

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 1 de 9	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

## 1. APRESENTAÇÃO

Estabelecer um procedimento padrão para a análise do Fator antinuclear (FAN) na rotina do setor de Imunologia do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP).

## 2. QUEM

Técnicos de laboratório, biólogos, biomédicos e farmacêuticos-bioquímicos.

## 3. DEFINIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

A imunofluorescência indireta é o método de referência para detecção de anticorpos antinucleares, onde se utiliza, como substrato, células epiteliais humanas (HEp-2). Uma vez unidos, os anticorpos manifestam-se através de incubação com um anticorpo contra as imunoglobulinas humanas conjugado com fluoresceína e são visualizados por microscopia de fluorescência. As células HEp-2 expressam a maioria dos antígenos de importância clínica. Os reagentes deste kit estão ajustados para detectar anticorpos clinicamente relevantes, usando como substrato células HEp-2 e conjugado IgG, os quais eliminam resultados falsos positivos fisiológicos que ocorrem normalmente devido a baixos título de IgM específica.

Um teste positivo para ANA é um dos critérios para o diagnóstico de Lúpus eritematoso sistêmico (LES). Logo, um resultado negativo descarta um LES, porém não é específico, já que pacientes com outras enfermidades do tecido conjuntivo, tais como artrite reumatóide, esclerodermia, síndrome de Sjögren e dermatomiosite são frequentemente ANA positivos. Além do que, ANA positivo com títulos baixos também pode ser encontrado em infecções, neoplasias e indivíduos normais com idade avançada.

## 4. OBJETIVO

Detectar autoanticorpos associados a diversas doenças autoimunes.

## 5. MATERIAL

### 5.1. Material fornecido pelo kit

5.1.1. Lâminas Substrato: Lâminas com substrato ANA usando células HEp-2000® (com formas mitóticas) cultivadas e estabilizadas diretamente nos poços de teste.

5.1.2. Controle Positivo SS-A/Ro: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano positivo específico para o antígeno SS-A/Ro.

5.1.3. Controle Positivo Homogêneo: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano positivo específico para o DNA e/ou antígenos nucleares DNP.

5.1.4. Controle Positivo Pontilhado: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano positivo específico para os antígenos nucleares Sm e/ou RNP.

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página <b>2 de 9</b>	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

5.1.5. Controle Positivo Nucleolar: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano positivo específico para os antígenos nucleolares.

5.1.6. Controle Positivo Centromérico: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano positivo específico para centrômero cromossomal (cinetocore).

5.1.7. Soro Controle Titulável: Frasco pronto para uso contendo 0,5 ml de soro controle humano para ser tratado como uma amostra não diluída de paciente.

5.1.8. Soro Controle Negativo: Frasco conta-gotas pronto para uso, contendo 1,0 ml de soro controle humano.

5.1.9. Reagente Anticorpo Fluorescente: Soro anti-humano IgG de cabra (cadeias pesada e leve) conjugado com o isotiocianato de fluoresceína (FITC). Reagente pronto para uso em frascos conta gota de precisão com 9,0 ml para cada 10 lâminas fornecidas no kit.

5.1.10. Tampão PBS em pó: Tampão fosfato salino em pó (0,01 M, pH7,4  $\pm$ 0,2). Cada envelope contém tampão em pó suficiente para preparar um. Preparação: Dissolver um envelope de tampão em pó em um litro de água deionizada ou destilada, tampar e armazenar entre de 2-25°C por até 4 semanas ou até sinais de contaminação ou se outra mudança visível ocorrer.

5.1.11. Meio para Montagem semi-permanente: Frasco conta-gotas contendo 5,0 mL de meio para montagem a base de glicerol, pH 9,1.

5.1.12. Lamínulas: Cada pacote contém dez lamínulas de vidro 24 x 64 mm.

## 5.2. Material necessário, mas não fornecido pelo kit

- Microscópio de fluorescência;
- Tubos de ensaio para preparar diluições de soro;
- Pipetas de precisão volumétrica para dispensar volumes de 20-25  $\mu$ L;
- Ponteiras descartáveis;
- Jarra de Coplin ou similar;
- Pissetas ou pipetas Pasteur;
- Água destilada ou deionizada;
- Frasco para 1 litro (para o tampão PBS);
- Câmara de incubação;
- Papel absorvente;
- Estantes para tubos;
- Recipiente para descarte de material.

## 6. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página <b>3</b> de <b>9</b>	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

### 6.1. Princípio

O teste FAN utiliza uma técnica de fluorescência indireta para anticorpos. Amostras de pacientes são incubadas com substrato antigênico (HEp-2) que permite uma ligação específica dos autoanticorpos à célula, formando um complexo estável antígeno-anticorpo. Quando os resultados forem positivos, há formação de um complexo estável de três fases, que consistindo na ligação anticorpo fluorescente com o anticorpo antinuclear humano, o qual está ligado ao antígeno nuclear. Este complexo pode ser visualizado com a ajuda de um microscópio fluorescente. Em amostras positivas, partes das células HEp-2 terão fluorescência cor verde-maçã com um padrão de coloração característico da distribuição particular do antígeno nuclear dentro das células. Se a amostra para ANA for negativa, os núcleos não apresentarão um padrão claramente distinguível de fluorescência.

### 6.2. Amostra

Utilizar soro livre de hemólise, lipemia e contaminação. Os soros podem ser conservados em geladeira (2-8°C) até 72 horas. Para um tempo maior, devem ser guardados em freezer, a -20°C. Evitar repetidos congelamentos e descongelamentos.

### 6.3. Procedimento

- 6.3.1. Reconstituição do tampão (PBS): Dissolver o conteúdo de um envelope em um litro de água destilada. O tampão PBS pode ser armazenado a 2-25°C por até 4 semanas;
- 6.3.2. Diluição da amostra do paciente: **Triagem:** Diluir a amostra do paciente numa proporção de 1:40 através da adição de 0,05 mL (50 µL) de soro a 1,95 mL (1950 µL) de PBS reconstituído; **Titulação semi-quantitativa:** Para fazer uma série de diluições à razão 2 (isto é, 1:80, 1:160, 1:320, ..., 1:2560), utilizando PBS;
- 6.3.3. Preparo das lâminas de substrato: Retirar as lâmina(s) do(s) envelope(s) e colocar o soro ou controles como se segue: Inverter o frasco conta-gotas até que a gota seja visível. Cuidadosamente, tocar a gota do controle apropriado no poço evitando que a ponta do conta gotas toque na superfície da lâmina. Em seguida adicionar 1 gota (20-25 µl) da amostra do paciente diluído nos poços demarcados. NOTA: Para triagem geral, o controle positivo homogêneo é recomendado;
- 6.3.4. Incubação das lâminas: Colocar a(s) lâmina(s) em uma câmara úmida coberta (uma placa de Petri com papel toalha molhado já será adequado). Incubar, em local fechado, por trinta minutos (±5 minutos) à temperatura ambiente (18-25°C);
- 6.3.5. Enxague com PBS: Remover a(s) lâmina(s) da incubadora e lavar brevemente com PBS usando uma piseta ou Pipeta Pasteur. Não dispense o tampão diretamente nos poços. NOTA: Para evitar contaminação cruzada nos poços nas lâminas de 10, dispense o PBS ao longo da linha central da lâmina, inclinando primeiramente para os poços da primeira linha de 1 a 5 e posteriormente para os poços da segunda linha de 6 a 10;
- 6.3.6. Lavagem com PBS: Lavar a lâmina(s) durante 10 minutos com PBS em uma cuba de lavagem ou jarra Coplin. O tempo pode ser aumentado até 30 minutos sem variação no resultado. Descartar o PBS após o uso;
- 6.3.7. Reagente anticorpo fluorescente: Remover uma lâmina de cada vez do tampão e mergulhe de 3 a 5 vezes em água destilada ou deionizada. Bater as lâminas de lado contra papéis absorventes para remover o excesso de água. Retornar imediatamente a lâmina à câmara de incubação e cubra os poços completamente usando o Reagente de Anticorpo Fluorescente. Repetir o procedimento para

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 4 de 9	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

cada lâmina. O Reagente de Anticorpo Fluorescente foi titulado para compensar a água que tiver permanecido na lâmina depois do enxague. NOTA: é importante que o poço da lâmina não seque durante este procedimento ou danos ao substrato poderão ocorrer. Não secar a lâmina ou permitir que esta permaneça sem reagente de anticorpo fluorescente por mais de 15 segundos;

6.3.8. Incubação das lâminas: Colocar a lâmina na câmara úmida e cobrir com papel para prevenir exposição direta à luz se a câmara não for opaca. Incubar a(s) lâmina(s) em temperatura ambiente (18-25°C) por 30 minutos ( $\pm$  5 minutos);

6.3.9. Rinsar com PBS: Remover a(s) lâmina(s) da cuba e rinse rapidamente com PBS. Não direcionar o jato diretamente sobre os poços;

6.3.10. Lavagem com PBS: Lavar a(s) lâmina(s) com PBS durante 10 minutos em cuba de lavagem ou jarra Coplin. Esta lavagem pode ser estendida até 30 minutos sem alteração no resultado quando não é utilizado contra-coloração;

6.3.11. Montagem com lamínula: Remover uma lâmina de cada vez do tampão e mergulhar de 3 a 5 vezes na água destilada ou deionizada (Opcional). Bater as lâminas de lado contra papéis absorventes para remover o excesso de água. Não secar a lâmina ou permitir que esta permaneça sem lamínula por mais de 15 segundos. Adicionar 4 a 5 gotas de Meio de Montagem Semi-permanente ao longo da linha média de cada lâmina. Colocar cuidadosamente a lamínula na posição, evitando bolhas de ar, através do abaixamento da lamínula de uma extremidade da lâmina para outra. NOTA: Excesso de Meio de Montagem pode gerar um alto de fundo fluorescente, devido à dispersão da luz, ou a falta de resolução das células (imagem borrada). Excesso de Meio para Montagem pode ser removido da lâmina através da secagem suave da lamínula com papel absorvente evitando qualquer movimento direto na lamínula.

#### 6.4. Resultados

**Negativo:** Um soro é considerado negativo para FAN se a fluorescência da célula for menor ou igual ao controle negativo. O citoplasma pode apresentar fraca coloração, com coloração brilhante da região não cromossômica das células mitóticas, mas sem padrão nuclear claramente discernível.

**Positivo:** Um soro é considerado positivo se a célula apresentar um padrão claramente discernível de coloração na maioria das células na interfase.

**Titulação:** Ao ler a titulação, o recomendado é começar pelos poços de maior diluição e ir passando na ordem contrária, para a diluição de 1:40. O primeiro poço em que o padrão é claramente discernível é o ponto de parada da titulação independente da intensidade de coloração.

Aumento total de 200x é recomendado para testes de triagem, enquanto o aumento total de 400x é recomendado para reconhecimento do padrão e visualização das células mitóticas.

**CUIDADOS:** Alguns soros podem demonstrar coloração nuclear e citoplasmática sem padrão definido aparente. Este fenômeno geralmente é devido à anticorpos heterófilos e devem ser relatados como negativo

A intensidade de fluorescência pode ser semi-quantificada, seguindo-se diretrizes para os Reagentes de Anticorpo Fluorescente, estabelecidos pela CDC (*Center for Disease Control and Prevention*):

- ✓ 4+ Verde-amarelado brilhante (Fluorescência máxima): Contorno bem definido, centro

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 5 de 9	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

da célula nitidamente definido;

- ✓ 3+ Verde-amarelado menos brilhante: Contorno bem definido, centro da célula nitidamente definido;
- ✓ 2+ Padrão celular definido, mas com pouca fluorescência: Contorno pouco definido;
- ✓ 1+ Fluorescência reduzida: Contorno da célula quase indistinguível do centro da célula na maioria dos casos.

## 6.5. Interpretação

### Controle de qualidade:

Os controles positivos, negativos e PBS devem ser corridos em poços fornecidos para controle de qualidade em cada lâmina. O controle positivo deve apresentar uma fluorescência verde-maçã brilhante no núcleo das células, com padrão característico claramente discernível do soro controle que for utilizado. O controle negativo apresenta fluorescência verde fraca e não específica no citoplasma e núcleo, mas com padrão não discernível de coloração nuclear. O controle PBS é usado para observar padrões não específicos do anticorpo do reagente, e não deve apresentar fluorescência. Se os controles não estiverem como as características descritas, o teste é invalidado e deve ser repetido.

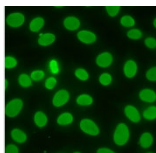
Exames de triagem: Relatar os resultados como positivos ou negativos a uma diluição 1:40 e os padrões de coloração devem ser relatados.

Exames de titulação: Relatar os resultados da última série de diluição em que foi visto uma coloração claramente discernível. Os resultados com forte reação a diluição 1:2560 devem ser relatados como maior que 1:2560. Títulos de 1:40 a 1:80 são considerados baixos títulos, 1:160 a 1:320 são considerados médios títulos e 1:640 e maiores, são considerado altos títulos.

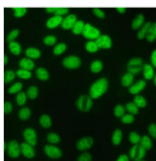
### Padrões:

Os padrões de fluorescência são constantemente atualizados pelo Consenso FAN. Atualmente são divididos em Nucleares, Citoplasmáticos e de Aparelho Mitótico:

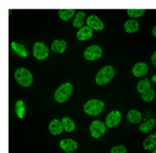
#### • NUCLEAR



- **Nuclear Homogêneo:** Fluorescência homogênea e regular por todo nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não, dependendo do substrato celular. Células em mitose (metáfase, anáfase e telófase) com cromatina corada intensamente de modo hialino homogêneo.



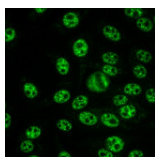
- **Nuclear Pontilhado Fino:** Fluorescência pontilhada de aspecto fino em todo o nucleoplasma. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metáfase, anáfase e telófase) apresentam placa não fluorescente.



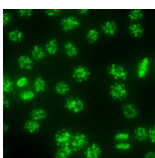
- **Nuclear Pontilhado Fino Denso:** Decoração pontilhada observada nos núcleos das células em intérfase, com característica heterogênea em relação ao tamanho, brilho e distribuição dos pontos. Os núcleos apresentam granulação

Tipo do Documento:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 6 de 9	
Título do Documento:	FATOR ANTINUCLEAR (FAN)	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

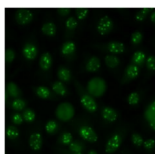
irregular com áreas de pontilhado mais denso entremeadas a áreas menos densas, gerando aspecto levemente rugoso característico do padrão. A placa metafásica apresenta padrão pontilhado com destaque para pontos grosseiros característicos.



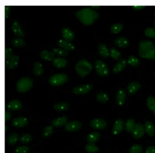
- **Nuclear Pontilhado Grosso:** Nucleoplasma totalmente pontilhado com pontos grosseiros. Os nucléolos podem ser corados ou não. Células em mitose (metáfase, anáfase e telófase) apresentam cromatina não fluorescente.



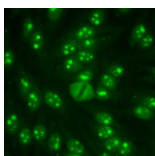
- **Centromérico:** Pontilhado grosseiro discreto (40-80/célula) nas células em interfase e alinhados na placa de cromatina nas células em mitose.



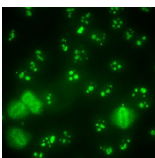
- **Múltiplos Pontos:** Pontos nucleares contáveis (6 a 20 pontos por célula).



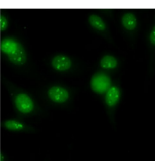
- **Raros Pontos:** Pontos nucleares isolados (1 a 6 pontos por célula na maioria das células). São conhecidos como corpos de Cajal ou "*Coiled bodies*".



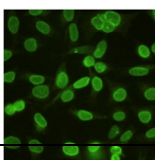
- **Nucleolar Homogêneo:** Fluorescência difusa de todo o nucléolo sem fluorescência da placa metafásica cromossômica.



- **Nucleolar Aglomerado:** Fluorescência dos nucléolos com contornos irregulares e dos corpos de Cajal com decoração peri-cromossômica da placa metafásica.



- **Nucleolar Pontilhado:** Nucléolos das células em interfase com aspecto pontilhado. Placa cromossômica das células em metáfase com até 5 pares de pontos isolados brilhantes na região organizadora dos nucléolos (NOR). O citoplasma das células em mitose pode se apresentar moderadamente positivo.

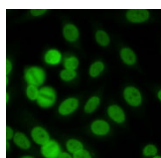


- **Membrana Nuclear Contínua:** Decoração homogênea do núcleo com grande

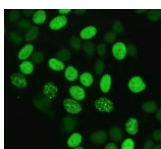


Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 7 de 9	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

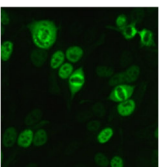
intensidade da membrana nuclear sem marcação da placa cromossômica durante a metáfase e anáfase. Observa-se acentuação característica da fluorescência nos locais de contato de células adjacentes.



- **Membrana Nuclear Pontilhada:** A membrana nuclear das células em intérfase apresenta fluorescência pontilhada característica, com acentuação da fluorescência nos pontos de contato entre células adjacentes. Não se verifica decoração da placa metaf sica das células em metáfase e anáfase.

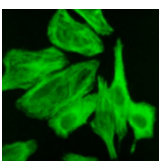


- **Pleomórfico PCNA-like:** Fluorescência pontilhada com aspecto pleomórfico apresentando variações no tamanho e intensidade dos pontos. Algumas células são negativas na intérfase (fase G1), algumas intensamente coradas (fase S) e outras com pontos dispersos no núcleo com fluorescência ocasional dos nucléolos (fase S final e início da fase G2). Células em mitose são negativas.

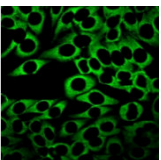


- **Pleomórfico CENP-F-like:** Padrão nuclear pontilhado com exuberante variabilidade na intensidade de fluorescência, intensa na fase G2 e negativa/moderada na fase G1. Os centrômeros são positivos somente na prometáfase e metáfase, demonstrando múltiplos e discretos pontos alinhados. As células durante a pr met fase apresentam fraca decoração do envelope nuclear. O citoplasma em torno das células em mitose apresenta-se difusamente corado.

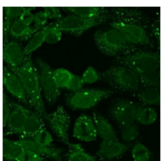
#### • CITOPLASMÁTICO:



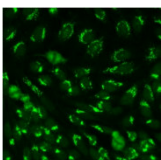
- **Fibrilar:** Padrão caracterizado por decoração das fibras do citoesqueleto ocasionalmente com depósitos granulares pequenos e descontínuos. Fluorescência característica dos filamentos estriados de actina caracterizando eixos longitudinais na célula. Pode ser subdividido em padrão Citoplasmático Fibrilar, Filamentar e Segmentar.



- **Pontilhado Fino:** Pontos pequenos e dispersos ao longo do citoplasma de aspecto homogêneo ou pontilhado fino denso (quando os pontos aparecem mais definidos). O padrão Citoplasmático Pontilhado Reticular apresenta decoração reticular grosseira estendendo-se a partir do citoplasma, é determinado por anticorpos anti-mitocôndria.

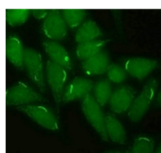


- **Pontos Isolados:** Fluorescência dos corpos citoplasmáticos nas células em intérfase, altamente expressos nas fases S/G2 tardias.



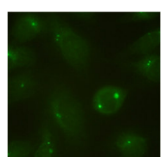
- **Pontilhado Polar / Golgi-like:** Pontilhado descontínuo perinuclear de aspecto granular com distribuição polar no citoplasma.

Tipo do Documento:	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)</b>	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página <b>8</b> de <b>9</b>	
Título do Documento:	<b>FATOR ANTINUCLEAR (FAN)</b>	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

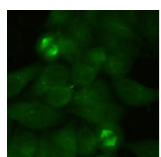


- **Anéis e Bastões:** Estruturas características em anéis e bastões no citoplasma das células em intérfase e em menor proporção no núcleo celular.

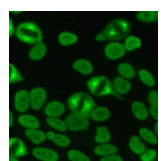
#### • APARELHO MITÓTICO:



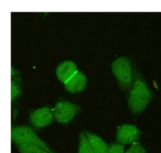
- **Centrossomo:** Reatividade dos centríolos (1 - 2 / célula) no citoplasma e nos polos do fuso mitótico.



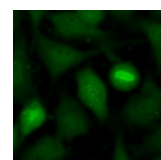
- **Fibras do Fuso:** Fluorescência das células mitóticas na região das fibras do fuso com decoração característica dos polos (cones mitóticos).



- **NuMA-like:** Misto do tipo nuclear pontilhado fino com fluorescência do aparelho mitótico.



- **Ponte Intercelular:** Decoração da ponte intercelular que conecta as células irmãs na fase final da divisão celular antes da separação das células filhas.



- **Envelope Cromossômico:** Coloração pontilhada dos cromossomos nos estágios de prometáfase e metáfase, sem fluorescência das células em intérfase

**NOTA:** Os padrões de fluorescência devem ser associados às dosagens de autoanticorpos específicos, além da associação aos dados clínicos.

## 7. REFERÊNCIAS

- Bula do kit Immuno Concepts Hep-2000®.


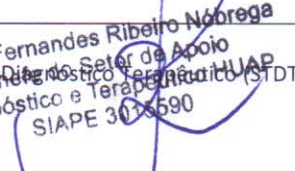
-Consenso Internacional de Anticorpos Antinúcleo (ICAP). Disponível em <https://www.anapatterns.org/index.php>, acessado em 10 de fevereiro de 2022.



Tipo do Documento:	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP)	POP.STDT.UACAP.PC.IM.005 - Página 9 de 9	
Título do Documento:	FATOR ANTINUCLEAR (FAN)	Emissão: Setembro/2022	Próxima revisão: Setembro/2024
		Versão: 01	

## 8. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
01	22/09/2022	Elaboração

<b>Elaboração/revisão</b>  <b>Nome:</b> Camila Silva de Siqueira <b>Função/Setor responsável:</b> Biomédica do Laboratório de Bioquímica  <b>Nome:</b> Julia Monassa Fioretti <b>Função/Setor responsável:</b> Biomédica do Laboratório de Imunologia	<b>Data:</b> 22 / 09 / 2022
<b>Validação</b>  <b>Nome:</b> Francisco Eduardo da Rocha Caldeira <b>Função/Setor responsável:</b> Chefe da Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica (UACAP) <b>Assinatura:</b>  <i>Francisco Eduardo da Rocha Caldeira Medico - Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica Chefe da Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica SIAPE 307009</i>	<b>Data:</b> 10 / 10 / 2022
<b>Nome:</b> Thais Fernandes Ribeiro Nobrega <b>Função/Setor responsável:</b> Chefe do Setor de Apoio Diagnóstico e Terapêutico (STDT) <b>Assinatura:</b>  <i>Thais Fernandes Ribeiro Nobrega Chefe do Setor de Apoio Diagnóstico e Terapêutico (STDT) SIAPE 3076590</i>	<b>Data:</b> 10 / 10 / 22