a 6.
8. Ponga 4 ó 5 gotas de medio de montaje en el portaobjetos.
9. Coloque un cubreobjetos de 22 x 70 mm. Examine el portaobjetos con un microscopio de fluorescencia.
Nota: para mantener la fluorescencia, guarde el portaobjetos montado en la nevera dentro una cámara húmeda y a oscuras.

Control de calidad:
1. Para confirmar la reproducibilidad, sensibilidad y especificidad del ensayo es necesario incluir controles de suero positivo y negativo en los análisis todos los días.
2. El resultado del control de suero negativo debe ser poca (1+) o ninguna fluorescencia. Si este control muestra una fluorescencia brillante, el problema puede estar en el control, el antígeno, el conjugado o en la técnica.
3. El resultado del control de suero positivo debe ser una fluorescencia brillante del orden de 3+ a 4+. Si este control muestra poca o ninguna fluorescencia, el problema puede estar en el control, el antígeno, el conjugado o en la técnica.

4. Además de los controles de suero positivo y negativo, debe analizarse un control de PBS para confirmar que el conjugado no tinte el sustrato de antígeno de manera inespecífica. Si el antígeno presenta una fluorescencia brillante en el control de PBS, repita el análisis usando conjugado nuevo. Si el antígeno sigue presentando fluorescencia, el problema puede estar en el conjugado o en el antígeno.

Resultados:
Puede observarse inmunofluorescencia citoplásmica de las células de los islotes. La tinción de las células de los islotes puede hacerse más visible en la titulación. Debido al solapamiento de respuestas autoinmunes, el islote puede aparecer enmascarado en la dilución de criba inferior.

Limitaciones del procedimiento:
Ningún diagnóstico debe basarse en el resultado de una sola prueba serológica, ya que hay que tener en cuenta diversos factores del huésped.

Precauciones:
1. Todos los componentes humanos han sido probados mediante radioinmunoensayo para (HBsAg) y HTLVIII/LAV con un método aprobado por la FDA, y han dado resultados negativos (no repetidamente reactivos). No obstante, esto no garantiza la ausencia de HBsAg o HTLVIII/LAV. Todos los componentes humanos deben manipularse con las debidas precauciones.
2. Los controles y el conjugado contienen sodium azide (0,095%).
3. No utilice ningún componente que haya sobrepasado la fecha de caducidad.
4. Para garantizar la validez de los resultados, siga las instrucciones del procedimiento exactamente como aparecen aquí.
5. Para uso diagnóstico in vitro.
6. Sujete los portaobjetos por los bordes, ya que la presión directa sobre los pocillos puede estropear el antígeno.
7. Una vez iniciado el procedimiento, no deje que el antígeno de los pocillos se seque. Esto podría dar falsos negativos o producir artefactos innecesarios.
8. El título es la dilución más alta de suero del paciente que muestra una fluorescencia débil (1+) del citoplasma de la célula de islote.
9. Use distintas puntas de pipeta para cada una de las muestras y reactivos para evitar la contaminación cruzada.
10. Los reactivos deben inspeccionarse en busca de evidencias de contaminación bacteriana o micótica.
11. No reutilizar portaobjetos.

Componente	AD PBS1 sobre de tampón AD TMM3 medio de montaje	Consejos de prudencia Prevención: P264 Lavarse ... concienzudamente tras la manipulación. P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Respuesta: P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. P337+P313 Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
Pictograma		
Palabra Clave	ATENCIÓN	
Indicación de Peligro	H319 Provoca irritación ocular grave.	

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



EC	REP	Emergo Europe Princessegracht 20 2514 AP The Hague The Netherlands
-----------	------------	---



	Manufactured by Prodotto da Fabricado por Fabriqué par hergestellt von
REF	Catalog number Numero di catalogo Número de Catálogo Numéro de catalogue Katalognummer
LOT	Lot Lotto Lote Lot Charge
EC REP	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
RFU	Ready for use Pronto all'uso Listo para su uso Prêt à l'emploi Gebrauchsfertig
IVD	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
RUO	For research use only Solo per ricerca Para uso solo en investigación Pour recherche Nur für Forschungszwecke
IUO	For investigational use only Solo per uso investigativo Para uso solo en investigación Pour investigation Nur für Forschungszwecke
IFA/DFA PBS	Phosphate Buffered Saline Tampone salino fosfato Fosfato Salino Tamponado Tampon phosphate salin PBS
SOR	Sorbent Assorbent Sorbente Absorbant Sorbens

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