

ANA HEp-2

REF
HME 0060 Coffret
60
HME 0120 Coffret
120
HME 1600 Coffret
1600
HME 1006 10 Lames HEp-2 (6 puits)
HME 1012
10 Lames HEp-2 (12 puits)
HME 1016
10 Lames HEp-2 (16 puits)

DEFINITION

Le test **ANA HEp-2** (Anticorps Anti-Nucléaire) ([bmd](#)) est un dosage d'anticorps en fluorescence indirecte qui utilise des cellules HEp-2 pour la détermination qualitative et/ou semi quantitative des anticorps antinucléaires dans le sérum humain. Le test **ANA HEp-2** ([bmd](#)) est utilisé comme support au diagnostic de certaines maladies auto-immunes.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les anticorps anti-nucléaires (ANA) sont un groupe d'auto-anticorps caractérisés par la spécificité de nombreux déterminants antigéniques des noyaux cellulaires. Bien que le rôle des ANA dans la pathogénicité des maladies auto-immunes soit controversé, ils sont vraiment utiles comme marqueurs des maladies, principalement dans le dépistage et aussi le suivi des connectivites ^(1, 2, 3).

La corrélation entre la présence d'anticorps anti-nucléaire et le lupus érythémateux disséminé (LED) était très élevée, un test ANA négatif exclut cette maladie ⁽⁴⁾. Bien que les anticorps anti-ADN aient une grande corrélation avec le LED ⁽⁵⁾, d'autres anticorps ont une valeur diagnostique et/ou pronostique, notamment en cas de sclérodermie généralisée évolutive ^(6, 7), de connectivite mixte ⁽⁸⁾, de syndrome de Sjogren ⁽⁹⁾ et de polymyosite ⁽¹⁰⁾. Les tests ANA sont maintenant reconnus non seulement dans le cas des LED, mais aussi comme outil de dépistage général des connectivites ⁽¹¹⁾.

De nombreuses méthodes sont disponibles pour la détection des ANA : EIA, ELISA, Dot Blot et les techniques d'immunofluorescence indirecte (IF). Pour les trois premières méthodes, l'antigène peut aussi être : des auto-antigènes spécifiques, un mélange d'auto-antigènes provenant d'un lysat cellulaire ou une combinaison des deux. Ces méthodes ne sont pas aussi sensibles que l'IF et ne permettent pas non plus la détection de plusieurs auto-anticorps. Elles ne permettent pas non plus d'avoir un profil de reconnaissance d'aussi bonne qualité que l'IF. Les tests IF sont sensibles, dépistent une grande variété d'auto-anticorps connus ou inconnus et grâce aux aspects de reconnaissance, ils permettent de donner un aperçu de l'identité probable de l'auto anticorps et de la maladie auto-immune associée. Il s'agit de la méthode la plus courante dans les laboratoires ⁽²⁾ et la méthode de référence dans le dépistage semi-quantitatif des ANA.

Le test **ANA HEp-2** ([bmd](#)) utilise un substrat antigénique provenant d'une lignée cellulaire épithéliale humaine (HEp-2) déterminée par Moore, Sabachensky et Toolan ⁽¹²⁾. Les cellules HEp-2 ont montré une plus grande sensibilité que les coupes tissulaires et un meilleur taux d'identification des motifs. La présence de nombreuses figures mitotiques permet la différenciation des aspects mais également la détection d'anticorps nucléaires non signalés ^(14, 15). Les ANA sont retrouvés dans les principales classes d'immunoglobulines (IgG, IgA et IgM). Par conséquent, un conjugué anti-gammaglobuline humain est recommandé dans les tests ANA ⁽¹⁶⁾.

COMPOSITION DU COFFRET

		REF HME 0060	REF HME 0120	REF HME 1600				
<table border="1"> <tr> <td>SORB</td> <td>SLD</td> <td>n</td> </tr> </table> <p>Conservé dans leurs sachets d'emballage à +8°C ou moins, jusqu'à la date limite de péremption.</p>	SORB	SLD	n	Lames individuelles enveloppées de papier aluminium, avec des cellules HEp-2 fixées sur chaque puits.	10 lames x 6 puits	10 lames x 12 puits	100 lames x 16 puits + lamelles	
SORB	SLD	n						
<table border="1"> <tr> <td>CONJ</td> <td>FITC</td> <td>IgG</td> </tr> </table> <p>Conservé entre +2°C et +8°C à l'abri de la lumière directe jusqu'à la date limite de péremption indiquée.</p>	CONJ	FITC	IgG	Flacon compte-gouttes contenant des anticorps de chèvre anti-immunoglobuline humaine conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), avec 0,001% de Bleu d'Evans (contre-colorant), des protéines stabilisantes, de l'azide de sodium < 0,1% et du thimérosal < 0,001%.	1 x 3,5ml	2 x 3,5ml	4 x 20ml	
CONJ	FITC	IgG						
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>+</td> </tr> </table> <p>Conservé entre +2°C et +8°C jusqu'à la date limite de péremption.</p>	CONTROL	+	Flacon de contrôle positif ANA (sérum humain) (aspect homogène) contenant des protéines stabilisantes et 0,005% de thimérosal.	1 x 0,5ml	1 x 0,5ml	1 x 0,5ml		
CONTROL	+							
L'utilisation non diluée, tel qu'il est fourni, montre une intensité de fluorescence spécifique $\geq 3+$. Alternativement, ce contrôle positif peut être titré en point final. Dans ce cas, il devra être dilué en série dans du PBS. Les contrôles évalués par bmd indiquent sur l'étiquette du flacon les titres en point final qui ont été trouvés. En raison des variations de résultats dans chaque laboratoire (microscope fluorescent, etc) chaque laboratoire devra établir sa propre moyenne de titre pour chaque lot (en général une dilution à partir du point final établi).								
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>-</td> </tr> </table> <p>Conservé entre +2°C et +8°C jusqu'à la date limite de péremption.</p> <p>Le contrôle est prévu pour être utilisé non dilué, c'est-à-dire tel qu'il est fourni. L'intensité de la réaction doit apparaître < 1+.</p>	CONTROL	-	Flacon de contrôle négatif ANA (sérum humain) contient des protéines stabilisantes et 0,005% de thimérosal.	1 x 0,5ml	1 x 0,5ml			
CONTROL	-							
<table border="1"> <tr> <td>MM</td> </tr> </table> <p>Conservé entre +2°C et +8°C jusqu'à la date limite de péremption.</p>	MM	Flacon compte-gouttes de Milieu de Montage contenant une solution tampon de phosphate de glycérol (pH 7,4 \pm 0,2).	1 x 3,5ml	1 x 3,5ml				
MM								
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>A conserver entre +2°C et +8°C jusqu'à la date limite de péremption à condition qu'aucune contamination importante ne soit visible.</p> <p>Ne pas utiliser si la solution devient trouble ou si un précipité se forme.</p>	DIL	SPE	Flacon de diluant échantillon, contenant du thimérosal < 0,1%, formulé pour réduire les intensités non spécifiques.	1 x 60ml	1 x 60ml	3 x 250ml		
DIL	SPE							
<table border="1"> <tr> <td>BUF</td> <td>WASH</td> </tr> <tr> <td>RCNS</td> <td>1L H₂O</td> </tr> </table> <p>Conservé à une température $\leq +25^\circ\text{C}$ dans des sachets fermés hermétiquement jusqu'à la date limite de péremption</p>	BUF	WASH	RCNS	1L H₂O	Sachet de PBS en poudre permettant d'obtenir 1L de solution de Tampon de Lavage	2	2	
BUF	WASH							
RCNS	1L H₂O							

PRINCIPE DU TEST

Le test **ANA HEp-2** ([bmd](#)) utilise une méthode de dosage d'anticorps en fluorescence indirecte d'abord décrite par Weller et Coons⁽¹⁷⁾, et appliquée par Friou⁽¹⁸⁾, et Holman et Hunkel⁽¹⁹⁾.

La procédure se base sur deux étapes :

Étape 1 – Le sérum humain réagit avec le substrat antigénique. Les anticorps, s'ils sont présents, vont se lier avec les antigènes pour former des complexes anticorps-antigène stables. S'il n'y a pas d'anticorps, le complexe ne sera pas formé et les constituants du sérum seront éliminés lors du lavage.

Étape 2 – La fluorescéine marquée à l'anticorps anti-humain est ajoutée au complexe formé précédemment. Lorsque les résultats sont positifs, on observe au microscope à fluorescence une fluorescence vert pomme. Si aucun complexe n'est formé lors de la première étape, le conjugué marqué à la fluorescéine est lavé et le résultat apparaît négatif.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Flacon ou éprouvette graduée d'un litre
- Eau distillée
- Récipient à bouchon d'un litre
- Tubes à essais jetables et un portoir
- Pipettes sérologiques jetables
- Pipettes volumétriques de 10µl et 100µl, avec des cônes jetables
- Pipettes Pasteur
- Chambre humide
- Pissette en plastique
- Jarres Coplin ou cuves à coloration avec support pour lames
- Lamelles, No.1, 24 x 60 mm
- Stylo feutre noir à encre indélébile
- Microscope fluorescent équipé d'une source de lumière à mercure ou halogène à base de tungstène, d'un filtre d'excitation de 340-490 nm et un filtre d'émission de 515-520 nm, et d'un objectif permettant un grossissement total de 400x. La longueur d'onde d'excitation du FITC est de 490nm et la longueur d'onde d'émission est de 520nm

REACTIFS DISPONIBLES INDIVIDUELLEMENT

HME 1006	Lames HEp-2 (10 x 6 puits)
HME 1012	Lames HEp-2 (10 x 12 puits)
HME 1016	Lames HEp-2 (10 x 16 puits)
HME 9920	Conjugué FITC (20ml)
HME DIL250	Diluant IF (250ml)
HME MM	Milieu de montage (3,5ml)
HME PBS10	PBS en poudre (10x1l)
HME NEG	Contrôle Négatif ANA (0,5ml)
HME HOM	Contrôle positif Homogène (0,5ml)
HME NUC	Contrôle positif Nucléolaire (0,5ml)
HME RNP	Contrôle positif Moucheté/RNP (0,5ml)
HME ACA	Contrôle positif Centromère (0,5ml)
HME SSA	Contrôle positif SS-A (0,5ml)
HME SSB	Contrôle positif SS-B (0,5ml)
HME SCL	Contrôle positif Scl-70 (0,5ml)
HME 12CS	Lamelles de verre 24x60 (boîte de 100)
HME 16CS	Lamelles de verre 24x70 (boîte de 100)

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas utiliser un coffret ou un réactif dont la date de péremption est dépassée.

PREPARATION DES REACTIFS

PREPARATION DE LA SOLUTION TAMPON

Verser le contenu d'un sachet de PBS dans un récipient volumétrique d'1 litre, ajouter* de l'eau distillée jusqu'à la marque de graduation 1l, mélanger et laisser le mélange se dissoudre durant plusieurs heures ou toute une nuit. La solution tampon reconstituée doit avoir un pH de $7,4 \pm 0,2$.

Si la valeur du pH se situe en dehors de cette tranche, ajuster avec du 1N NaOH ou du 1N HCl. Conserver la solution tampon dans une bouteille propre et fermée par un bouchon à une température $\leq +25^\circ\text{C}$. La solution ainsi conservée reste stable pendant un mois à condition qu'aucune contamination importante ne soit visible. Ne pas utiliser si le pH change, si la solution devient trouble ou si un précipité se forme.

*Utiliser l'eau distillée avec prudence car le pH de cette eau peut varier et provoquer une grande instabilité sur le pH du PBS lors des conservations prolongées.

PRECAUTIONS D'EMPLOI

1. Réservé à l'usage de diagnostic *in vitro*.
2. Ne pas enlever les lames des sachets avant que tout soit prêt pour tester. Ne pas utiliser si le sachet a été percé, dans ce cas le sachet sera plat.
3. Tous les réactifs doivent être portés à température ambiante ($+20^\circ\text{C}$ - $+25^\circ\text{C}$) avant d'être utilisés.
4. Des résultats anormaux peuvent être rencontrés si les lames de substrat d'antigènes sèchent pendant la procédure de coloration.
5. La réfrigération (à $+2^\circ\text{C}$ - $+8^\circ\text{C}$) du kit immédiatement dès son arrivée assure sa stabilité jusqu'à la date limite de péremption indiquée.
6. Les réactifs ne doivent pas être utilisés après la date limite de péremption.
7. La substitution des composants par d'autres composants non fournis dans le coffret peut conduire à des résultats incorrects.
8. Ne pas exposer le conjugué à une lumière intense pendant le stockage ou l'utilisation.
9. Eviter la contamination microbienne de tous les réactifs impliqués dans le protocole afin d'éviter l'apparition de résultats incorrects.
10. Tout changement dans le protocole défini, comme les temps d'incubation ou les températures, peut donner des résultats erronés.
11. Les sérums lipémiques, hémolysés ou contaminés peuvent conduire à des résultats erronés.
12. Les échantillons congelés doivent être parfaitement mélangés et homogénéisés après décongélation avant d'être testés.
13. La verrerie réutilisable doit être lavée et parfaitement rincée.
14. Eviter les éclaboussures et la génération d'aérosol.
15. Conformément aux recommandations du niveau de biosécurité 2, les échantillons de patients et toute matière qui rentre en contact avec eux doivent être manipulés comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux, telles qu'indiquées dans le manuel CDC/NIH « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », Edition 1984.

Ne jamais pipeter avec la bouche. Eviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

16. Les sérums humains utilisés pour préparer les contrôles positifs et négatifs ont été testés et se sont révélés négatifs (non réactivité répétée) vis-à-vis de l'antigène HBs et des anticorps de l'hépatite C et anti-HIV 1 et 2 selon les méthodes approuvées par la FDA. Parce qu'aucun test ne peut assurer totalement leur absence comme celle d'autres agents infectieux, ces réactifs doivent être manipulés conformément aux recommandations du niveau de Biosécurité 2 du Manuel CDC/NIH « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories », Edition 1984 », comme pour tout échantillon de sérum ou de sang humain potentiellement infectieux.
17. Les conservateurs utilisés dans les conjugués et les contrôles sont toxiques par ingestion. Les azides peuvent réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations pour former des acides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment avec de l'eau, afin d'éviter toute accumulation de résidus.
18. Le **diluant IF** fournit par [lmd](#) doit être utilisé **UNIQUEMENT** comme diluant pour les échantillons de patients. Ne pas effectuer de dilution en série pour un titre en point final avec le diluant IF. Ne pas utiliser dans les étapes de lavage.

MODE OPERATOIRE

NOTE : Porter les lames et réactifs à température ambiante (+20°C-+25°C) avant usage.

1. PREPARATION DES ECHANTILLONS

Dépistage :






Préparer une dilution au 1/40 pour chaque sérum en ajoutant 0,01 ml (10 µl) de sérum à 0,39 ml de diluant IF ou de PBS.

REMARQUE : Prélever seulement la quantité de diluant nécessaire pour faire chacune des séries de tests afin de réduire les possibilités de contamination du produit.

Semi-quantification :

Le résultat significatif positif de dépistage doit être confirmé en répétant le test avec des dilutions du sérum. Chaque laboratoire doit établir son propre protocole de titration; cependant, la procédure suivante est suggérée :

- Préparer une dilution à 1/40 pour chaque sérum de patient en ajoutant 0,01 ml (10 µl) de sérum du patient à 0,39 ml de diluant IF ou de PBS.
- Ajouter 0,3 ml de PBS dans les tubes #2, #3, #4 et #5. (Ne PAS utiliser le Diluant IF pour les dilutions en série.)
- En utilisant une pipette de 100 µl, transférer 0,1 ml (100 µl) du tube #1 au tube #2. Mélanger. Puis, en utilisant un nouvel embout pour chaque dilution, transférer 0,1 ml (100 µl) du second tube au troisième, du troisième au quatrième, et du quatrième au cinquième, en mélangeant après chaque transfert. La gamme de titration avec les dilutions correspondantes est la suivante :

-  Tube #1 = 1/40
-  Tube #2 = 1/160
-  Tube #3 = 1/640
-  Tube #4 = 1/2560
-  Tube #5 : 1/10240

REMARQUE: Les Contrôles Positifs et Négatifs ne doivent pas être dilués. Cependant, si l'on effectue un test semi-quantitatif, le Contrôle Positif peut être dilué comme décrit précédemment. Cependant, **NE PAS utiliser le Diluant IF pour faire la dilution 1/40 ou toute autre dilution du Contrôle Positif.**

2. PREPARATION DES LAMES

Retirer autant de lames que nécessaires du réfrigérateur et les laisser s'équilibrer à la température ambiante (+20°C-+25°C) pendant au moins cinq minutes. Enlever les lames des sachets scellés en aluminium, en évitant tout contact avec la surface de la lame. Identifier chaque lame à l'aide d'un stylo noir indélébile.

3. DEPOT DE L'ECHANTILLON

En utilisant des pipettes Pasteur différentes, déposer une goutte (20-30µl) de chaque contrôle et une goutte de sérum dilué de chaque patient dans les puits individuels de la lame. Ne pas toucher la surface antigénique avec la pipette pendant le dépôt des gouttes. Eviter que les gouttes se mélangent car la contamination croisée des échantillons entre les puits peut entraîner des résultats erronés.

4. INCUBATION 1

Incuber dans une chambre humide à température ambiante (+20°C-+25°C) pendant 30 minutes.

NOTE : L'ANTIGENE NE DOIT PAS SECHER PENDANT L'UNE DES ETAPES SUIVANTES. Des liaisons non spécifiques peuvent apparaître si les réactifs sèchent sur la lame.

5. RINCAGE 1

Enlever les lames de la chambre humide une par une et rincer **DELICATEMENT** avec du PBS à l'aide d'une pissette de lavage. Ne pas centrer le jet de PBS directement sur les puits. Afin d'éviter les contaminations croisées incliner d'abord la lame sur le côté des puits 1-6 ou 1-8), et diriger le jet de PBS le long de la ligne médiane de la lame.

Ensuite, incliner la lame sur le côté des puits (7-12 ou 9-16) et répéter cette procédure, permettant ainsi au PBS de couler jusqu'à l'extrémité de la lame. Pour les lames de 6 puits, incliner la lame vers le bas et diriger le jet à travers la lame par-dessus les puits, en laissant le PBS couler jusqu'à l'extrémité de la lame.

6. LAVAGE 1

Placer les lames dans une jarre de Coplin ou une cuve à coloration et laver en changeant deux fois de tampon PBS pendant 5 à 6 minutes pour chaque lavage. Agiter délicatement au moment de l'immersion et du retrait de la lame du tampon PBS. Eliminer le PBS en excès si nécessaire et sécher la tranche de la lame avec du papier absorbant.

7. DEPOT DU CONJUGUE

Retirer les lames une par une, enlever le PBS en excès, sécher autour des bords extérieurs si nécessaire et remettre chaque lame dans la chambre humide. Utiliser le compte-goutte fourni et déposer une goutte de conjugué (30-50µl) dans chaque puit de la lame en faisant attention que le puit soit complètement recouvert.

8. INCUBATION 2

Incuber dans la chambre humide à température ambiante (+20°C-+25°C) pendant 30 minutes. Protéger les lames de la lumière excessive.

9. RINCAGE 2

Enlever les lames de la chambre humide et rincer **DELICATEMENT** avec le PBS à l'aide de la pissette de lavage. Comme suggéré dans l'étape 5, ne pas centrer le jet de PBS directement sur les puits.

10. LAVAGE 2

Placer les lames dans une jarre de Coplin ou une cuve à coloration et laver en changeant deux fois de tampon PBS pendant 5 à 6 minutes pour chaque lavage. Agiter délicatement au moment de l'immersion et du retrait de la lame du tampon PBS. Eliminer le PBS en excès si nécessaire et sécher la tranche de la lame avec du papier absorbant.

11. LAMELLE COUVRE-OBJET

Enlever les lames une par une du tampon de PBS, éliminer le tampon PBS en excès et ajouter immédiatement 2 à 4 gouttes de milieu de montage sur la ligne médiane de chaque lame. Pencher la lame sur le côté et reposer le bord de la lamelle contre le bas de la lame permettant au milieu de montage de former une goutte continue entre la lame et la lamelle. Abaisser délicatement la lamelle du bas de la lame vers le haut, en évitant de former des bulles d'air. Eliminer l'excès de milieu de montage en essuyant le bord de la lame avec un papier absorbant. Nettoyer le dessous de la lame.

12. LECTURE

Examiner les lames dès que possible en utilisant un microscope à fluorescence correctement équipé. Il est recommandé d'examiner les lames le jour même où elles ont été faites. En cas de lecture retardée, conserver les lames au réfrigérateur (+2°C-+8°C) à l'abri de la lumière directe et les lire le lendemain. Ne pas laisser sécher le milieu de montage entre lame et lamelle. Si le liquide s'évapore, ajouter du milieu de montage et recouvrir la lame.

L'intensité de fluorescence peut être semi-quantitative à l'aide des directives établies par le « Center for Disease Control », Atlanta, Géorgie. ⁽²⁰⁾

- 4+= Fluorescence maximale ; jaune vert intense
- 3+= Fluorescence jaune vert moins intense
- 2+= Faible fluorescence jaune vert terne
- 1+= Fluorescence très faible

Le degré d'intensité de fluorescence n'est pas cliniquement significatif et peut être seulement un indicateur pour le titre final de l'échantillon. Les différents types d'objectifs de microscope, de filtres et de sources lumineuses du microscope à fluorescence peuvent entraîner des variations de résultats d'un grade 1+ ou plus au niveau de l'intensité lumineuse lorsque la même lame est observée sur plusieurs microscopes différents.

CONTROLE DE QUALITE

Contrôle de spécificité

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série d'essai. Ces contrôles doivent être examinés avant de lire les échantillons tests et doivent démontrer les résultats suivants :

Contrôle négatif

En utilisant le SERUM DE CONTROLE NEGATIF fourni avec coffret **ANA HEp-2** ([bmd](#)), les cellules doivent présenter une intensité de fluorescence moins que 1+ fluorescence et apparaître rouge orangé à cause du contre colorant.

Contrôle positif

En utilisant le SERUM DE CONTROLE POSITIF fourni avec le coffret **ANA HEp-2** ([bmd](#)), les cellules doivent présenter une intensité de fluorescence de 3+ à 4+ avec un aspect homogène.

Chaque contrôle doit être conforme à la réaction attendue afin de valider le test. Si les contrôles n'apparaissent pas comme décrit auparavant, les résultats des tests ne sont pas valables et le test doit être recommencé.

Si malgré un deuxième essai les contrôles ne présentent toujours pas les aspects attendus, alors ne pas utiliser les résultats.

La spécificité du substrat antigénique peut être testée ultérieurement grâce à un panel d'anticorps antinucléaires. (Ceux-ci sont disponibles séparément chez [bmd](#)).

Contrôle de sensibilité

Un contrôle titrable est inclus dans chaque série d'essai pour déterminer la sensibilité du substrat, mais aussi contrôler le protocole, la qualité du conjugué et le système du microscope optique. Le titre attendu de chaque lot de contrôle de sérum positif ANA doit être déterminé. Il ne doit pas y avoir une différence de plus de deux dilutions par rapport à la valeur attendue. Chaque essai doit inclure la dilution ciblée ainsi qu'une quadruple dilution au dessus de la valeur cible et une quadruple dilution en dessous de la valeur cible. La dilution la plus concentrée doit être positive et la moins concentrée doit être négative. Si le contrôle ne se comporte pas de manière attendue, les résultats du test sont invalides et le test doit être recommencé. Si le contrôle ne présente toujours pas les aspects attendus, alors ne pas utiliser les résultats.

[bmd](#) propose en complément des contrôles prêts à l'emploi (voir § Réactifs disponibles individuellement) qui peuvent être testés en parallèle.

RESULTATS

NEGATIF

Une dilution de sérum est considérée comme négatif pour les anticorps antinucléaires si les cellules montrent une intensité de fluorescence inférieure ou égale à 1+ sans motif clairement visible. Les cellules vont apparaître rouge orangé à cause de la contre coloration du Bleu d'Evans.

Un échantillon est considéré négatif vis-à-vis des anticorps antinucléaires s'il présente une intensité de fluorescence inférieure à 1+ pour une dilution au 1:40 et ainsi que pour toutes dilutions plus importantes ou si la fluorescence observée ne présente pas de motif clair et visible.

... Les échantillons négatifs peuvent présenter des fluorescences légèrement plus intenses que le Contrôle Négatif mais inférieures à 1+.

... Certains sérums peuvent toujours montrer un faible degré de fluorescence cytoplasmique ou nucléaire sans motif clair et visible. Ce phénomène est généralement dû aux anticorps hétérophiles et doit être reporté comme négatif ⁽²¹⁾.

... Une coloration intense non nucléaire peut être observée dans certains sérums contenant des anticorps Anti-Mitochondries, Anti-Muscle Lisse, ou d'autres anticorps cytoplasmiques.

POSITIF

Une dilution de sérum est considérée comme positive pour les anticorps antinucléaires si la fluorescence présente une intensité supérieure à 1+ avec un motif clairement visible.

Un échantillon est considéré positif vis-à-vis des anticorps antinucléaires s'il présente un aspect caractéristique des colorations ANA avec une intensité de fluorescence 1+ ou plus pour une dilution de sérum au 1:40 ou plus.

Les anticorps antinucléaires multiples peuvent être présents dans un échantillon donné ; un type d'anticorps peut masquer la présence des autres.

Les dilutions successives des échantillons peuvent aider à distinguer ces aspects.

Noter tous les titres et les aspects correspondants.

TITRATION

Si une titration semi quantitative est réalisée, le résultat doit être communiqué comme l'inverse de la dernière des dilutions successives pour laquelle l'intensité de fluorescence vert pomme 1+ ou plus avec un discernement clair et visible est détecté. Lors de la lecture des quadruples dilutions successives, le titre peut être déterminé par extrapolation si nécessaire.

EXEMPLE D'EXTRAPOLATION :

- 1:40 = 3+
- 1:160 = 2+
- 1:640 = +/-
- 1:2560 = Nég

Le titre extrapolé est 320.

Reporter tous les titres et aspects détectés, extrapoler le titre si nécessaire.

EXEMPLE :

- 1:40 = 4+ Périphérique et 3+ Homogène
- 1:160 = 3+ Homogène
- 1:640 = 2+ Homogène et 3+ Moucheté
- 1:2560 = 1+ Homogène et 2+ Moucheté
- 1:10 240 = +/- Moucheté

Les titres sont 40 Périphérique, 2560 Homogène et 5120 Moucheté.

INTERPRETATION DES RESULTATS

Les quatre principaux aspects qui peuvent apparaître seuls ou en combinaisons ont été décrits :

1. Périphérique (villosité, bord, membrane)
2. Homogène (diffus, solide)
3. Moucheté (incluant ACA)
4. Nucléolaire

D'autres aspects moins fréquents incluent Fuseau et RNP ribosomal.

1. PERIPHERIQUE – coloration uniforme principalement autour de la région extérieure du noyau avec une fluorescence plus faible vers le centre. Les cellules du puits n'apparaissent pas toutes avec un aspect périphérique, certaines peuvent être homogène. La région chromosomique des cellules mitotiques présente un aspect positif brillant.

Note : Une ligne distincte très fine autour du noyau n'est pas un profil périphérique ANA, mais plutôt un anticorps anti-membrane nucléaire. Il diffère parce que la région du chromosome dans les cellules mitotiques est négative.

ANTIGENES NUCLEAIRES : ADNn ou histones.

ASSOCIATIONS CLINIQUES : des titres élevés en ADNn suggèrent un LED actif. Des titres plus faibles suggèrent un LED ou d'autres connectivités.⁽²²⁾

2. HOMOGENE – la fluorescence est uniforme sur le noyau entier avec ou sans effacement apparent des nucléoles. Certains échantillons peuvent présenter des régions irrégulières avec des fluorescences plus importantes ou un aspect granuleux peut apparaître, particulièrement lorsque l'anticorps atteint les dilutions cibles. La région chromosomique des cellules mitotiques présente un aspect positif brillant.

ANTIGENES NUCLEAIRES : ADNn, DNP ou histones.

ASSOCIATIONS CLINIQUES : les titres élevés suggèrent un LED tandis que les titres plus faibles suggèrent un LED ou une arthrite rhumatoïde.⁽⁵⁾

- a. Les anticorps anti-DNP ont les mêmes spécificités que les cellules facteurs LE.⁽¹¹⁾
- b. Les anticorps anti-histone seuls sont fortement associés avec le lupus induit par les drogues.⁽¹¹⁾

3. MOUCHETE – agrégats fluorescents dans tout le noyau qui peuvent être très fins ou grossiers en fonction du type d'anticorps présent. Un échantillon peut présenter plusieurs aspects de moucheté. La région chromosomique des cellules mitotiques est négative.

- a. Les anticorps Sm et RNPn présentent un aspect moucheté grossier avec une région chromosomique des cellules mitotiques négative.
- b. Les anticorps SSA/Ro et SSB/La présentent des petits aspects mouchetés uniformes avec une région chromosomique des cellules mitotiques négative.
- c. Les aspects denses et fins avec une fluorescence positive des nucléoles et de la région chromosomique des cellules mitotiques peuvent indiquer la présence d'anticorps anti-Scl 70.
- d. Une fluorescence variant d'un aspect moucheté fin à grossier, dans approximativement 30 à 60% des cellules présentant une fluorescence positive ou négative des cellules mitotiques peut être caractéristique d'anticorps anti-PCNA (Proliférating Cell Nuclear Antigen).

ANTIGENES NUCLEAIRES : Sm, RNPn, SSA/Ro, SSB/La, Scl 70 (ADN Topoisomérase 1) ou PCNA (Cycline).

ASSOCIATIONS CLINIQUES :

- a. Les anticorps anti-Sm sont très spécifiques des LED et semblent être un marqueur de cette maladie.⁽²³⁾
- b. Les anticorps anti RNP associés à d'autres types d'anticorps ANA ont été retrouvés dans la LED et les polyarthrites rhumatoïdes (AR) et les sclérodermies systémiques diffuses.

Les titres élevés d'anticorps anti-RNPn seuls sont caractéristiques des connectivités mixtes (MTCd).⁽²³⁾

c. Les anticorps SSA/Ro et SSB/La sont fréquemment présents chez les patients ayant un syndrome de Gougerot-Sjögren non associé avec une polyarthrite rhumatoïde. Les deux types d'anticorps sont moins fréquemment trouvés chez les patients avec un LED. Les anticorps SSA/Ro sont retrouvés chez un pourcentage important d'enfants ayant un bloc cardiaque auriculo-ventriculaire congénital, un lupus néonatal ou les deux.⁽²⁴⁾

d. Les anticorps anti-Scl 70 sont les marqueurs des sclérodermies systémiques diffuses.⁽²³⁾

e. Les anticorps anti-PCNA sont retrouvés chez un faible pourcentage de patients ayant un LED⁽¹⁵⁾.

4. ANTICORPS ANTI-CENTROMERE (ACA) – mouchetés discrets et uniformes dans tout le noyau, dont le nombre correspond à un multiple du nombre normal de chromosome. L'aspect fluorescent des cellules mitotiques suivra celui des paires de chromosomes homologues s'arrangeant entre eux dans la zone équatoriale durant la métaphase puis migrant vers les centrosomes durant l'anaphase.

Note : des anticorps ressemblant aux ACA sont les anticorps anti-pseudo centromère (ou NSp-1). Ils se distinguent des ACA car la région chromosomique ne se colore pas.⁽²⁵⁾

ANTIGENE NUCLEAIRE : centromère et portion des chromosomes.

ASSOCIATIONS CLINIQUES : cet anticorps est considéré comme un marqueur du CREST, une variante des sclérodermies systémiques diffuses.⁽²⁶⁾ Il est rarement retrouvé dans les sclérodermies diffuses et le syndrome de Raynaud.⁽²⁷⁾

5. NUCLEOLAIRE – la coloration fluorescente des nucléoles du noyau nettement séparé du nucléoplasme non coloré. La fluorescence nucléolaire peut être homogène, mouchetée ou avec de gros grains. Ils sont fréquemment accompagnés par l'aspect moucheté.

ANTIGENES NUCLEAIRES : PM/Scl (PM-1), ARN Polymérase 1 ou fibrillarine (U3).⁽²⁸⁾

ASSOCIATIONS CLINIQUES : les titres élevés sont très spécifiques des sclérodermies systémiques progressives (PSS). Les titres plus faibles se retrouvent pour les PSS, les LED, les syndromes de Sjögren et de Raynaud.^(29,30)

6. ANTICORPS ANTI-FUSEAU – un réseau de filaments reliant les centrosomes les uns aux autres dans les cellules mitotiques.

ANTIGENE NUCLEAIRE : appareil de fuseau dans les cellules en cours de mitose.

ASSOCIATIONS CLINIQUES : il peut y avoir des associations avec le syndrome du Canal Carpien.

7. FLUORESCENCE CYTOPLASMIQUE :

- a. RNP ribosomal (RNPr) – fluorescence granuleuse diffuse dans le cytoplasme. Peut être confirmé en testant l'échantillon sur une coupe d'estomac où le sommet des cellules est coloré. Ils sont accompagnés fréquemment d'aspects nucléolaire.

ANTIGENE NUCLEAIRE : RNP ribosomal ou cytoplasmique.

ASSOCIATIONS CLINIQUES : cet anticorps est retrouvé dans un pourcentage faible de LED.⁽³¹⁾

- b. Fluorescence Cytoplasmique non-ANA : Les deux auto anticorps les plus communs sont :

1) *Les anticorps anti-mitochondrial (AMA) - moucheté discret concentré dans le cytoplasme dans un réseau fibreux avec un moucheté plus dense vers la région périnucléaire. Leur présence peut être confirmée sur des lames de substrat appropriées.*

2) *Les anticorps anti-muscles lisses (ASMA) – Brins fluorescents dans le cytoplasme dans un réseau fibreux, avec des fibrilles s'étendant à partir de la membrane cellulaire. Leur présence peut être confirmée sur des lames de substrat appropriées.*

**CORRELATION ENTRE LES ANA PRESENTS
ET L'ASPECT DE LA COLORATION IMMUNOFLOUORESCENT**

Anticorps Contre :	Aspect de la coloration :	Cellules Mitotiques :
nDNA	Périphérique et Homogène	Positif
Histones	Périphérique et Homogène	Positif
DNP	Homogène	Positif
Sm	Moucheté Grossière	Négatif
nRNP	Moucheté Grossière	Négatif
SS-A	Petite Moucheté Uniforme	Négatif
SS-B	Petite Moucheté Uniforme	Négatif
Scl-70	Moucheté fine dense & nucléolaire	Positif
PCNA	Moucheté Variable	Négatif ou Positif
ACA	Moucheté Uniforme Discrète	Centromères Positif
PM/Scl	Nucléolaire (homogène)	Négatif
RNA Polymérase 1	Nucléolaire (moucheté)	Mouchetés discrètes (peu)
Fibrillarin	Nucléolaire (gros grains)	Fibres Positif
Fuseau	Appareil de fuseau	
rRNP	Cytoplasmique	Négatif

LIMITES

- Les résultats des tests ANA sérologiques doivent être interprétés en fonction des informations issues de l'évaluation clinique et d'autres analyses de diagnostiques.
- 2 à 10% de la population adulte normale ont des anticorps antinucléaires.⁽³²⁾
- La présence d'anticorps ANA est liée à l'âge et au sexe du patient. La présence d'ANA augmente avec l'âge. De plus, un titre faiblement positif peut être normal pour certains individus en absence d'autres signes ou symptômes cliniques. Les ANA ne sont pas toujours trouvés chez les patients jeunes normaux.
- Certaines réactions positives retrouvées chez des parents de patients souffrant de connectivites, ont pu développer la maladie plus tard.⁽³³⁾
- Les résultats positifs obtenus avec des échantillons de sang de cordon ou de nouveau-né sont sujet à caution. La présence d'ANA dans le sang de cordon ombilical peut résulter de la diffusion passive de la mère au fœtus. Un test négatif, cependant peut être utile pour l'exclure un éventuel procédé d'auto-immunité.
- Les résultats ANA peuvent apparaître positifs pour un faible pourcentage de patients développant des infections et/ou des néoplasmes ou encore en présence de maladies liées à la drogue.^(22,34)
- Les patients souffrant de LED en thérapie stéroïdienne ou en rémission peuvent avoir un test ANA négatif.⁽¹¹⁾
- Les résultats positifs ne sont pas valides pour les personnes ayant subit une transfusion sanguine ou différents produits sanguins dans les mois derniers.
- Les résultats des tests des patients immunodépresseurs ou des femmes enceintes sont difficilement interprétables.
- Les réactions finales peuvent varier d'un laboratoire à un autre en fonction du type de microscope à fluorescence employé et du protocole utilisé.⁽³⁵⁾
- Si les contrôles positif et négatif de la lame de substrat ne sont pas visibles au microscope à fluorescence, il est probablement nécessaire de remplacer ou de réaligner la source de lumière et de contrôler les filtres spécifiques.
- Les lames de cultures de substrat peuvent présenter des fluorescences non spécifiques causées par la contamination des anticorps par des bactéries ou des fungi ou par les solutions de lavage/rinçage PBS. Il est très important que le personnel qui effectue la lecture des résultats de la fluorescence ait de l'expérience en microscopie fluorescente.
- En général, les titres 1/40 et 1/80 sont considérés comme de faibles titres, les 1/160 et 1/320 comme des titres moyens et les 1/640 et plus comme des titres forts. Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres gammes de référence.

VALEURS ATTENDUES

Le tableau suivant présente l'incidence des anticorps antinucléaires utilisant un substrat ANA de cellule HEp-2 dans les études de population de patients effectuées dans les laboratoires de Duke University Medical Center Division of Rheumatic and Genetic Disease pendant une période deux ans. Cela représente une étude de plus de 9000 contrôles de sérums et de plus de 4500 sérums anormaux.

Diagnostic clinique	% Positif	Diagnostic clinique	% Positif
Contrôles :		Vascularites	20.0%
20-60 ans	2.0%	Enfance LED	64.0%
70-80 ans	3.5%	JAR	
LED	95.0%	Systémique	14.0%
RA	40.0%	Polyarthrite	6.0%
MCTD	99.0%	Pauciarticular	
PSS (Diffus)	85.0%	HLA B27 pos.	0.0%
PSS (variante CREST)	93.0%	HLA B27 neg.	26.0%
PM/DM	25.0%		

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Pour rechercher la spécificité et la sensibilité relative du test ANA HEp-2, cent vingt échantillons de sérum ont été comparés qualitativement et semi-quantitativement avec un autre test ANA HEp-2 disponible dans le commerce. Tous les tableaux représentent la moyenne des résultats de deux lecteurs indépendants.

La sensibilité et la spécificité relative sont résumées dans le Tableau 1. Le seul échantillon dans lequel les 2 coffrets n'ont pas donné les mêmes résultats était un sérum de référence CDC ayant des niveaux élevés d'anticorps SS-A.

TABLEAU 1 – TEST DE COMPARAISON RELATIVE

		ANA HEp-2		bmd Sensibilité Relative	bmd Spécificité Relative
		Positif	Négatif		
AUTRES COFFRETS	Positif	71	0	100%	100%
	Négatif	1	48		

Légende : H = aspect homogène, S = aspect moucheté, C = anticorps anti-centromère, N = aspect nucléolaire, cR = cRNP antibody (aspect cytoplasmique). Le TABLEAU 2 représente les titres et les aspects obtenus avec les 72 échantillons du tableau 1.

TABLEAU 2 – TEST DE SENSIBILITE RELATIVE

Echant #	BMD	Autre	Echant #	BMD	Autre	Echant #	BMD	Autre
1	80 H	80 H	25	40 S	40 S	49	320 S	160 S
2	40 H	40 H	26	80 S	80 S	50	640 S	640 S
3	80 H	40 H	27	80 S	40 S	51	640 S	160 S
4	40 H	40 H	28	40 S	40 S	52	160 S	40 S
5	160 H	80 H	29	40 S	40 S	53	2560 S	320 S
6	320 H	160 H	30	80 S	40 S	54	1280 S	640 S
7	1280 H	640 H	31	2560 S	2560 S	55	640 S	640 S
8	5120 H	2560 H	32	10240 S	5120 S	56	2560 S	2560 S
9	5120 H	5120 H	33	2560 S	40 S	57	160 S	< 40
10	640 H	320 H	34	640 S	640 S	58	640 S	320 S
11	10240 H	10240 H	35	2560 S	640 S	59	80 S	40 S
12	2560 H	1280 H	36	320 S	320 S	60	40 S	40 S
13	640 H	320 H	37	1280 S	1280 S	61	640 S	320 S
14	1280 H	640 H	38	10240 S	5120 S	62	640 C	640 C
15	640 H	320 H	39	5120 S	40 S	63	10240 C	5120 C
16	640 H	320 H	40	5120 S	640 S	64	320 C	320 C
17	1280 H	1280 H	41	10240 S	5120 S	65	640 C	320 C
18	1280 H	640 H	42	640 S	1280 S	66	1280 N	1280 N
19	640 H	320 H	43	10240 S	5120 S	67	640 N	320 N
20	80 H	40 H	44	160 S	160 S	68	320 N	160 N
21	1280 H	640 H	45	10240 S	10240 S	69	160 N	160 N
22	80 S	80 S	46	5120 S	5120 S	70	80 N	80 N
23	40 S	40 S	47	160 S	160 S	71	320cR	640cR
24	320 S	320 S	48	160 S	80 S	72	640S/160H	160 H

Tous les échantillons sauf neuf ont été trouvés conformes pour une dilution en double. Les neuf échantillons de sérum discordants ont été caractérisés par des tests additionnels comme suit :

- les échantillons 33, 39, 57 (Serum de Référence CDC) et 72 ont été caractérisés comme ayant des anticorps dirigés contre les SS-A.
- l'échantillon 35 a été caractérisé comme ayant des anticorps dirigés contre le Scl-70.
- l'échantillon 40 a été caractérisé comme ayant des anticorps dirigés à la fois contre les SS-A et les SS-B.
- l'échantillon 53 (CDC Sérum de référence) a été caractérisé comme ayant des anticorps contre SS-B.
- les échantillons 51 et 52 n'ont pas pu être caractérisés par des tests supplémentaires

La précision interlot du test **ANA HEP-2** ([bmd](#)), resumée dans le tableau 3, a été évaluée en testant 11 échantillons de sérums (2 négatifs et 9 positifs avec des titres différents), sur trois jours successifs en utilisant trois lots différents. Il n'y a pas eu de différence de titre supérieure à (+/-) 2 entre tous ceux testés, cela reste dans les limites de confiance de cette méthodologie.³⁵

La précision intralot du test **ANA HEP-2** ([bmd](#)), resumée dans le tableau 4, a été évaluée en testant 3 fois dans une série, neuf échantillons différents contenant des anticorps antinucléaires et en utilisant trois lames différentes provenant d'un même lot. Là encore, il n'y a pas eu de différence de titre supérieur à (+/-) 2.³⁵

TABLEAU 3 – PRECISION INTERLOT

Echant n°	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1	160 N	160 N	160 N
2	160 S	160 S	80 S
3	320 S	640 S	320 S
4	2560 S	2560 S	1280 S
5	640 H	1280 H	1280 H
6	<40	<40	<40
7	320 C	640 C	640 C
8	40 S	80 S	40 S
9	<40	<40	<40
10	2560 S	5120 S	2560 S
11	2560 S	5120 S	2560 S

TABLEAU 4 – PRECISION INTRALOT

Echant n°	Test #1	Test #2	Test #3
1	1280 N	1280 N	1280 N
2	320 H	320 H	320 H
3	1280 S	1280 S	1280 S
4	1280 C	1280 C	1280 C
5	2560 S	5120 S	5120 S
6	320 S	320 S	320 S
7	320 S	320 S	320 S
8	80 cR	80 cR	80 cR
9	320 S	320 S	320 S

BIBLIOGRAPHIE

- Tan, E., Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology, *Adv. Immuno.*, 44:93-151, 1989.
- Nakamura, R., C. Peebles, R. Rubin, et al, Autoantibodies to Nuclear Antigens, 2nd éd., ASCP, Chicago, 1985.
- Tan, E., E. Chan, K. Sullivan, et al, Antinuclear Antibodies (ANA's): Diagnostically Specific Immune Markers and Clues Toward the Understanding of Systemic Autoimmunity, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 47:121-141, 1988.
- Barnett, E.V., Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens, *California Medicine*, 104:463-469, 1966.
- Casais, S.P., G.J. Friou, L.L. Meyers, Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus, *Arth. Rheum.*, 7:379-390, 1964.
- Douvas, A.S., M. Achten, E.M. Tan, Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma, *J. Biol. Chem.*, 244:10514-10522, 1979.










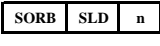




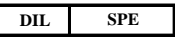
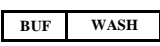
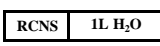


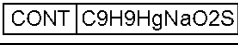
- Moroi, Y., C. Peebles, M.J. Fritzler, et al, Autoantibody to Centromere (Kinetochore) in Scleroderma Sera, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:1627-1631, 1980.
- Sharp, G.C., W.S. Irwin, E.M. Tan, et al, Mixed Connective Tissue Disease – An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to an Extractable Nuclear Antigen (ENA), *Am. J. Med.*, 52:148-159, 1972.
- Alsaugh, M.A., W. Talal, E.M. Tan, Differentiation and Characterization of Autoantibodies and their Antigens in Sjogrens Syndrome, *Arth. Rheum.*, 19:216-222, 1976.
- Wolfe, J.F., E. Adelstein, G.C. Sharp, Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis, *J. Clin. Invest.*, 59:176-178, 1977.
- Nakamura, R.M., CL. Peebles, D.P. Molden, E.M. Tan, Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, *Lab. Med.*, 15:190-198, 1984.
- Moore, A.E., L. Sabachewsky, H.W. Toolan, Culture Characteristics of Four Permanent Lines of Human Cells, *Cancer Res.*, 15:598-602, 1955.
- McCarty, G.A., J.R. Rice, Characterization and Comparison of Commercially Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera, *J. Rheum.*, 7:339-347, 1980.
- McCarty, G.A., et al, A Unique Antinuclear Antibody Staining Only the Mitotic Spindle Apparatus, *New Engl. J. Med.*, 305:703, 1981.
- Miyachi, K., M.J. Fritzler, E.M. Tan, Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells, *J. Immunol.*, 121:2228-2234, 1978.
- Schur, P.H., M. Moore, N. Rothfield, The Subclass of Antinuclear and Antinucleic Acid Antibodies, *Arth. Rheum.*, 15:174-180, 1972.
- Weller, T.H., A.H. Coons, Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpès Zoster Propagated In Vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:789-794, 1954.
- Friou, F.J., Clinical Application of Lupus Serum-Nucleoprotein Reaction Using the Fluorescent Antibody Technique, *J. Clin. Invest.*, 36:890, 1957.
- Holman, H.R., H.G. Kunkel, Affinity between the Lupus Erythematosus Serum Factor and Cell Nuclei and Nucleoprotein, *Science*, 126:162-163, 1957.
- Lyerla, H.C., F.T. Forrester, The Immunofluorescence (IF) Test, in *Immunofluorescence Methods in Virology*, USDHHS, Georgia, 71-81, 1979.
- Peter, J.B., R.L. Dawkins, Evaluating Autoimmune Diseases, *Diag. Med.*, 1-10, Sept/Oct 1979.
- Notman, D.D., N. Kurata, E.M. Tan, Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases, *Annals Intern. Med.*, 83:464-469, 1975.
- Nakamura, R.M., CL. Peebles, R.L. Rubin, et al, Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA), ASCP, Chicago, 1985.
- Molden, D.P., ANA Profiles in Systemic Rheumatic Disease, *Diag. Med.*, 12-18, June 1985.
- Fritzler, M.J., D.W. Valencia, G.A. McCarty, Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies, *Arth. Rheum.*, 27(1):92-96, 1984.
- Fritzler, M.J., T.D. Kinsella, E. Garbutt, The CREST Syndrome: A Distinct Sérologie Entity with Anticentromere Antibodies, *Am. J. Med.*, 69:520-526, 1980.
- Tan, E.M., G.P. Rodnan, I. Garcia, et al, Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis, *Arth. Rheum.*, 23:617-625, 1980.
- Penning, C, V. Steen, G. Reimer, et al, An Analysis of Systemic Sclerosis Patients with Autoantibodies to the Nucleolar Proteins PM-Scl, RNA Polymerase I and Fibrillarin, *A.R.A. Mtg.*, D29, 1987.
- Pinnas, J.L., J.D. Northway, E.M. Tan, Antinucleolar Antibodies in Human Sera, *J. Immunol.*, 111:996-1004, 1973.
- Ritchie, R.F., Antinucleolar Antibodies: Their Frequency and Diagnostic Association, *New Engl. J. Med.*, 282:1174-1178, 1970.
- Bianchi, F.B., M. Rizzetto, P. Penfold, et al, Ultrastructural Localization and Characterization of a Ribosomal Antibody Detected by Immunofluorescence in Systemic Lupus Erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.*, 17:629-636, 1974.
- Rothfield, N.F., Detection of Antibodies to Nuclear Antigens by Immunofluorescence, *Manual of Clinical Immunology*, ASM, Washington D.C., 85:647-651, 1976.
- Pollack, V.E., Antinuclear Antibodies in Families of Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *New Engl. J. Med.*, 271:165-171, 1964.
- Tan, E.M., M.J. Fritzler, P.A. Reyes-Lopez, Autoantibodies as Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects, Elsevier-North Holland, New York, 1978.
- Cleymaet, J.E., R.M. Nakamura, Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates, *Am. J. Clin.Path.*, 58:388-393, 19

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

	QUANTITE A DISTRIBUER	RÉACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATION
DÉPOT DES ECHANTILLONS	1 goutte (~20-30µl) 1 goutte (~20-30µl) 1 goutte (~20-30µl)	Contrôle Négatif Contrôle Positif Echantillon dilué	30 min à T.A <u>en chambre humide</u>
RINÇAGE 1	A l'aide d'une pissette de lavage, rincer DELICATEMENT avec le tampon PBS		
LAVAGE 1	Laver les lames dans une cuve de coloration ♣ Changer 2x le tampon PBS		5 à 6 minutes
DÉPOT DU CONJUGUÉ	1 goutte (~20-30µl)	Conjugué FITC	30 min à T.A <u>en chambre humide</u>
RINÇAGE 2	A l'aide d'une pissette de lavage, rincer DELICATEMENT avec le tampon PBS		
LAVAGE 2	Laver les lames dans une cuve de coloration ♣ Changer 2x le tampon PBS		5 à 6 minutes
LECTURE	2 à 4 gouttes	Milieu de montage	

T.A : Température Ambiante (+20°C/+25°C)

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Limites de température		Référence produit
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Communauté Européenne
	Lame avec n puits		Contrôle négatif		Milieu de montage
	Conjugué immunofluorescent		Contrôle positif pour le paramètre X		Diluant IF
	Solution de lavage		A reconstituer avec 1L d'eau distillée		Test en immunofluorescence indirecte
	Contient de l'azide de sodium			Contient du thimerosal	

BioMédical Diagnostics SA



Siège Social
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France



Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

ANA HEp-2

REF	HME 0060	Kit		HME 0120	Kit		HME 1600	Kit	
	HME 1006	10 Slides HEp-2 (6 wells)		HME 1012	10 Slides HEp-2 (12 wells)		HME 1016	10 Slides HEp-2 (16 wells)	

DEFINITION


The **ANA HEp-2 (Anti-Nuclear Antibody)** () test is an indirect fluorescent antibody assay utilizing HEp-2 tissue culture cells as a substrate for the qualitative and/or semi-quantitative determination of antinuclear antibodies in human serum. The **ANA HEp-2** () test is intended for use as an aid in the diagnosis of certain autoimmune diseases.

SUMMARY AND EXPLANATION

Antinuclear antibodies (ANA) are a group of auto-antibodies characterized by specificity for numerous antigenic determinants of cell nuclei. While the role of ANA's in the pathogenesis of autoimmune disease is controversial, they are quite useful as disease markers, primarily for diagnostic screening and also to monitor the course of connective tissue diseases. ^(1,2,3)

Because of the high correlation of positive antinuclear antibodies with SLE a negative ANA essentially rules out this disease. ⁽⁴⁾ Although antibodies specific to DNA have a high correlation with SLE, ⁽⁵⁾ antibodies to a number of other nuclear antigens appear to be of diagnostic and/or prognostic significance in diseases such as Progressive Systemic Sclerosis, ^(6,7) Mixed Connective Tissue Disease, ⁽⁸⁾ Sjogren's Syndrome, ⁽⁹⁾ and Polymyositis; ⁽¹⁰⁾ making ANA testing useful not only for SLE, but as a general screening tool for connective tissue diseases. ⁽¹¹⁾

Among the methodologies available to detect ANA's are EIA, ELISA, Dot Blot and the Indirect Fluorescent Antibody (IFA) technique. The antigen for the first three methods can either be a spectrum of clinically significant, specific auto-antigens, a single mixture of auto-antigens from a cell lysate, or a combination of the two. These methods are not as sensitive as IFA, nor can they detect the variety of autoantibodies. They also do not have the pattern recognition quality of the IFA. The IFA test is sensitive, screens for a wide variety of known and unknown autoantibodies and, through pattern recognition, offers insights into the probable identity of the antigen and associated autoimmune disorder. It is the dominant methodology in clinical laboratories at this time ⁽²⁾ and the method of choice for ANA screening and semi-quantitation.

The antigen of the **ANA HEp-2** () substrate is a human epithelial cell (HEp-2) line established by Moore, Sabachensky and Toolan. ⁽¹²⁾ HEp-2 cells have been shown to have greater sensitivity than tissue sections and yield sharper pattern recognition. ⁽¹³⁾ The presence of mitotic figures aids in differential pattern recognition as well as detecting previously unreported nuclear antibodies. ^(14,15) Antinuclear antibodies can be found in all major immunoglobulin classes (IgG, IgA or IgM), therefore, antihuman gammaglobulin conjugate that detects all classes is recommended for use in routine ANA testing. ⁽¹⁶⁾

REAGENTS

		REF HME 0060	REF HME 0120	REF HME 1600
SORB SLD n Stable in sealed foil pouch at 8° C, or lower, until labeled expiration date.	Individually foil wrapped slides with HEp-2 tissue culture cells fixed onto each well.	10 slides x 6 wells	10 slides x 12 wells	100 slides x 16 wells + coverslip
CONJ FITC IgG Stable at 2-8° C away from direct light until labeled expiration date.	Dropper vials containing fluorescein isothiocyanate labeled goat antihuman immunoglobulins with 0.001% Evans Blue counterstain, protein stabilizer, less than 0.1% sodium azide and 0.001% thimerosal added.	1 x 3,5mL	2 x 3,5mL	4 x 20mL
CONTROL + Stable at 2-8° C until labeled expiration date.	Vial of ANA positive human control serum (homogeneous pattern) with protein stabilizer and 0.005% thimerosal.	1 x 0,5mL	1 x 0,5mL	1 x 0,5mL
When used undiluted, as provided, specific fluorescent intensity of 3+ or greater should be seen. Optionnaly, the positive control can be tittered to endpoint. If tittered, the control should be serially diluted in PBS; When the control has been tested for the endpoint titer by bmd. Enterptises, Ltd. An endpoint titer is printed on the positive control vial. Due to variations within each laboratory (fluorescent microscope, etc.) each laboratory should establish its own mean titer for each lot of positive control (generally ± one dilution from stated endpoint).				
CONTROL - Stable at 2-8°C until labeled expiration date. The control is intended to be used undiluted as provided. The staining reaction should exhibit less than 1+ fluorescence.	Vial of ANA negative human control serum with protein stabilizer and 0.005% thimerosal.	1 x 0,5mL	1 x 0,5mL	
MM Stable at 2-8° C until labeled expiration date.	Vial of Mounting Medium (phosphate buffered glycerol of pH 7.4 ± 0.2)	1 x 3,5mL	1 x 3,5mL	
DIL SPE Stable at 2-8° C until the labeled expiration date provided no gross contamination is seen.	Bottle containing sample diluent, with less than 0.1% thimerosal, formulated to reduce nonspecific staining.	1 x 60mL	1 x 60mL	3 x 250mL
Do not use if the solution turns cloudy, or if a precipitate forms.				
BUF WASH RCNS 1L H₂O Stable in sealed packet at +25° C, or lower, until labeled expiration date.	One-liter packet of dry PBS for the reconstitution of 1 liter of wash buffer	2	2	

ASSAY PRINCIPLE

The ANA HEp-2 (bmd) test utilizes the indirect fluorescent antibody assay method first described by Weller and Coons,⁽¹⁷⁾ and applied to ANA detection by Friou,⁽¹⁸⁾ and Holman and Kunkel.⁽¹⁹⁾

The procedure is carried out in two basic reaction steps:

Step 1 - Human serum is reacted with the antigen substrate. Antibodies, if present, will bind to the antigen forming stable antigen-antibody complexes. If no antibodies are present, the complex will not be formed and serum components will be washed away.

Step 2 - Fluorescein labeled antihuman antibody is added to the reaction site which binds with the complexes formed in step one. This results in a positive reaction of bright apple-green fluorescence when viewed with a properly equipped fluorescence microscope. If no complexes are formed in step one, the fluorescein labeled antibody will be washed away, exhibiting a negative result.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- One-liter volumetric flask or one liter graduated cylinder
- Distilled water - CAP Type one or equivalent
- One-liter screw capped container
- Disposable test tubes and rack
- Disposable serological pipettes
- Calibrated pipettes to deliver 10 µl and 100 µl, with disposable pipette tips
- Pasteur pipettes and bulbs
- Moist chambers
- Plastic squeeze wash bottle
- Coplin jars or staining dishes with slide racks
- Coverslips, No. 1, 24 x 60 mm
- Permanent black felt tip marking pen
- Fluorescence microscope equipped with a mercury or tungsten-halogen light source, a 390-490nm excitation filter and 515-520nm barrier filter, and optics to give a total magnification of 400X. The excitation wavelength of FITC is 490nm and the emission wavelength is 520nm.

REAGENTS AVAILABLE INDIVIDUALLY

HME 1006	HEp-2 slides (10 x 6 wells)
HME 1012	HEp-2 slides (10 x 12 wells)
HME 1016	HEp-2 slides (10 x 16 wells)
HME 9920	FITC conjugate (20 mL)
HME DIL250	IFA Diluent (250 mL)
HME MM	Mounting medium (3,5 mL)
HME PBS10	Dry PBS packet (10x1L)
HME NEG	ANA Negative control (0,5mL)
HME HOM	Homogeneous positive control (0,5mL)
HME NUC	Nucleolar positive control (0,5mL)
HME RNP	Speckled/RNP positive control (0,5mL)
HME ACA	Centromere positive control (0,5mL)
HME SSA	SS-A positive control (0,5mL)
HME SSB	SS-B positive control (0,5mL)
HME SCL	Scl-70 positive control (0,5mL)
HME 12CS	Coverslips 24x60 (1x100 pieces)
HME 16CS	Coverslips 24x70 (1x100 pieces)

STABILITY AND STORAGE

- All reagents and substrate slides are stable if they are stored between +2°C and +8°C in their own packaging.
- Do not use any kits or reagents beyond the stated expiration date.

PREPARATION OF REAGENTS

BUFFER PREPARATION


Place contents of a one-liter PBS packet into a one-liter volumetric flask, add *distilled water to the one-liter mark, mix and leave several hours or overnight to dissolve. Reconstituted buffer should have a pH of 7.4 ± 0.2.

Adjust with 1N NaOH or 1N HCl if pH value is outside the stated range. Store in a clean screw capped bottle at 25°C or lower. Stable during 1 month if no gross contamination is seen. Do not use if pH changes, if the solution turns cloudy, or if a precipitate forms.

*Use deionized water with caution, as pH of this type of water may vary causing the pH of PBS to become unstable upon prolonged storage.

PRECAUTIONS

1. For *in vitro* diagnostic use.
2. Do not remove slides from pouch until ready for testing. Do not use if pouch has been punctured, as indicated by a flat pouch.
3. All reagents should be brought to room temperature (+20°C-+25°C) prior to use.
4. Abnormal test results may be seen if the antigen substrate slides are allowed to dry during the staining procedure.
5. Refrigeration (+2°C-+8°C) of kit immediately upon arrival will insure stability until labeled expiration date.
6. Reagents should not be used beyond stated expiration date.
7. Substitution of components other than those provided may yield inconsistent results.
8. Do not expose conjugate to strong light during storage or use.
9. Avoid microbial contamination of all reagents involved in the testing procedure or incorrect results may occur.
10. Deviation from the defined test procedure, such as incubation times or temperatures, may give erroneous results.
11. Lipemic, hemolyzed or contaminated sera may yield erroneous results.
12. Previously frozen specimens after thawing should be thoroughly mixed prior to testing.
13. Reusable glassware must be washed and thoroughly rinsed free of detergents.
14. Care should be taken to avoid splashing and generation of aerosols.
15. Patient samples, as well as ail materials coming into contact with them, should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984 Edition. Never pipette by mouth. Avoid contact with skin and mucous membranes.

16. Sera used to prepare positive and negative controls have been tested by an FDA approved method and found to be negative (were not repeatedly reactive) for the presence of Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) and antibodies to Hepatitis C (HepCAb) and HIV 1 & 2. However, because no test method can offer complete assurance of the absence of these or other infectious agents, these reagents should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the CDC/NIH manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984 Edition.
17. The preservatives used in conjugates and controls are toxic if ingested. Azides may react with copper or lead plumbing to form explosive metal azides. When disposing, flush drains with water to minimize buildup of azide and metal compounds.
18. **IFA diluent** () should be used ONLY as a diluent for patient specimens. Do NOT prepare serial dilutions for endpoint titer with the IFA diluent. Do NOT use in any of the wash steps.

TEST PROCEDURE

NOTE: Bring slides and reagents to room temperature (+20°C-+25° C) before use.

1. SPECIMEN PREPARATION

Screening:






Prepare a 1:40 dilution of each patient's serum by adding 0.01 ml (10 µl) of patient's serum to 0.39 ml of IFA Diluent.

NOTE: Remove only the amount of IFA Diluent needed to perform each test run to reduce the possibility of product contamination.

Semi-quantitation:

The significance of a positive screening result should be confirmed by repeating the test with dilutions of the serum. Each laboratory should establish its own titrating protocol; however, the following fourfold serial titration is suggested:

- a. Prepare a 1:40 dilution of each patient's serum by adding 0.01 ml (10µl) of patient's serum to 0.39 ml of IFA Diluent.
- b. Add 0.3 ml PBS to tubes #2, #3, #4 and #5. (Do NOT use IFA Diluent for serial dilutions.)
- c. Using a 100 µl pipette, transfer 0.1 ml (100 µl) from tube #1 to tube #2. Mix. Using a new tip for each dilution, transfer 0.1 ml (100 µl) from the second tube to the third, from the third tube to the fourth, and from the fourth tube to the fifth, mixing after each transfer. This will give a fourfold titration with the following dilutions:

-  Tube #1 = 1:40
-  Tube #2 = 1:160
-  Tube #3 = 1:640
-  Tube #4 = 1:2560
-  Tube #5 = 1:10240

NOTE: The Positive and Negative Controls are intended to be used undiluted. However, if performing a semi-quantitative test, the Positive Control should be diluted as suggested above. However, DO NOT use IFA Diluent to make the 1:40 or any other dilution of the Positive Control.

2. SLIDE PREPARATION

Remove as many slides as are required from the refrigerator and allow to equilibrate to room temperature (+20°C-+25°C) for at least five minutes. Remove slides from sealed foil pouches, being careful not to touch antigen surface. Identify each slide using a permanent black marking pen.

3. SPECIMEN APPLICATION

Using separate Pasteur pipettes, apply one drop (20-30µl) of each control, and one drop (20-30µl) of each patient serum dilution to individual wells of the slide. Do not touch the antigen surface with the pipette while dropping. Do not allow drops to mix, as cross contamination of samples between wells could cause erroneous results.

4. INCUBATION 1

Incubate in a moist chamber at room temperature (+20°C-+25°C) for 30 minutes.

NOTE: THE ANTIGEN MUST NOT BE ALLOWED TO DRY DURING ANY OF THE FOLLOWING STEPS. Nonspecific binding may occur if the reagent is allowed to dry on the slide.

5. RINSE 1

Remove slides from moist chamber one at a time and rinse GENTLY with PBS using a squeeze wash bottle. Do not focus the PBS stream directly onto the wells. To prevent cross contamination tilt slide first toward wells (1-6 or 1-8) and, running PBS stream along the midline of the slide, allow the PBS to run off the top edge of the slide. Then tilt the slide toward wells (7-12 or 9-16), and repeat this procedure, allowing the PBS to run off the bottom edge of the slide. For six well slides, tilt slide down and run the PBS stream across the slide above the wells, allowing the PBS to run off the bottom edge of the slide.

6. WASH 1

Place slides in Coplin jars or staining dishes and wash in two changes of PBS for 5 to 6 minutes each wash, agitating gently at entry and prior to removal.

7. CONJUGATE APPLICATION

Remove slides from the wash one at a time, shake off excess PBS, dry around outside edges if necessary and return each slide to the moist chamber. Using dropper bottle provided, apply one drop of conjugate (30-50µl) to each well of each slide, making sure each well is completely covered.

8. INCUBATION 2

Incubate in a moist chamber at room temperature (+20°C-+25°C) for 30 minutes. Protect slides from excessive light.

9. RINSE 2

Remove slides from moist chamber and rinse GENTLY with PBS using a squeeze wash bottle. As suggested in step 5, do not focus PBS stream directly onto the wells.

10. WASH 2

Place slides in Coplin jars or staining dishes and wash in two changes of PBS for 5 to 6 minutes each wash, agitating gently at entry and prior to removal.

11. COVERSLIP

Remove slides one at a time from last PBS wash, shake off excess PBS and immediately add two to four drops of mounting medium across the slide. Tilt slide and rest the edge of the coverslip against the bottom of the slide allowing the mounting medium to form a continuous bead between the coverslip and slide. Gently lower the coverslip from the bottom of the slide to the top, being careful to avoid air bubbles. Drain excess mounting medium by holding the edge of the slide against absorbent paper. Wipe off back of slide.

12. READ

Examine stained slides as soon as possible using a properly equipped fluorescence microscope. It is recommended that slides be examined on the same day they are stained. If any delay is anticipated, store slides in the refrigerator (+2°C-+8° C) away from direct light and read the following day. Do not allow mounting medium to dry between slide and coverslip. If drying should occur, add additional mounting medium or recoverslip slide.

FLUORESCENT INTENSITY GRADING

Fluorescent intensity may be semi-quantitated by following the guidelines established by the Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia. ⁽²⁰⁾

4+ = Maximal fluorescence; brilliant yellow-green.

3+ = Less brilliant yellow-green fluorescence.

2+ = Definite but dull yellow-green fluorescence.

1+ = Very dim subdued fluorescence.

The degree of fluorescent intensity is not clinically relevant and has only limited value as an indicator of titer. Differences in fluorescence microscope optics, filters and light sources may result in differences of 1+ or more fluorescent intensity when observing the same slide using different microscopes.

QUALITY CONTROL

Specificity control

Both a positive and negative antibody control must be included with each run. These controls must be examined prior to reading test samples and should demonstrate the following results:

Negative Control

Using the ANA NEGATIVE CONTROL SERUM ([bmd](#)) as provided with the ANA HEp-2 ([bmd](#)) test, the cells should exhibit less than 1+ fluorescence and appear reddish-orange due to the counterstain.

Positive Control

Using the ANA POSITIVE CONTROL SERUM ([bmd](#)) as provided with the ANA HEp-2 ([bmd](#)) test, the cells should exhibit a homogeneous staining pattern with a fluorescent intensity of 3+ to 4+.

Each control must demonstrate the expected reaction in order to validate the test. If the controls fail to appear as described above, the test results should not be reported and the test should be repeated.

If upon repeat testing the controls still fail to show the proper reaction, do not report test results. The specificity of the antigen substrate can further be tested by running a panel of various types and patterns of antinuclear antibodies. (These are available separately from [bmd](#) enterprises, Ltd.)

Sensitivity control

A titrated control included with each run tests substrate sensitivity, as well as, checks technique, conjugate quality and the microscope optical System. The endpoint titer of each lot of ANA POSITIVE CONTROL SERUM ([bmd](#)) must be determined. There must not be more than a twofold difference (+/-) in titer from the stated endpoint. Each run should include the endpoint dilution, one fourfold dilution above and one fourfold dilution below the endpoint dilution. The more concentrated dilution should be positive and the less concentrated negative. If the control does not behave as described, the test results are invalid and the test should be repeated. If the control fails to show the proper reaction upon repeat testing, do not report the test results.

[bmd](#) can provide you ready to use controls (see § Reagent available individually) which can be tested at the same time.

RESULTS

NEGATIVE

A serum dilution is considered negative for antinuclear antibodies if the cells exhibit less than 1+ fluorescence and lack a clearly discernible pattern. Cells will appear reddish-orange due to the Evans Blue counterstain.

A sample is considered negative for antinuclear antibodies if it exhibits less than 1+ fluorescence at a serum dilution of 1:40 and all greater dilutions, or if the fluorescence observed is not a discernible ANA pattern.

... Negative samples may exhibit fluorescent staining slightly greater than the Negative Control, but less than 1+.

... Some sera may show a low degree of nuclear or cytoplasmic fluorescence with no clearly discernible staining pattern. This phenomenon is generally due to heterophile antibodies and should be reported as negative. ⁽²¹⁾

... Intense non-nuclear staining may be observed in some sera containing Anti-Mitochondrial, Anti-Smooth Muscle or other cytoplasmic antibodies.

POSITIVE

A serum dilution is considered positive for antinuclear antibodies if the fluorescent staining is at an intensity of 1+ or greater with a clearly discernible pattern of fluorescence. A sample is considered positive for antinuclear antibodies if it exhibits a characteristic ANA staining pattern with a fluorescent intensity of 1+ or greater at a serum dilution of 1:40 or greater. Multiple antinuclear antibodies may be present in a given specimen; one masking the other.

Serially diluting the specimen will aid in distinguishing these patterns.

Report all titers and patterns seen.

TITRATION

If a semi-quantitative titration is performed, the result should be reported as the reciprocal of the last dilution in which 1+ apple-green fluorescent intensity with a clearly discernible staining pattern is detected. When reading fourfold serial dilutions, endpoints can be extrapolated where necessary.

EXAMPLE OF ENDPOINT EXTRAPOLATION:

1:40 = 3+
1:160 = 2+
1:640 = +/-
1:2560 = Neg

The extrapolated endpoint is reported as 320.

Report all titers and patterns seen, extrapolating the titer where necessary.

EXAMPLE:

1:40 = 4+ Peripheral and 3+ Homogeneous
1:160 = 3+ Homogeneous
1:640 = 2+ Homogeneous and 3+ Speckled
1:2560 = 1+ Homogeneous and 2+ Speckled
1:10,240 = +/- Speckled

Report: 40 Peripheral, 2560 Homogeneous and 5120 Speckled.

INTERPRETATION OF RESULTS

Four major staining patterns which may occur singly or in combinations have been described:

1. Peripheral (shaggy, rim, membranous)
2. Homogeneous (diffuse, solid)
3. Speckled (including ACA)
4. Nucleolar

Other patterns less frequently seen include Spindle and Ribosomal RNP.

1. PERIPHERAL - smooth staining primarily around the outer region of the nucleus with weaker staining in the center. Not all cells within a well may appear peripheral; some may appear homogeneous. The chromosome region of mitotic cells will exhibit a bright positive staining pattern.

Note: A very thin distinct line around the nucleus is not a peripheral ANA, but a nuclear membrane antibody. It differs in that the chromosome region within the mitotic cells is negative.

NUCLEAR ANTIGENS: nDNA or Histones.

DISEASE ASSOCIATION: High titers to nDNA are suggestive of active SLE. Lower titers are suggestive of SLE or other connective tissue diseases. ⁽²²⁾

2. HOMOGENEOUS - diffuse staining of the entire nucleus, with or without apparent masking of the nucleoli. Some specimens may exhibit moderately large irregular areas of more intense staining; or the pattern may appear granular, especially as the antibody reaches its endpoint. The chromosome region of mitotic cells will exhibit a bright positive staining pattern.

NUCLEAR ANTIGENS: nDNA, DNP or Histones.

DISEASE ASSOCIATION: High titers are suggestive of SLE, while low titers may be found in SLE, and Rheumatoid Arthritis. ⁽⁵⁾

- a. Antibodies to DNP have the same specificity as the LE Cell Factor. ⁽¹¹⁾
- b. Antibodies to Histone alone have a high association with drug-induced lupus. ⁽¹¹⁾

3. SPECKLED - fluorescent aggregates throughout the nucleus which can be very fine to very coarse depending on the type of antibody present. More than one type of speckle may be seen in any one specimen. The chromosome region of mitotic cells is usually negative.

- a. Sm and nRNP antibodies usually present as a coarse speckle with the chromosome region of mitotic cells negative.
- b. SS-A/Ro and SS-B/La antibodies present as small uniform speckles in a uniform distribution with the chromosome region of mitotic cells negative.
- c. Fine dense speckles with positive staining of the nucleoli and chromosome region of mitotic cells may indicate an Scl-70 antibody.
- d. Varying fluorescence of fine to coarse speckles, in approximately 30-60% of cells with positive or negative staining of the mitotic cells, may represent a PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) antibody.

NUCLEAR ANTIGENS: Sm, nRNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70 (DNA-Topoisomerase 1) or PCNA (Cyclin).

DISEASE ASSOCIATION:

- a. Sm antibodies are highly specific for SLE and appear to be a "marker" for this disease. ⁽²³⁾
- b. nRNP along with other types of ANA's have been found in SLE, Rheumatoid Arthritis (RA), and Progressive Systemic Sclerosis (Scleroderma). High levels of nRNP antibodies alone are characteristic of Mixed Connective Tissue Disease (MCTD). ⁽²³⁾

- c. SS-A/Ro and SS-B/La antibodies are frequently present in patients with Sjogren's Syndrome without associated RA. Both may be found less frequently in patients with SLE. SS-A/Ro antibodies are found in a high percentage of infants with congenital heart block, neonatal lupus or both. ⁽²⁴⁾
- d. Scl-70 antibodies appear to be a "marker" for Progressive Systemic Sclerosis (Scleroderma). ⁽²³⁾
- e. Anti-PCNA has been found in a small percentage of patients with SLE. ⁽¹⁵⁾

4. ANTI-CENTROMERE ANTIBODY (ACA) - discrete uniform speckles throughout the nucleus, the number of which corresponds to a multiple of the normal chromosome number. The staining pattern of the mitotic cells will follow that of the chromosomes, with pairs of dots arranging themselves in an equatorial plane during metaphase and then moving towards their respective centrosomes during anaphase.

Note: An antibody closely resembling the ACA is the Pseudo Centromere (or NSp-1) Antibody. This antibody can be differentiated from the ACA in that the chromosome region of mitotic cells does not stain. ⁽²⁵⁾

NUCLEAR ANTIGEN: Centromere/kinetochore portion of the chromosome.

DISEASE ASSOCIATION: This antibody is considered a "marker" for the CREST variant of Progressive Systemic Sclerosis. ⁽²⁶⁾ It is infrequently found in diffuse Scleroderma and Raynaud's disease. ⁽²⁷⁾

5. NUCLEOLAR - fluorescent staining of the nucleoli within the nucleus, sharply separated from the unstained nucleoplasm. The nucleolar fluorescence may be homogeneous, speckled or clumpy. Frequently accompanied by a speckled pattern.

NUCLEAR ANTIGENS: PM/Scl (PM-1), RNA Polymerase 1 or Fibrillarin (U3). ⁽²⁸⁾

DISEASE ASSOCIATION: High titers are highly specific for Progressive Systemic Sclerosis (PSS), with lower titers found in PSS, SLE, Sjogren's Syndrome and Raynaud's disease. ^(29,30)

6. ANTI-SPINDLE ANTIBODY - a network of threads connecting the centrosomes to each other in the mitotic cells.

NUCLEAR ANTIGEN: Spindle apparatus in cells undergoing mitosis.

DISEASE ASSOCIATION. There may be some association with Carpal Tunnel Syndrome. ⁽¹⁴⁾

7. CYTOPLASMIC FLUORESCENCE:

- a. Ribosomal RNP (rRNP) - diffuse granular fluorescence throughout the cytoplasm. May be confirmed by placing the specimen on a stomach section, where it will stain the chief cells. Frequently accompanied by a nucleolar pattern.

NUCLEAR ANTIGEN: Ribosomal or cytoplasmic RNP.

DISEASE ASSOCIATION: This antibody has been found in a small percentage of cases of SLE. ⁽³¹⁾

- b. Non-ANA Cytoplasmic Fluorescence: The two most common autoantibodies are:

1) *Anti-Mitochondrial Antibody (AMA)* - discrete speckles throughout the cytoplasm in a fibrous network, with denser speckling in the perinuclear region. May be confirmed by testing on appropriate tissue substrate.

2) *Anti-Smooth Muscle Antibody (ASMA)* - fluorescent strands in the cytoplasm in a spidery network, with fibrils extending from the cell membrane. May be confirmed by testing on appropriate tissue substrate.

**CORRELATION OF ANA'S
WITH IFA STAINING PATTERNS**

Antibody Against:	Staining Pattern:	Mitotic Cells:
nDNA	Peripheral & Homogeneous	Positive
Histones	Peripheral & Homogeneous	Positive
DNP	Homogeneous	Positive
Sm	Coarse Speckle	Negative
nRNP	Coarse Speckle	Negative
SS-A	Small Uniform Speckle	Negative
SS-B	Small Uniform Speckle	Negative
Scl-70	Fine Dense Speckle & Nucleolar	Positive
PCNA	Variable Speckle	Negative or Positive
ACA	Discrete Uniform Speckle	Positive Centromeres
PM/Scl	Nucleolar (homogeneous)	Negative
RNA Polymerase 1	Nucleolar (speckled)	Few Discrete Speckles
Fibrillar	Nucleolar (clumpy)	Positive fibers
Spindle	Spindle Apparatus	
rRNP	Cytoplasmic	Negative

LIMITATIONS OF PROCEDURE

- ANA serological test results should be used in conjunction with information available from the clinical evaluation and other diagnostic information.
- Two to ten percent of a normal adult population have antinuclear antibodies.⁽³²⁾
- Antinuclear antibodies are known to be age and sex related. With increasing age there is an increased incidence of ANA's; therefore, a positive low titer result may be normal for certain individuals in the absence of other clinical signs and symptoms. Antinuclear antibodies are not usually found, however, in normal young individuals.
- Some positive reactions have been reported in relatives of patients suffering from a connective tissue disease who may develop such a disease at a later time.⁽³³⁾
- Positive test results from cord blood or neonates should be interpreted with caution. The presence of antinuclear antibodies in cord blood is usually the result of passive transfer from mother to the fetus. A negative test, however, may be useful in excluding a possible autoimmune process.
- Positive ANA results may be seen in a small percentage of patients with Infectious and/or Neoplastic diseases, and also in diseases of drug etiology.^(22,34)
- SLE patients undergoing steroid therapy or in remission may have a negative ANA.⁽¹¹⁾
- Positive test results may not be valid in persons who have received blood transfusions or various blood products within the past several months.
- Test results on specimens from immunosuppressed patients and pregnant women may be difficult to interpret.
- Endpoint reactions may vary between laboratories due to differences in type or condition of fluorescence microscope employed or assay procedure used.⁽³⁵⁾
- If both the positive and negative control substrate cells are not visible when viewed using the fluorescence microscope, it may be necessary to replace or realign the light source and check the specific filters.
- Cell culture substrate slides may exhibit nonspecific fluorescence due to contamination of antibodies or PBS rinse-wash solutions with bacteria or fungi. It is very important that personnel reading the staining results have experience in fluorescence microscopy.
- In general titers of 1:40 and 1:80 are considered low titers, 1:160 and 1:320 are considered medium titers, and 1:640 and greater are considered high titers. It is recommended that each laboratory establish its own reference ranges.

EXPECTED VALUES

The following chart presents the incidence of antinuclear antibodies utilizing a HEp-2 cell ANA substrate in patient population studies performed at the Duke University Medical Center Division of Rheumatic and Genetic Disease laboratories over a two-year period. This represents a study of over 9,000 control sera and over 4,500 abnormal sera.

Clinical Diagnosis	% Positive	Diagnostic clinique	% Positive
Controls :		Vasculitides	20.0%
20-60 ans	2.0%	Childhood SLE	64.0%
70-80 ans	3.5%	JRA	
SLE	95.0%	Systemic	14.0%
RA	40.0%	Polyarthricular	6.0%
MCTD	99.0%	Pauciarticular	
PSS (Diffuse)	85.0%	HLA B27 pos.	0.0%
PSS (CREST variant)	93.0%	HLA B27 neg.	26.0%
PM/DM	25.0%		

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

To investigate the relative specificity and sensitivity of the ANA HEp-2 test, one hundred twenty serum specimens were compared qualitatively and semi-quantitatively with another commercially available indirect fluorescent ANA HEp-2 kit. All tables represent averaged results from two independent readers.

The relative sensitivity and specificity are summarized in TABLE 1. The one specimen in which the two kits did not agree was a CDC Reference Serum having high levels of antibodies to SS-A.

TABLE 1 – SUMMARY OF RELATIVE COMPARISON TESTING

OTHER KIT	ANA HEp-2		Relative Sensitivity	Relative Specificity
	Positive	Negative		
	71	0	100%	100%
	1	48		

In the following tables H = Homogeneous pattern, S = Speckled pattern, C = Centromere antibody, N = Nucleolar pattern, cR = cRNP antibody (cytoplasmic pattern). TABLE 2 represents the titers and patterns obtained with the 72 positive specimens in TABLE 1.

TABLE 2 – SUMMARY OF RELATIVE SENSITIVITY TESTING

Spec #	BMD	Other	Spec #	BMD	Other	Spec #	BMD	Other
1	80 H	80 H	25	40 S	40 S	49	320 S	160 S
2	40 H	40 H	26	80 S	80 S	50	640 S	640 S
3	80 H	40 H	27	80 S	40 S	51	640 S	160 S
4	40 H	40 H	28	40 S	40 S	52	160 S	40 S
5	160 H	80 H	29	40 S	40 S	53	2560 S	320 S
6	320 H	160 H	30	80 S	40 S	54	1280 S	640 S
7	1280 H	640 H	31	2560 S	2560 S	55	640 S	640 S
8	5120 H	2560 H	32	10240 S	5120 S	56	2560 S	2560 S
9	5120 H	5120 H	33	2560 S	40 S	57	160 S	< 40
10	640 H	320 H	34	640 S	640 S	58	640 S	320 S
11	10240 H	10240 H	35	2560 S	640 S	59	80 S	40 S
12	2560 H	1280 H	36	320 S	320 S	60	40 S	40 S
13	640 H	320 H	37	1280 S	1280 S	61	640 S	320 S
14	1280 H	640 H	38	10240 S	5120 S	62	640 C	640 C
15	640 H	320 H	39	5120 S	40 S	63	10240 C	5120 C
16	640 H	320 H	40	5120 S	640 S	64	320 C	320 C
17	1280 H	1280 H	41	10240 S	5120 S	65	640 C	320 C
18	1280 H	640 H	42	640 S	1280 S	66	1280 N	1280 N
19	640 H	320 H	43	10240 S	5120 S	67	640 N	320 N
20	80 H	40 H	44	160 S	160 S	68	320 N	160 N
21	1280 H	640 H	45	10240 S	10240 S	69	160 N	160 N
22	80 S	80 S	46	5120 S	5120 S	70	80 N	80 N
23	40 S	40 S	47	160 S	160 S	71	320cR	640cR
24	320 S	320 S	48	160 S	80 S	72	640S/160H	160 H

All but nine of the positive specimens agreed within a twofold dilution. The nine serum specimens were characterized by additional testing as follows:

- . #’s 33, 39, 57 (CDC Reference Serum) and 72 were characterized as having antibodies against SS-A.
- . #35 was characterized as having antibodies against Scl-70.
- . #40 was characterized as having antibodies to both SS-A and SS-B.
- . #53 (CDC Reference Serum) was characterized as having antibodies against SS-B.
- . #’s 51 and 52 were unable to be characterized by additional testing.

Interlot precision of the **ANA HEp-2 SYSTEM**, represented in TABLE 3, was evaluated by testing eleven serum specimens (2 negative and 9 positive over a range of titers) on three successive days using three different lot numbers. There was no more than a twofold difference (+/-) in titer between any of the comparison testings, which is within the confidence limits of this methodology.³⁵

Intralot precision of the **ANA HEp-2 SYSTEM**, represented in TABLE 4, was evaluated by running nine different types of antinuclear antibodies three times within one run using three different slides from the same lot. Again, there was no more than a twofold difference in titer between any of the comparison testings.³⁵

TABLE 3 – SUMMARY OF INTERLOT PRECISION

Spec #	Lot 1	Lot 2	Lot 3
1	160 N	160 N	160 N
2	160 S	160 S	80 S
3	320 S	640 S	320 S
4	2560 S	2560 S	1280 S
5	640 H	1280 H	1280 H
6	<40	<40	<40
7	320 C	640 C	640 C
8	40 S	80 S	40 S
9	<40	<40	<40
10	2560 S	5120 S	2560 S
11	2560 S	5120 S	2560 S

TABLE 4 – Summary of Intralot Precision

Spec #	Test #1	Test #2	Test #3
1	1280 N	1280 N	1280 N
2	320 H	320 H	320 H
3	1280 S	1280 S	1280 S
4	1280 C	1280 C	1280 C
5	2560 S	5120 S	5120 S
6	320 S	320 S	320 S
7	320 S	320 S	320 S
8	80 cR	80 cR	80 cR
9	320 S	320 S	320 S

BIBLIOGRAPHY

1. Tan, E., Antinuclear Antibodies: Diagnostic Markers for Autoimmune Diseases and Probes for Cell Biology, *Adv. Immuno.*, 44:93-151, 1989.
2. Nakamura, R., C. Peebles, R. Rubin, et al, Autoantibodies to Nuclear Antigens, 2nd éd., ASCP, Chicago, 1985.
3. Tan, E., E. Chan, K. Sullivan, et al, Antinuclear Antibodies (ANA's): Diagnostically Specific Immune Markers and Clues Toward the Understanding of Systemic Autoimmunity, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 47:121-141, 1988.
4. Barnett, E.V., Antinuclear Antibodies and Nuclear Antigens, *California Medicine*, 104:463-469, 1966.
5. Casais, S.P., G.J. Friou, L.L. Meyers, Significance of Antibody to DNA in Systemic Lupus Erythematosus, *Arth. Rheum.*, 7:379-390, 1964.
6. Douvas, A.S., M. Achten, E.M. Tan, Identification of a Nuclear Protein (Scl-70) as a Unique Target of Human Antinuclear Antibodies in Scleroderma, *J. Biol. Chem.*, 244:10514-10522, 1979.










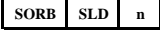





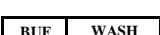
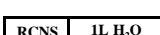


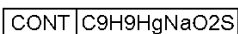
7. Moroi, Y., C. Peebles, M.J. Fritzler, et al, Autoantibody to Centromere (Kinetochores) in Scleroderma Sera, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:1627-1631, 1980.
8. Sharp, G.C., W.S. Irwin, E.M. Tan, et al, Mixed Connective Tissue Disease – An Apparently Distinct Rheumatic Disease Syndrome Associated with a Specific Antibody to an Extractable Nuclear Antigen (ENA), *Am. J. Med.*, 52:148-159, 1972.
9. Alsough, M.A., W. Talal, E.M. Tan, Differentiation and Characterization of Autoantibodies and their Antigens in Sjogrens Syndrome, *Arth. Rheum.*, 19:216-222, 1976.
10. Wolfe, J.F., E. Adelstein, G.C. Sharp, Antinuclear Antibody with Distinct Specificity for Polymyositis, *J. Clin. Invest.*, 59:176-178, 1977.
11. Nakamura, R.M., CL. Peebles, D.P. Molden, E.M. Tan, Advances in Laboratory Tests for Autoantibodies to Nuclear Antigens in Systemic Rheumatic Diseases, *Lab. Med.*, 15:190-198, 1984.
12. Moore, A.E., L. Sabachewsky, H.W. Toolan, Culture Characteristics of Four Permanent Lines of Human Cells, *Cancer Res.*, 15:598-602, 1955.
13. McCarty, G.A., J.R. Rice, Characterization and Comparison of Commercially Available Antinuclear Antibody Kits Using Single Pattern Index Sera, *J. Rheum.*, 7:339-347, 1980.
14. McCarty, G.A., et al, A Unique Antinuclear Antibody Staining Only the Mitotic Spindle Apparatus, *New Engl. J. Med.*, 305:703, 1981.
15. Miyachi, K., M.J. Fritzler, E.M. Tan, Autoantibody to a Nuclear Antigen in Proliferating Cells, *J. Immunol.*, 121:2228-2234, 1978.
16. Schur, P.H., M. Moore, N. Rothfield, The Subclass of Antinuclear and Antinucleic Acid Antibodies, *Arth. Rheum.*, 15:174-180, 1972.
17. Weller, T.H., A.H. Coons, Fluorescent Antibody Studies with Agents of Varicella and Herpes Zoster Propagated In Vitro, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86:789-794, 1954.
18. Friou, F.J., Clinical Application of Lupus Serum-Nucleoprotein Reaction Using the Fluorescent Antibody Technique, *J. Clin. Invest.*, 36:890, 1957.
19. Holman, H.R., H.G. Kunkel, Affinity between the Lupus Erythematosus Serum Factor and Cell Nuclei and Nucleoprotein, *Science*, 126:162-163, 1957.
20. Lyster, H.C., F.T. Forrester, The Immunofluorescence (IF) Test, in *Immunofluorescence Methods in Virology*, USDHHS, Georgia, 71-81, 1979.
21. Peter, J.B., R.L. Dawkins, Evaluating Autoimmune Diseases, *Diag. Med.*, 1-10, Sept/Oct/1979.
22. Notman, D.D., N. Kurata, E.M. Tan, Profiles of Antinuclear Antibodies in Systemic Rheumatic Diseases, *Annals Intern. Med.*, 83:464-469, 1975.
23. Nakamura, R.M., CL. Peebles, R.L. Rubin, et al, Autoantibodies to Nuclear Antigens (ANA), ASCP, Chicago, 1985.
24. Molden, D.P., ANA Profiles in Systemic Rheumatic Disease, *Diag. Med.*, 12-18, June 1985.
25. Fritzler, M.J., D.W. Valencia, G.A. McCarty, Speckled Pattern Antinuclear Antibodies Resembling Anticentromere Antibodies, *Arth. Rheum.*, 27(1):92-96, 1984.
26. Fritzler, M.J., T.D. Kinsella, E. Garbutt, The CREST Syndrome: A Distinct Sérologie Entity with Anticentromere Antibodies, *Am. J. Med.*, 69:520-526, 1980.
27. Tan, E.M., G.P. Rodnan, I. Garcia, et al, Diversity of Antinuclear Antibodies in Progressive Systemic Sclerosis, *Arth. Rheum.*, 23:617-625, 1980.
28. Penning, C, V. Steen, G. Reimer, et al, An Analysis of Systemic Sclerosis Patients with Autoantibodies to the Nucleolar Proteins PM-Scl, RNA Polymerase I and Fibrillar, *A.R.A. Mtg.*, D29, 1987.
29. Pinnas, J.L., J.D. Northway, E.M. Tan, Antinucleolar Antibodies in Human Sera, *J. Immunol.*, 111:996-1004, 1973.
30. Ritchie, R.F., Antinucleolar Antibodies: Their Frequency and Diagnostic Association, *New Engl. J. Med.*, 282:1174-1178, 1970.
31. Bianchi, F.B., M. Rizzetto, P. Penfold, et al, Ultrastructural Localization and Characterization of a Ribosomal Antibody Detected by Immunofluorescence in Systemic Lupus Erythematosus, *Clin. Exp. Immunol.*, 17:629-636, 1974.
32. Rothfield, N.F., Detection of Antibodies to Nuclear Antigens by Immunofluorescence, *Manual of Clinical Immunology*, ASM, Washington D.C., 85:647-651, 1976.
33. Pollack, V.E., Antinuclear Antibodies in Families of Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *New Engl. J. Med.*, 271:165-171, 1964.
34. Tan, E.M., M.J. Fritzler, P.A. Reyes-Lopez, Autoantibodies as Biological Markers of Neoplasia: Basic and Applied Aspects, Elsevier-North Holland, New York, 1978.
35. Cleymaet, J.E., R.M. Nakamura, Indirect Immunofluorescent Antinuclear Antibody Tests: Comparison of Sensitivity and Specificity of Different Substrates, *Am. J. Clin. Path.*, 58:388-393, 19.

SUMMARY OF METHOD

	AMOUNT TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
SPECIMEN APPLICATION	1 drop (~20-30µl) 1 drop (~20-30µl) 1 drop (~20-30µl)	Negative control Positive Control Diluted sample	30 min at R.T <u>in a moist chamber</u>
RINSE 1	Using a squeeze wash bottle, rinse GENTLY with PBS		
WASH 1	Wash slides in Coplin jars full of PBS ☞ PBS must be change 2 times		5 to 6 minutes
CONJUGATE APPLICATION	1 drop (~20-30µl)	FITC conjugate	30 min at R.T <u>in a moist chamber</u>
RINSE 2	Using a squeeze wash bottle, rinse GENTLY with PBS		
WASH 2	Wash slides in Coplin jars full of PBS ☞ PBS must be change 2 times		5 to 6 minutes
READ	2 to 4 drops	Mounting Medium	

R.T: Room Temperature (+20°C/+25°C)

SYMBOLS USED

	Biological risks		Temperature limitation		Catalogue Number
	Consult instructions for use		In Vitro Diagnostic Medical Device		Batch Code
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Slide with n wells		Negative control		Mounting Medium
	Fluorescent antibody conjugate		Positive control		IFA Diluent
	Wash Buffer		Reconstitute with 1L distilled water		Immunofluorescent assay
	Contains sodium azide				Contains thimerosal

BioMédical Diagnostics SA

Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

