



# SZABO SCANDIC

Part of Europa Biosite

## Produktinformation



Forschungsprodukte & Biochemikalien



Zellkultur & Verbrauchsmaterial



Diagnostik & molekulare Diagnostik



Laborgeräte & Service

Weitere Information auf den folgenden Seiten!  
See the following pages for more information!



### Lieferung & Zahlungsart

siehe unsere [Liefer- und Versandbedingungen](#)

### Zuschläge

- Mindermengenzuschlag
- Trockeneiszuschlag
- Gefahrgutzuschlag
- Expressversand

### SZABO-SCANDIC HandelsgmbH

Quellenstraße 110, A-1100 Wien

T. +43(0)1 489 3961-0

F. +43(0)1 489 3961-7

[mail@szabo-scandic.com](mailto:mail@szabo-scandic.com)

[www.szabo-scandic.com](http://www.szabo-scandic.com)

[linkedin.com/company/szaboscandic](https://www.linkedin.com/company/szaboscandic) 

# Anti-Steroidal Cell Antibody (StCAb) IFA

[IVD] For *in vitro* diagnostic use

## PRODUCT INSERT

[REF] 1112	StCAb IFA primate ovary substrate	40 Determinations
[REF] 1113	StCAb IFA primate testis substrate	40 Determinations

## INTENDED USE

Indirect immunofluorescence test for the detection of antibodies to ovary and testis in sera of patients with primary ovarian failure, *in vitro* fertilization and autoimmune endocrine syndrome.

## SUMMARY AND EXPLANATION

Physiologic exhaustion of ovarian follicles occurs in women at an age between 40 and 55 years. When ovarian function ceases before age forty, the condition is referred to as *premature ovarian failure* (POF). This condition occurs in 4-10% of women. The various etiologic factors in POF are congenital defects, enzymatic alterations, gonadotropin secretion alterations, gonadotropin receptor alterations, iatrogenic infections and autoimmune disorders. The diagnosis of POF is made based on the presence of a triad of indications; amenorrhea, elevated FSH and diminished 17 $\beta$ -estradiol levels before the age of 40 years. The syndrome is heterogeneous and efforts should be made to determine the etiology so that a rational treatment can be implemented. Antibodies to steroid cell antigens have been identified in association with premature menopause, infertility and in patients with *in vitro* fertilization (IVF).<sup>1-6</sup> Premature ovarian dysfunction is often associated with thyroid or adrenal gland related autoimmune endocrine disorders, such as Hashimoto's, Graves and Addison's disease, and polyendocrine syndrome (adrenitis, hypoparathyroidism and mucocutaneous candidiasis). Premature menopause and infertility are also associated with non-endocrine autoimmune disorders such as lupus and other connective tissue disorders. The appearance of these antibodies often precedes the onset of ovarian failure. Patients with these disorders may have autoantibodies to testicular Leydig cells, ovarian granulosa cells and placental syncytiotrophoblasts.

## PRINCIPLES OF PROCEDURE

Anti-steroidal cell antibodies (StCAb) are detected by indirect immunofluorescence (IF) on primate testis and ovary tissue substrate. The substrate is incubated with patient serum to allow specific autoantibodies present in the serum to bind to the antigen on the substrate. Unbound antibodies are removed by rinsing the slide. Bound antibodies are detected with a two step indirect IF method by sequentially incubating the substrate with anti-human IgG

EN

FITC Conjugate then Conjugate B. Rinsing the slide after each incubation removes excess conjugate and allows for the application of mounting medium and a coverglass after the last wash. Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate FITC filters. The appearance of specific apple-green reactions of the Leydig cells on testis and theca cells of the ovary demonstrate positive reactions. The titer (reciprocal of the highest dilution giving positive reaction) can be determined by performing serial dilutions of the serum.

## REAGENTS

### Storage and Preparation

Store all reagents at 2-8°C. **Do not freeze.** Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20-25°C) prior to use.

Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water. When stored at 2-8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date.

### Precautions

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However, human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials.

**WARNING** - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. NaN<sub>3</sub> is toxic if ingested. Report incidents immediately to laboratory director or poison control center.

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use kit components beyond expiration date on the labels.

### Materials provided

[REF] 1112 StCAb IFA primate ovary substrate

[REF] 1113 StCAb IFA primate testis substrate

Kits contains sufficient reagents to perform 40 determinations.

10 x [SORB|SLD|4] 4 well primate ovary substrate slide for [REF] 1113

10 x [SORB|SLD|4] 4 well primate testis substrate slide for [REF] 1112

1 x 0.5ml [CONTROL|+|StCAb]\* Ready to use **Positive Control**. Contains human serum positive for StCAb.


1 x 0.5ml	[CONTROL -]*	Ready to use <b>Negative Control</b> . Contains human serum.
1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	<b>Anti-human IgG FITC Conjugate</b> containing Evan's Blue. Protect from light.
1 x 5ml	[CONJ B]*	<b>Conjugate B</b> . Protect from light.
1 x 60 ml	[BUF]*	<b>Buffered Diluent</b> . Ready for use.
2 x vials	[BUF WASH]	Phosphate Buffered Saline. <b>Powder Wash Buffer</b> . <b>Reconstitute to one liter each</b> .
1 x 5ml	[MOUNTING MEDIUM]*	<b>Mounting Medium</b> . Do not freeze.
12 x	[COVER SLD]	<b>Coverslips</b>
1 x		Report form

### Optional Components

1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC]*	[REF] 2100 <b>Anti-human IgG FITC Conjugate</b> . Protect from light.
1 x 1ml	[EVANS]*	[REF] 2510 <b>Evans Blue Counterstain</b>

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

### Symbols used on labels

[LOT]	Lot number
[REF]	Catalog number
[IVD]	In vitro diagnostic use
<b>e</b>	Use by
<b>t</b>	Storage temperature
<b>!</b>	Read instructions before use
<b>S</b>	Number of tests
	Manufacturer

### Materials Required But Not Provided

- Fluorescence microscope
- Micropipette or Pasteur pipette
- Serological pipettes
- Staining dish (e.g. Coplin jar)
- Small test tubes (e.g. 13 x 75 mm) and test tube rack
- Distilled or deionized water
- 1 liter container
- Wash bottle
- Absorbent paper towels
- Incubation chamber

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples. It is recommended that frozen specimens be tested within one year.

**PROCEDURE****Test Method****A. Screening:**

- Step 1.** Dilute each patient serum **1:10** with the Buffered Diluent provided (0.1 ml serum + 0.9 ml diluent). Screening at more than one dilution helps to avoid a “prozone phenomenon.” For screening, **DO NOT dilute the Positive or Negative Controls**. Save undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.
- Step 2** Remove slide pouches from refrigerator and allow sealed pouches **10-15 minutes** to equilibrate to room temperature. Carefully remove the slides from their pouch without touching the substrate.
- Step 3** Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent substrate from drying.
- Step 4** Apply **1 drop** (approximately 50 µl) of the Negative Control to well #1. and **1 drop** of Positive Control to well #2 by gently squeezing plastic vial. Avoid overfilling wells.
- Step 5** Using a micro- or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50 µl) to the other wells. Avoid overfilling wells.
- Step 6** Incubate slides **3 hours at room temperature** inside incubation chamber.
- Step 7** Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10 ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.
- Step 8** Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **anti-human IgG FITC Conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50 µl) to each well. Repeat process with all remaining slides.
- Step 9** Incubate **30 minutes at room temperature** inside incubation chamber.
- Step 10** Repeat **Steps 7 through 9** except in **Step 8** use **Conjugate B**.

- Step 11** Remove a slide from the incubation chamber. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides. If desired, **2-3 drops** of Evans blue counterstain may be added to the final wash. **NOTE:** Improper washing may lead to increased background fluorescence.
- Step 12** Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS and immediately apply **3 drops** of Mounting Medium evenly spaced on a coverslip and invert the slide onto the coverslip. To remove any air bubbles gently apply pressure along the edge of the coverslip. Avoid any movement of the coverslip. Repeat process with all remaining slides.
- Step 13** Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of **200x** or greater.

Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of an antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed. Slides should be stored in the dark at 2-8°C.

### **B: End Point Determination (Titration)**

Serum found positive in the screening test may be further tested to determine the titer by following **Steps 5 through 13**. Each test run should include the undiluted Negative Control and **undiluted, 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16** dilutions of the Positive Control. Serial two-fold dilutions of the patient's serum must be prepared starting at **1:10**. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer. If the Positive Control titer is within the limits defined by the enclosed QC specifications, antibody levels of patient's serum can be reported.

#### **Preparation of Serial Dilutions**

Number four tubes 1 to 4. Add **0.9 ml** of Buffered Diluent to tube 1 and **0.2 ml** to subsequent tubes. Pipette **0.1 ml** of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer **0.2 ml** from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring **0.2 ml** from one tube to the next after mixing to yield the expected dilutions as depicted in the following table:

<b>Tubes</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Serum	0.1 ml			
	+			
Buffered Diluent	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Transfer		0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Final dilution	1:10	1:20	1:40	1:80

## Quality Control

Both a positive and negative control serum should be included with each test run. The negative control should show no significant fluorescence. The positive control should have 2+ or greater specific staining. If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical system of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, use of the bulb beyond the expected performance life, etc.
- Allowing the slide to dry during the procedure.
- Improper preparation of serial dilutions of control.

## RESULTS

**Testis:** The interstitial tissue between the somniferous tubules of the testis contain *Leydig cells* which synthesize hormone testosterone and exhibit a positive cytoplasmic reaction as shown in Figure 1.

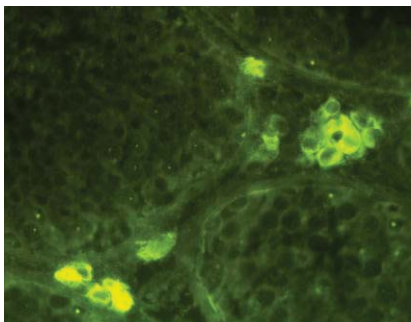


Figure 1. Positive reaction on Testis.

**Ovary:** There are three types of steroid hormone producing cells:

1. *Theca cells* which surround the developing follicles
2. Scattered lipid rich *leutinizing stromal cells*
3. Enzymatically active *stromal cells* which exhibit marked oxidative and other enzyme activity.

EN

Sera positive for steroidal cell antibody stain all three types of cells, but of these the rim of the positive theca interna cells surrounding follicles are the most easily identified as shown in Figure 2.

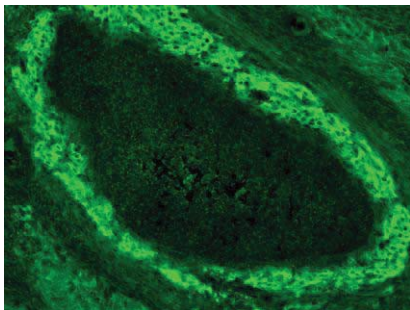


Figure 2. Positive reaction on Ovary.

### **LIMITATIONS OF PROCEDURE**

In some cases, sera positive for anti-steroidal cell antibodies may either be very weak or negative at the initial screening dilution (prozone phenomenon). In such doubtful cases the sera should be screened at higher dilutions and, if positive, antibody titers determined.

The presence of two or more antibodies in a serum, which react with the same substrate, may cause an interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either a failure to detect StCAB or a suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than anti-StCAB antibodies.

### **EXPECTED VALUES**

Expected values in a normal population are negative. Positive reactions are associated with autoimmune polyendocrine syndrome, premature ovarian failure, and women undergoing in vitro fertility. The incidence of these antibodies is as follows:



**Prevalence of Steroidal-Cell Autoantibodies (StCAb)**

<b>DISEASE</b>	<b>% INCIDENCE</b>
Ovarian Failure	
unselected infertility/amenorrhea	<1%
with autoimmune thyroid disease, or Type I diabetes	5-10%
with Addison's disease	
- primary amenorrhea	100%
- secondary amenorrhea	60%
Addison's disease (without ovarian failure)	
- Isolated cases	10-20%
- with hypoparathyroidism/candidiasis (type 1 autoimmune polyglandular syndrome)	60-80%
- with autoimmune thyroid disease (type 2 APGS)	25-40%
In vitro fertilization attempts >1	61%
Type 1 APGS without Addison's disease	10%
Autoimmune thyroid disease of IDDM	<1%
Healthy Controls	<1%

StCAb antibodies are a marker for ovarian autoimmunity in infertility. Screening for StCAb autoantibodies in young women might predict risk of future infertility, particularly in women with a family history of autoimmunity or premature menopause. The institution of an immunosuppressive treatment in some cases of autoimmune ovarian failure may lead to normalization of the menstrual cycle and leading to pregnancy, thus emphasizing the need of detection of StCAb in patients with infertility and the functional relationship of the antibody to infertility.

# Test IFI per gli anticorpi anti-cellule steroidee (StCAb)

[IVD] Per uso diagnostico *in vitro*

## FOGLIO ILLUSTRATIVO DEL PRODOTTO

[REF] 1112 Test IFI per gli StCAb su substrato ovarico di primati 40 determinazioni

[REF] 1113 Test IFI per gli StCAb su substrato testicolare di primati 40 determinazioni

## USO PREVISTO

Test di immunofluorescenza indiretta per il rilevamento degli anticorpi diretti contro l'ovaio e il testicolo, nei sieri delle pazienti con insufficienza ovarica primaria o sottoposte a fecondazione *in vitro* e nei sieri dei pazienti con sindrome endocrina autoimmune.

## RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

L'esaurimento fisiologico dei follicoli ovarici si verifica nella donna a un'età compresa fra 40 e 55 anni. Quando la funzione ovarica cessa prima dei 40 anni, la condizione viene chiamata *insufficienza ovarica prematura* (POF - Premature Ovarian Failure). Questa condizione si verifica nel 4-10% delle donne. I vari fattori eziologici nella POF sono difetti congeniti, alterazioni enzimatiche, alterazioni della secrezione e dei recettori della gonadotropina, infezioni iatrogene e disturbi autoimmuni. La diagnosi di POF si basa sulla presenza di una triade di segni: amenorrea, livello aumentato di FSH e livelli ridotti di 17- $\beta$ -estradiolo prima dell'età di 40 anni. La sindrome è eterogenea e occorre cercare in ogni modo di stabilire l'eziologia in modo da poter attuare un trattamento razionale. Anticorpi diretti contro gli antigeni delle cellule steroidee sono stati identificati in associazione con la menopausa prematura, l'infertilità e nelle pazienti sottoposte a fecondazione *in vitro* (IVF).<sup>1-6</sup> La disfunzione ovarica prematura è spesso associata a disturbi endocrini autoimmuni correlati alla ghiandola tiroide o a quella surrenale, come ad esempio la tiroidite di Hashimoto, la malattia di Graves, il morbo di Addison e la sindrome poliendocrina (surrenalite, ipoparatiroidismo e candidosi mucocutanea). La menopausa prematura e l'infertilità sono anche associate a disturbi autoimmuni non endocrini, come ad esempio il lupus e altri disturbi del tessuto connettivo. La comparsa di questi anticorpi precede spesso l'esordio dell'insufficienza ovarica. I pazienti affetti da questi disturbi possono avere autoanticorpi diretti contro le cellule di Leydig del testicolo, le cellule della granulosa ovarica e i sinciziotrofoblasti placentari.

## PRINCIPI DELLA PROCEDURA

Gli anticorpi anti-cellule steroidee (StCAb) vengono rilevati mediante immunofluorescenza indiretta (IFI) su substrato tissutale testicolare e ovarico di primati. Il substrato viene incubato con il siero del paziente così da permettere agli autoanticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene sul substrato. Gli anticorpi non legati vengono rimossi risciacquando il vetrino. Gli anticorpi legati vengono rilevati con un metodo IFI indiretto a due fasi, incubando sequenzialmente il substrato con un coniugato FITC anti-IgG umane, quindi con il coniugato B. Il risciacquo del vetrino dopo ogni fase di incubazione rimuove il coniugato in eccesso e consente l'applicazione del mezzo di montaggio e di un vetrino coprioggetti dopo l'ultimo lavaggio. Le reazioni vengono osservate con un microscopio a fluorescenza dotato di filtri FITC appropriati. La comparsa di reazioni specifiche color verde mela a carico delle cellule di Leydig nel testicolo e delle cellule tecali nell'ovaio dimostra la positività di tali reazioni. Il titolo (reciproco della massima diluizione che fornisce la reazione positiva) può essere determinato eseguendo diluizioni seriali del siero.

## REAGENTI

### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8 °C. **Non congelare.** I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza, quando conservati e maneggiati secondo le indicazioni.

Non utilizzare se il reagente non è limpido o in presenza di un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25 °C) prima dell'uso.

Ricostituire il tampone di lavaggio a 1 litro con acqua distillata o deionizzata. Quando conservato a 2-8 °C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit.

### Precauzioni

Tutti i componenti di origine umana utilizzati sono stati testati per HBsAg, HCV, HIV-1, HIV-2 e HTLV-I, risultando negativi in base ai test richiesti dalla FDA. Gli emoderivati umani e i campioni dei pazienti vanno tuttavia considerati potenzialmente infettivi. Seguire le buone pratiche di laboratorio durante la conservazione, la preparazione, la distribuzione e lo smaltimento di questi materiali.<sup>7</sup>

**AVVERTENZA:** *il sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ) può reagire con le tubazioni di piombo e rame formando azidi metalliche estremamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, far scorrere abbondante acqua per prevenire l'accumulo di azidi. Il  $\text{NaN}_3$  è tossico se ingerito. Riferire immediatamente ogni incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.*

**Per garantire la validità dei risultati, seguire le istruzioni esattamente come appaiono nel presente foglio illustrativo del kit.** Non scambiare i componenti del kit con quelli di altre fonti. Seguire le buone pratiche di laboratorio per minimizzare la contaminazione microbica e crociata dei reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare i componenti del kit oltre la data di scadenza segnata sulle etichette.

IT

## Materiali forniti

[REF] 1112 Test IFI per gli StCAb su substrato ovarico di primati

[REF] 1113 Test IFI per gli StCAb su substrato testicolare di primati

I kit contengono reagenti sufficienti per eseguire 40 determinazioni.

10 x	[SORB SLD 4]	<b>4 vetrini per pozzetti con substrato ovarico di primati</b> per [REF] 1113.
10 x	[SORB SLD 4]	<b>4 vetrini per pozzetti con substrato testicolare di primati</b> per [REF] 1112.
1 x 0.5ml	[CONTROL + StCAb]*	<b>Controllo positivo</b> pronto per l'uso. Contiene siero umano positivo per StCAb.
1 x 0.5ml	[CONTROL -]*	<b>Controllo negativo</b> pronto per l'uso. Contiene siero umano.
1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC EB]*	<b>Coniugato FITC anti-IgG umane</b> contenente blu di Evan. Proteggere dalla luce.
1 x 5ml	[CONJ B]*	<b>Coniugato B.</b> Proteggere dalla luce.
1 x 60 ml	[BUF]*	<b>Diluyente tamponato.</b> Pronto per l'uso.
2 flacone	[BUF WASH]	Tampone fosfato isotonico. <b>Tampone di lavaggio in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.</b>
1 x 5ml	[MOUNTING MEDIUM]*	<b>Mezzo di montaggio.</b> Non congelare.
12 x	[COVER SLD]	<b>Vetrini coprioggetti.</b>
1 x		Modulo di refertazione.

## Componenti facoltativi

1 x 5ml	[IgG-CONJ FITC]*	[REF] 2100 <b>Coniugato FITC anti-IgG umane.</b> Proteggere dalla luce.
1 x 1ml	[EVANS]*	[REF] 2510 <b>Colorazione di contrasto blu di Evans</b>

\* Contiene <0,1% di NaN<sub>3</sub>

## Simboli utilizzati sulle etichette

[LOT] **Codice del lotto**

[REF] **Numero di catalogo**

[IVD] Per uso diagnostico *in vitro*

**e** Utilizzare entro

**t** Temperatura di conservazione

**!** Attenzione, vedere le istruzioni per l'uso

**S** Numero di test

**■** Fabbricante

## Materiali necessari ma non forniti

- Microscopio a fluorescenza
- Micropipetta o pipetta di Pasteur
- Pipette per sierologia
- Vaschetta per colorazione (ad es. vaso di Coplin)
- Provette piccole (ad es. 13 x 75 mm) e rastrelliera per provette
- Acqua distillata o deionizzata
- Contenitore da 1 litro
- Boccetta di lavaggio
- Salviette di carta assorbente.
- Camera di incubazione

## PRELIEVO E MANIPOLAZIONE DEL CAMPIONE

Per questa procedura utilizzare solo campioni di siero. I campioni che mostrano emolisi macroscopica, lipemia o contaminazione microbica possono interferire con le prestazioni del test e non devono essere utilizzati. Conservare i campioni a 2-8 °C per una settimana al massimo. Per conservazioni più prolungate, congelare i campioni di siero. Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuto dei campioni. Si raccomanda di analizzare i campioni congelati entro un anno.

## PROCEDURA

### Metodo del test

#### A. Screening:

**Passaggio 1** Diluire ogni siero del paziente **1:10** con il diluente tamponato fornito (0,1 ml di siero + 0,9 ml di diluente). Eseguire lo screening a più diluizioni aiuta a evitare il “fenomeno di prozona”. Per lo screening, **NON diluire i controlli positivo o negativo**. Mettere da parte i sieri non diluiti per determinare i titoli anticorpali se i test di screening sono risultati positivi.

**Passaggio 2** Rimuovere le buste con i vetrini dal frigorifero e lasciarle equilibrare a temperatura ambiente per **10-15 minuti**. Rimuovere con cautela i vetrini dalle loro buste senza toccare il substrato.

**Passaggio 3** Etichettare i vetrini e inserirli in camera di incubazione allineati con salviette di carta assorbente inumidite con acqua per prevenire l'essiccazione del substrato.

**Passaggio 4** Applicare **1 goccia** (circa 50 µl) del controllo negativo al pozzetto n. 1 e **1 goccia** di controllo positivo al pozzetto n. 2 spremendo delicatamente il flacone di plastica. Non riempire eccessivamente i pozzetti.

**Passaggio 5** Utilizzando una micropipetta o una pipetta di Pasteur, applicare **1 goccia** di siero diluito del paziente (circa 50 µl) agli altri pozzetti. Non riempire eccessivamente i pozzetti.

**Passaggio 6** Incubare i vetrini **3 ore a temperatura ambiente** nella camera di incubazione.

- Passaggio 7** Rimuovere un vetrino dalla camera di incubazione. Impugnare il vetrino tenendolo per l'estremità a linguetta e risciacquare delicatamente con circa **10 ml** di PBS utilizzando una pipetta oppure risciacquare il vetrino in un becher pieno di PBS. Non utilizzare la boccetta di lavaggio. Trasferire immediatamente il vetrino nel vaso di Coplin e lavare per **10 minuti**. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 8** Rimuovere i vetrini dal vaso di Coplin. Tamponare il bordo del vetrino su una salvietta di carta assorbente per rimuovere il PBS in eccesso. Collocare immediatamente il vetrino nella camera di incubazione. Capovolgere immediatamente il flacone contagocce del coniugato **FITC anti-IgG umane** e comprimerlo delicatamente per applicare **1 goccia** (circa 50 µl) a ogni pozzetto. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 9** Incubare **30 minuti a temperatura ambiente** nella camera di incubazione.
- Passaggio 10** Ripetere i **passaggi da 7 a 9**, ma nel **passaggio 8** utilizzare invece il **coniugato B**.
- Passaggio 11** Rimuovere un vetrino dalla camera di incubazione. Impugnare il vetrino tenendolo per l'estremità a linguetta e immergerlo in un becher contenente PBS per rimuovere il coniugato in eccesso. Collocare i vetrini in una vaschetta per colorazione piena di PBS per **10 minuti**. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti. Se desiderato, aggiungere al lavaggio finale **2-3 gocce** di colorazione di contrasto blu di Evans. **NOTA:** il lavaggio non appropriato può aumentare la fluorescenza di sfondo.
- Passaggio 12** Rimuovere un vetrino dalla vaschetta per colorazione. Tamponare il bordo del vetrino su una salvietta di carta assorbente per rimuovere il PBS in eccesso, applicare immediatamente **3 gocce** di mezzo di montaggio distribuito uniformemente su un vetrino coprioggetti e capovolgere il vetrino sul vetrino coprioggetti. Per rimuovere tutte le bolle d'aria, applicare una leggera pressione lungo il bordo del vetrino coprioggetti. Evitare qualsiasi movimento di quest'ultimo. Ripetere il processo con tutti i vetrini restanti.
- Passaggio 13** Cercare la fluorescenza specifica con un microscopio a fluorescenza e un ingrandimento di **200 x** o superiore.

I vetrini possono essere letti non appena preparati. Tuttavia, data la presenza di un agente antiscolorimento nel mezzo di montaggio, non si ha alcuna perdita significativa nell'intensità di colorazione se la lettura viene ritardata. I vetrini devono essere conservati al buio a 2-8 °C.

## **B. Determinazione dell'endpoint (titolazione)**

Un siero risultato positivo al test di screening può essere analizzato ulteriormente per determinare il titolo seguendo i **passaggi da 5 a 13**. Ogni esecuzione del test deve includere il controllo negativo non diluito, il controllo positivo **non diluito** e le diluizioni **1:2, 1:4, 1:8 e 1:16** del controllo positivo. Preparare le diluizioni duplici seriali del siero del paziente iniziando con **1:10**. Il titolo è il reciproco della

IT

massima diluizione che produce una reazione positiva. Se il titolo del controllo positivo rientra nei limiti definiti dalle specifiche del CQ allegate, possono essere refertati i livelli anticorpali del siero del paziente.

### Preparazione delle diluizioni seriali

Numerare quattro provette da 1 a 4. Aggiungere **0,9 ml** di diluente tamponato alla provetta 1 e **0,2 ml** alle provette successive. Pipettare **0,1 ml** di siero non diluito nella provetta 1 e miscelare accuratamente. Trasferire **0,2 ml** dalla provetta 1 alla provetta 2 e miscelare accuratamente. Continuare a trasferire **0,2 ml** da una provetta a quella successiva dopo la miscelazione per produrre le diluizioni previste come indicato nella seguente tabella:

<b>Provette</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Siero	0.1 ml			
	+			
Diluente tamponato	0.9 ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2 ml
Trasferimento		0.2 ml	0,2 ml	0.2 ml
Diluizione finale	1:10	1:20	1:40	1:80

### Controllo di qualità

Ogni esecuzione del test deve includere, sia un siero di controllo positivo, sia un siero di controllo negativo. Il controllo negativo non deve mostrare alcuna fluorescenza significativa. Il controllo positivo deve avere una colorazione specifica 2+ o maggiore. Se non vengono ottenuti i risultati previsti, il test deve essere ripetuto. Se persistono risultati inadeguati con i controlli, ciò può essere dovuto a:

- Torbidità. Gettare il controllo e utilizzarne un altro.
- Problemi con il sistema ottico del microscopio a fluorescenza. Questi possono includere: allineamento scorretto, utilizzo della lampadina oltre la durata utile prevista, eccetera.
- Vetrino lasciato asciugare durante la procedura.
- Preparazione scorretta delle diluizioni seriali del controllo.

**Testicolo:** il tessuto interstiziale tra i tubuli seminiferi del testicolo contiene le *cellule di Leydig* che sintetizzano l'ormone testosterone e mostrano una reazione citoplasmatica positiva come indicato nella Figura 1.

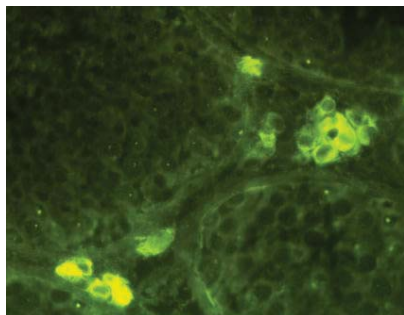


Figura 1. Reazione positiva sul testicolo.

**Ovaio:** in questa sede sono presenti tre tipi di cellule che producono ormoni steroidei.

1. *Cellule tecali* che circondano i follicoli in via di sviluppo.
2. Lipidi disseminati ricchi di *cellule stromali luteinizzanti*.
3. *Cellule stromali* enzimaticamente attive che mostrano una marcata attività enzimatica ossidativa e di altro tipo.

I sieri positivi per gli anticorpi anti-cellule steroidee colorano tutti e tre i tipi di cellule, ma fra queste l'orlo delle cellule tecali interne positive che circondano i follicoli sono quelle più facilmente identificabili come mostrato dalla Figura 2.

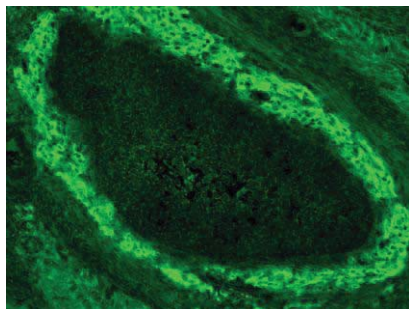


Figura 2. Reazione positiva sull'ovaio.

### **LIMITI DELLA PROCEDURA**

In alcuni casi, i sieri positivi per gli anticorpi anti-cellule steroidee possono essere molto deboli o negativi alla diluizione di screening iniziale (fenomeno di prozona). In questi casi dubbi, i sieri devono essere sottoposti a screening alle diluizioni maggiori e, se positivi, è necessario determinare i titoli anticorpali.



IT

La presenza in un siero di due o più anticorpi che reagiscono con lo stesso substrato, può causare un'interferenza nel loro rilevamento mediante immunofluorescenza. Questa interferenza può causare la mancata rilevazione degli StCAb o una soppressione del relativo titolo se l'anticorpo interferente ha un titolo superiore a quello degli anticorpi StCAb.

## VALORI PREVISTI

I valori previsti nella popolazione normale sono negativi. Reazioni positive sono associate alla sindrome poliendocrina autoimmune, all'insufficienza ovarica prematura e sono osservabili nelle donne sottoposte a fecondazione *in vitro*. La seguente tabella illustra l'incidenza di questi autoanticorpi:

### **Prevalenza degli autoanticorpi anti-cellule steroidee (StCAb)**

<b>MALATTIA</b>	<b>% INCIDENZA</b>
Insufficienza ovarica	
infertilità non selezionata/amenorrea	<1%
con malattia tiroidea autoimmune o diabete di tipo I	5-10%
con malattia di Addison	
- amenorrea primaria	100%
- amenorrea secondaria	60%
Malattia di Addison (senza insufficienza ovarica)	
- casi isolati	10-20%
- con ipoparatiroidismo/candidosi (sindrome polighiandolare autoimmune [APGS] tipo 1)	60-80%
- con malattia tiroidea autoimmune (APGS tipo 2)	25-40%
Tentativi di fecondazione <i>in vitro</i> >1	61%
APGS tipo 1 senza malattia di Addison	10%
Malattia tiroidea autoimmune del diabete mellito insulino-dipendente (IDDM - Insulin-Dependent Diabetes Mellitus)	<1%
Controlli sani	<1%

Gli anticorpi StCAb sono un marcatore per l'autoimmunità ovarica nell'infertilità. Lo screening degli autoanticorpi StCAb nella donna giovane potrebbe predire il rischio di infertilità futura, soprattutto nelle donne con anamnesi familiare di autoimmunità o menopausa prematura. In alcuni casi di insufficienza ovarica autoimmune, l'istituzione di un trattamento immunosoppressivo può condurre alla normalizzazione del ciclo mestruale e alla gravidanza, il che sottolinea la necessità di rilevare gli StCAb nelle pazienti con infertilità e la relazione funzionale dell'anticorpo con l'infertilità.

## REFERENCES

1. Sotsiou F, Bottazzo GF, Doniach D. Immunofluorescence studies on autoantibodies to steroid-producing cells, and to germline cells in endocrine disease and infertility. *Clin Exp Immunol* 1980; 39:97-111.
2. Moncayo R, Moncayo HE. Autoimmune endocrinopathies 4. The association of autoantibodies directed against ovarian antigens in human disease: a clinical review. *J Intern Med* 1993; 234:371-378.
3. Moncayo H, Moncayo R, Benz R et al. Ovarian Failure and Autoimmunity; Detection of autoantibodies directed against both the unoccupied lutenizing hormone/human chorionic gonadotropin receptor and hormone-receptor complex of bovine corpus luteum. *J clin invest* 1989; 84:1857-1865.
4. Betterle C, Volpato M, Pedini B et al. Adrenal-cortex autoantibodies and steroid-producing cells autoantibodies in patients with addison's disease: comparison of immunofluorescence and immunoprecipitation assays. *J Clin Endocrinol Meta* 1999; 84:618-622.
5. Barbarino-Monnier P, Gobert B, Guillet-Rosso F, et al. Antiovary antibodies, repeated attempts, and outcome of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1991; 56:928-932.
6. Hoek A, Wulffraat N, NM, Drexhage HA. Steroid cell in autoantibodies. JB Peter and Y Shoenfeld editors, Elsevier Publ. 1996; 798-804.
7. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health. [HHS Pub. No. (CDC) 1999, 93-8395].





*For technical assistance please contact:*

 **IMMCO Diagnostics,**  
Inc. 60 Pineview Drive  
Buffalo, NY 14228-2120 USA  
Telephone: (716) 691-0091  
Fax: (716) 691-0466  
Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST  
E-Mail: [info@immcodiagnostics.com](mailto:info@immcodiagnostics.com)

*or your local product distributor*



 EU Authorized Representative Autorizado/Représentant Autorisé  
EMERGO Europe  
Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,  
The Netherlands  
Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299  
[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)

NOV2014

Document No. PI4112