



TEST DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-CYTOPLASME DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (ANCA)

REF	IMM 1140		<i>(éthanol)</i>
REF	IMM 1141		<i>(formol)</i>

UTILISATION DU TEST

Ce test en immunofluorescence indirecte est utilisé pour la recherche et la détermination semi-quantitative des anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) dans le sérum humain. Les ANCA sont mis en évidence dans le sérum de patients atteints de vascularites nécrosantes. En association avec les signes cliniques et d'autres examens biologiques, ils se révèlent d'une grande aide pour le diagnostic de ces maladies.

RESUME ET EXPLICATION DU TEST

Les ANCA sont présents dans le sérum de patients atteints de granulomatose de Wegener, de polyartérite microscopique, de glomérulonéphrite nécrosante ou à croissants, ainsi que d'autres vascularites ou troubles inflammatoires intestinaux (colite ulcéreuse primaire)^{1,11}. L'image par immunofluorescence indirecte de neutrophiles fixés à l'éthanol montre différents aspects de fluorescence. Parmi ceux-ci on trouve les aspects suivants :

1. L'aspect c-ANCA qui montre une fluorescence cytoplasmique diffuse, caractéristique des autoanticorps dirigés contre les antigènes cytoplasmiques des neutrophiles.
2. L'aspect p-ANCA qui montre une fluorescence périmoléculaire caractéristique des autoanticorps dirigés contre les antigènes neutrophiles
3. Les anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires (ANA) peuvent également montrer une image fluorescente des neutrophiles.

Ces deux types d'ANCA ont une signification différente¹². Les cANCA sont principalement trouvés chez les patients atteints de granulomatose de Wegener et de polyartérite microscopique, tandis que les pANCA sont associés à divers troubles vasculaires comme la colite ulcéreuse (CU), et la cholangite primaire sclérosante (CPS).

80% des patients avec pANCA ont des signes histologiques de vascularites, de CU ou de CPS.

Les ANCA sont présents chez plus de 90% des patients atteints de maladie de Wegener active et généralisée et chez 67% d'entre eux dans sa forme active et limitée. La fréquence des ANCA fluctue avec la rémission de la maladie. Les patients atteints de maladie de Wegener en phase active peuvent exceptionnellement avoir un test ANCA négatif. Dans ce cas cependant, un contrôle ultérieur du test devrait montrer une réactivité positive¹. La méthode d'immunofluorescence indirecte avec microscope est considérée comme la technique de référence pour la détection des ANCA. La fixation des antigènes neutrophiles est habituellement réalisée avec de l'éthanol.

Avec la fixation à l'éthanol, 2 types d'aspects ont été identifiés : un aspect cytoplasmique (c-ANCA) et un aspect périmoléculaire (p-ANCA). Les réactions de type p-ANCA sont confirmées en renouvelant le test sur des lames fixées au formol. Dans ce cas l'aspect p-ANCA devient c-ANCA tandis que les aspects liés aux ANA restent nucléaires ou deviennent négatifs avec la fixation au formol.

PRINCIPE DU TEST

Avec la méthode d'immunofluorescence indirecte utilisée dans ce coffret, le sérum du patient est incubé sur des préparations optimisées de neutrophiles humains, ce qui permet la fixation des autoanticorps avec le substrat.

Un lavage de la lame élimine tous les anticorps non fixés.

Une incubation du substrat avec un conjugué anti-IgG humaines, marqué à la fluorescéine, permet la détection des anticorps fixés de classe IgG.

Les réactivités sont observées sous un microscope à fluorescence équipé des filtres appropriés. Une fluorescence vert-pomme du cytoplasme avec une image granulaire diffuse (c-ANCA) ou un marquage périmoléculaire (p-ANCA) montre la présence d'ANCA. Le titre du sérum (la dernière dilution donnant une réaction positive) est alors déterminé par dilutions sériques successives¹³.

STABILITE ET CONDITIONS DE CONSERVATION

Conserver tous les réactifs entre +2°C à +8°C.

Laisser les réactifs revenir à température ambiante avant utilisation.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Microscope à fluorescence
- Micropipette ou pipette Pasteur
- Pipettes sérologiques
- Bac à coloration pour le lavage des lames
- Tubes à essai (13 x 75 mm) et portoir de tubes à essai
- Eau distillée ou déionisée
- Epruvette graduée 1L
- Flacon pour solution de lavage
- Papier absorbant
- Chambre d'incubation

MATERIEL FOURNI

Chaque coffret contient :	IMM 1140 ou IMM 1141
Lames de polynucléaires humains fixés à l'éthanol ou au formol SORB SLD 6	8 x 6 puits
Contrôle positif cANCA ou pANCA : sérum humain avec de la BSA (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) <u>Prêt à l'emploi</u> CONTROL +	1 x 0,5 ml
Contrôle négatif : sérum humain avec de la BSA (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) <u>Prêt à l'emploi</u> CONTROL -	1 x 0,5 ml
Conjugué FITC anti-IgG humaines avec de la BSA (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium). A protéger de la lumière. <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ FITC IgG	1 x 5 ml
Diluant échantillon avec de la BSA (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium) <u>Prêt à l'emploi</u> DIL SPE	1 x 60 ml
Tampon phosphate salin (PBS) - Dissoudre chaque flacon pour obtenir un litre. <u>A reconstituer</u> BUF WASH RCNS 1L H₂O	2 flacons
Milieu de montage (contient un conservateur <0,1% d'azide de sodium). Ne pas congeler. <u>Prêt à l'emploi</u> MM	1 x 5 ml
Contre-colorant Bleu d'Evans <u>Prêt à l'emploi</u> EVAN'S BLUE	1 x 1 ml
Lamelles couvre-lames	12

PRECAUTIONS

Tous les composants d'origine humaine ont été dépistés et révélés négatifs pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-VIH 1 et 2, ainsi que HCV et HTLV-I par les tests recommandés par la FDA. Cependant, du fait qu'aucun test connu ne peut offrir une garantie absolue de l'absence d'agents infectieux, considérer les réactifs ainsi que tous les échantillons de patients comme potentiellement infectieux et les manipuler avec les précautions d'usage. Suivre les bonnes pratiques de laboratoire pour la conservation, la distribution et la manipulation de ces matériels¹⁴.

ATTENTION : Certains réactifs contiennent de l'azide de sodium. Ce composé peut réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre et former des sels d'azides métalliques explosifs. Lors de l'élimination des réactifs, rincer abondamment les canalisations avec de l'eau afin d'éviter toute accumulation de résidus. L'azide de sodium est un poison et peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, signaler immédiatement l'incident au directeur du laboratoire ou à un centre antipoison.

Le protocole doit être suivi exactement afin de garantir des résultats valides. Ne pas substituer les composants du coffret par d'autres réactifs provenant d'autres coffrets. Ne pas utiliser de coffret ayant dépassé la date de péremption indiquée sur l'emballage.

ECHANTILLONS

Seuls les sérums peuvent être utilisés dans ce protocole. Des sérums hémolysés, lipémiques ou contaminés peuvent interférer sur les performances de ce test et ne doivent pas être utilisés.

Les sérums peuvent être conservés pendant une semaine entre +2°C/+8°C. Pour une conservation plus longue, congeler les sérums à -20°C. Eviter les congélations/décongélations successives des sérums.

PROCEDURE DU TEST

A. Dépistage

1. Diluer chaque sérum de patient au 1/10 dans le diluant échantillon fourni (20µl de sérum + 180µl de diluant). **NE PAS diluer les contrôles positif et négatif.** Conserver le sérum pur pour déterminer le titre des autoanticorps dans le cas où le dépistage sera trouvé positif.

2. Laisser revenir à température ambiante les lames pendant **10 à 15 minutes**. Ouvrir le sachet et ôter délicatement les lames sans toucher le substrat.

3. Identifier les lames et les placer dans la chambre d'incubation dont le fond aura été tapissé de papier absorbant humide pour éviter l'assèchement.

4. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer **1 goutte** (≈50 µl) du contrôle négatif dans le puits n°1. De la même façon, déposer 1 goutte du contrôle positif dans le puits n°2. Eviter le remplissage excessif des puits.

5. A l'aide d'une micropipette ou d'une pipette Pasteur, déposer **1 goutte** (≈50 µl) du sérum dilué du patient dans les autres puits. Eviter le remplissage excessif des puits.

6. Placer les lames dans la chambre d'incubation et incuber pendant **30 minutes à température ambiante**.

7. Retirer une lame de la chambre d'incubation. Tenir la lame par l'extrémité de l'étiquette et rincer délicatement à l'aide d'une pipette contenant approximativement **10ml** de PBS, ou rincer la lame dans un bécher rempli de PBS. Ne pas utiliser de pissette. Transférer immédiatement la lame dans un bac à coloration et laver pendant 10 minutes. Répéter le processus avec les lames restantes.

8. Retirer une lame du bac à coloration. Enlever l'excès de PBS en épongeant le bord de la lame avec du papier absorbant. Placer la lame dans la chambre d'incubation. Déposer immédiatement **1 goutte** (≈50 µl) de conjugué dans chaque puits. Répéter les étapes 7 et 8 avec les lames restantes.

9. Recouvrir la chambre d'incubation et laisser incuber **30 minutes** à température ambiante.

10. Sortir une lame de la chambre d'incubation. Plonger la lame dans un bécher contenant du PBS pour éliminer tout excès de conjugué. Placer la lame dans une cuve à coloration avec du PBS pendant **10 minutes**. Si une contre-coloration est souhaitée, ajouter **2-3 gouttes** de Bleu d'Evans dans le dernier bain de lavage. Répéter le processus avec les lames restantes.

REMARQUE : Un lavage incorrect peut altérer la morphologie des polynucléaires neutrophiles et provoquer une augmentation de la fluorescence de fond.

11. Oter une lame de la cuve à coloration. Eponger le bord de la lame à l'aide d'un papier absorbant pour enlever l'excès de PBS. Pour éviter de mettre à sec les puits, **réaliser immédiatement l'étape 13 pendant que la lame est humide.**

12. Déposer doucement **1 goutte** de milieu de montage dans chaque puits et appliquer la lamelle couvre-lame. Ne pas appliquer de pression excessive et éviter les mouvements latéraux de la lamelle.

13. Répéter les étapes 12 et 13 avec chaque lame.

14. Examiner la fluorescence spécifique sous microscope à fluorescence à un grossissement x200 ou plus. Les lames doivent être lues immédiatement. Cependant, la présence d'un inhibiteur d'extinction de fluorescence dans le milieu de montage permet une lecture retardée jusqu'à 48 heures sans perte significative d'intensité de fluorescence. Dans ce cas, les lames devront être conservées à l'obscurité à +2°C/+8°C.

B. Détermination du titre par les dilutions en cascade

Un sérum trouvé positif au test de dépistage doit être retesté en suivant les **étapes 5 à 13** pour déterminer son titre. Inclure dans chaque nouvelle série un contrôle positif et négatif. Les dilutions en série de 2 en 2 sont réalisées à partir du 1:10. Le titre du sérum est défini par la dernière dilution donnant une fluorescence positive.

C. Préparation de la série de dilution

Ex : Numéroté quatre tubes de 1 à 4. Ajouter 180µl de diluant échantillon dans le tube 1 et 100µl dans les tubes 2 à 4. Pipeter 20µl de sérum pur dans le tube 1 et agiter soigneusement. Transférer 100µl du tube 1 dans le tube suivant et après agitation répéter la même opération pour les tubes suivants etc...

CONTROLE DE QUALITE

Un contrôle positif et un contrôle négatif doivent être inclus dans chaque série.

Le contrôle négatif ne donne pas d'image fluorescente sur les neutrophiles, tandis qu'avec le contrôle positif on obtient, sur lames fixées à l'éthanol, une fluorescence 2+ ou supérieure du cytoplasme des neutrophiles, dans le cas d'un contrôle cANCA et périmoléculaire dans le cas d'un contrôle pANCA. Sur lames fixées au formol, l'aspect du contrôle cANCA reste cytoplasmique tandis que celui du pANCA se modifie en aspect cytoplasmique.

Dans le cas où les contrôles ne donnent pas les résultats attendus, il est recommandé de refaire le test. Si le problème persiste, cela peut être lié à :

- La turbidité. Ecarter le contrôle et utiliser un autre contrôle.
- Des problèmes avec le système optique du microscope à fluorescence comme par exemple : mauvais alignement, durée de vie de l'ampoule dépassée, etc...
- Un assèchement des lames pendant la manipulation

RESULTATS

Les résultats des tests ANCA sont rendus négatifs (si <1/10) ou positifs avec le titre et l'aspect de fluorescence.

Préciser s'il s'agit d'une fluorescence spécifique, cytoplasmique (cANCA) ou périmoléculaire (pANCA).

Certains autres autoanticorps, comme les anticorps antinucléaires (ANA), donnent parfois des réactions similaires aux pANCA.

Différentes images d'ANCA sur lames éthanol et formol sont présentées à la fin du document.

LIMITES DE LA PROCEDURE

Parfois un sérum ANCA positif peut donner un résultat faiblement positif ou négatif à la dilution de dépistage (effet de zone). Dans ce cas, préparer les dilutions en série de l'échantillon et déterminer le titre de l'anticorps.

Parfois la présence de deux ou plus autoanticorps différents dans le sérum peut créer des interférences en immunofluorescence. Cela peut masquer la détection de l'ANCA ou cacher le titre si l'anticorps qui interfère a un titre plus élevé que celui des ANCA. Le cas le plus fréquemment rencontré dans le test des ANCA est une interférence avec les ANA. Chez certains patients atteints de maladie de Wegener, le test des ANCA peut être trouvé négatif. Un contrôle réalisé ultérieurement, peut montrer une positivité du sérum. Les sérums de patients atteints de maladie de Wegener qui suivent un traitement sont toujours négatifs sur le test ANCA.

Certaines réactions d'ANA peuvent parfois gêner ou mimer une image pANCA. Pour confirmer la réactivité pANCA, les sérums doivent être retestés sur lames fixées au formol ou sur lames HEp-2 pour les ANA. Les échantillons pANCA sur lames fixées au formol donnent une image cANCA, tandis que les ANA sur ces mêmes lames donnent une image négative ou nucléaire. Les anticorps anti-cytokératine peuvent donner une réaction type cANCA15. Le test sur cellules HEp-2 permet alors de distinguer les réactions «pseudo-ANCA» des vrais cANCA.

Le titre de l'anticorps n'est pas toujours corrélé à l'activité de la maladie. Les résultats ANCA doivent être interprétés avec les signes cliniques et la présence ou l'absence d'ANCA ne peut pas directement indiquer la présence d'une vascularite. Les résultats ANCA positifs en immunofluorescence doivent être confirmés par une technique ELISA. Certaines spécificités antigéniques sont préférentiellement associées à un type de vascularites. Par ailleurs des ANCA sont retrouvés dans le sérum de patients atteints de désordres immunologiques autres que les vascularites, comme la rectocolite hémorragique^{7,8}

VALEURS ATTENDUES

Soixante quatre (64) échantillons extraits d'une population normale ont été testés en ANCA. Tous les échantillons ont donné un résultat négatif au 1:10.

Un résultat ANCA positif est utile pour le diagnostic des vascularites et maladies inflammatoires intestinales^{7,11}. L'aspect cANCA est fréquemment associé à la maladie de Wegener et l'aspect pANCA à la micropolyangéite, à la glomérulonéphrite idiopathique à croissant et à la rectocolite hémorragique¹¹. Dans d'autres vascularites (périartérite noueuse, maladie de Takayasu, maladie de Behcet) les ANCA sont rares ou absents. La prévalence des ANCA dans la maladie de Wegener et autres vascularites extraite des données de la littérature est présentée dans le tableau 1, à la fin du document. Dans le projet européen d'étude de standardisation des ANCA, Hagan et ses collaborateurs¹⁶ ont montré l'importance de l'immunofluorescence indirecte pour le diagnostic des vascularites systémiques idiopathiques.

Dans cette étude, les ANCA sont présents dans 85% des sérums de patients atteints de maladie de Wegener, et parmi ceux-ci, 64% sont cANCA et 21% pANCA.

Les pANCA sont plus fréquents que les cANCA dans la polyangéite microscopique (58% et 23%) avec une sensibilité de 81% dans la polyangéite microscopique et de 82% dans la glomérulonéphrite idiopathique à croissant.

La spécificité des ANCA est de 76% dans le groupe contrôle de malades et de 94% dans la population normale (Tableau 2 à la fin du document).

Cependant la valeur prédictive positive des ANCA est bien meilleure et plus significative lorsque le résultat est interprété avec dossier clinique. Dans leur éditorial, Jennette, Wilmant et Falk¹⁷, ont montré que la valeur prédictive positive est de 92% chez les patients ayant un dosage de créatinine >3mg/dl.

De même, chez les patients ayant une valeur prédictive positive initiale faible, un résultat ANCA positif augmente la probabilité de déclencher la maladie. Les auteurs concluent que la recherche d'ANCA chez les patients ayant des signes cliniques évidents de glomérulonéphrite extra-capillaire est utile pour confirmer le diagnostic, alors que chez les patients ayant des signes cliniques diffus, cette même recherche permet d'éliminer le diagnostic de vascularites.

PERFORMANCES

Le test ANCA, Anticorps Anti-Cytoplasme des polynucléaires Neutrophiles (BMD) a été utilisé en parallèle avec un autre test ANCA d'immunofluorescence indirecte. 129 sérums provenant d'un laboratoire spécialisé dans la détection des autoanticorps ont été inclus dans l'étude comparative. Ces échantillons ont été testés en respectant le mode opératoire recommandé par chaque fabricant. Les résultats sont les suivants :

		BMD		
		Positif	Négatif	Total
Autre	Positif	49	0	49
	Négatif	7	73	80
	Total	56	73	129

Spécificité Relative: 91%

Sensibilité Relative: 100%

Concordance: 95%

Les sept sérums discordants entre les deux tests d'immunofluorescence ont été retestés en ELISA pour la recherche des anticorps dirigés contre les deux principales cibles antigéniques, la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3).

Sur les sept sérums positifs avec le coffret BMD et négatifs avec l'autre test, tous sauf un ont été trouvés positifs en ELISA, ce qui montre que ces échantillons sont vraisemblablement de vrais positifs.

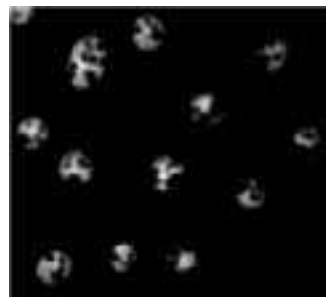
Réactivité croisée :

Les anticorps antinucléaires (ANA) peuvent donner une réaction positive sur les neutrophiles. Pour définir la réactivité des ANA sur les neutrophiles, que l'on ne doit pas confondre avec la réactivité des ANCA, 25 sérums ANA positifs avec différentes spécificités ont été testés sur les lames fixées à l'éthanol et au formol. Avec tous les sérums, à l'exception des spécificités SS-A(Ro) et SS-B (La), on observe une image nucléaire. Cette image est conservée ou disparaît sur les lames fixées au formol.

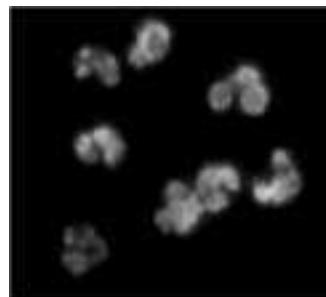
Reproductibilité :

Des études ont été réalisées pour définir la répétabilité intra-essai et la reproductibilité inter-essai. Quatre sérums ANCA positifs (deux cANCA et deux pANCA) et un sérum ANCA négatif ont été testés à partir de la dilution 1:10 jusqu'à la dilution du titre. 3 lots différents ont été utilisés pour chaque type de lames, ethanol et formol pendant quatre jours. Dans tous les cas, le sérum négatif et les sérums positifs ont donné les résultats attendus.

Réactions ANCA sur lame fixée à l'éthanol

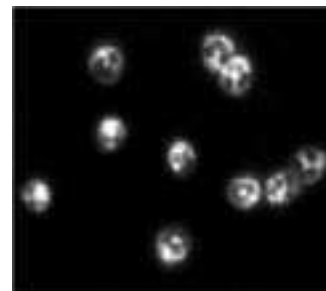


cANCA

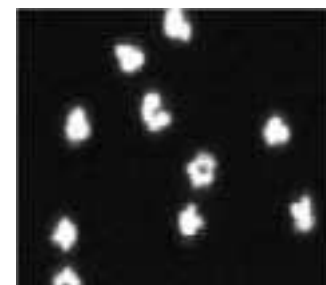


pANCA

Réactions ANCA sur lame fixée au formol



pANCA



ANA

Tableau 1: Prévalence des ANCA ¹

<u>Clinique</u>	<u>% Positif</u>
Maladie de Wegener	
<u>Généralisée</u>	
Active	96
Rémission partielle	71
Rémission totale	41
Récurrence locale	80
<u>Localisée</u>	
Active	67
Rémission partielle	54
Rémission totale	32
Trouble inflammatoire intestinaux	
Retrocolite	70
Angiocholite sclérosante primaire	82
Maladie de Crohn*	27
Contrôle et Donneur de sang	0
Maladie auto-immune et connectivites**	5
Mise, médical conditions	0
Granulomatosis	0
Maladie rénale primaire	1

*ANCA ces titres sont généralement faibles

**ANCA la réactivité est pANCA

Tableau 2: Sensibilité et spécificité du test IF chez des patients atteints de vascularites systémiques (adapté de la référence 16)

	Sensibilité %			
	N	cANCA	pANCA	c or pANCA
Patients				
Maladie de Wegener	97	64	21	85
Polyangitis Microscopique	44	23	58	81
Idiopathic RPGN	12	36	45	81
Polyarthrite nodosale classique	10	10	30	40
Syndrome de Churg-Strauss	6	33	33	66
Spécificité %				
Contrôles				
Contrôles Maladie	184	95	81	76
Contrôles issues de donneurs sains	740	98	96	94

REFERENCES

- Nölle B, Specks U, Lüderman J, Rohrbach M, DeRemee RA and Gross WL. Anticytoplasmic antibodies: Their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *AnnIntMed* 111: 28-40, 1989.
- Venning MC, Quinn A, Broomhead V and Bird AG. Antibodies directed against neutrophils (cANCA and pANCA) are of distinct diagnostic value in systemic vasculitis. *Quart J Med* 77: 1287-1296, 1990.
- Van der Woude FJ, Daha MR and Van Es LA. The current status of neutrophil cytoplasmic antibodies. *ClinExp Immunol* 78: 143-148, 1989.
- Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohbrach MS and DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64: 28-36, 1989.








- Tervert JWC, van der Woude FJ, Fauci AS and Ambrus JL. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Int Med* 149: 2461-2465, 1989.
- Cross CE and Lillington GA. Serodiagnosis of Wegener's granulomatosis: Pathobiologic and clinical implications. *Mayo Clin Proc* 64: 119-122, 1989.
- Seibold F, Slametschka D, Gregor X and Weber P. Neutrophil Autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterol* 107:532-536, 1994.
- Claise C, Johanet C, Bouhnik Y et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 16:28-34, 1996.
- Gigase P, DeClerck LS, Van Cotthem KA et al. Anti-Neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease with special attention for IgA-class antibodies. *DigDis and Sci* 42:2171-2174, 1997.
- Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: Are they important? *Gastroenterol* 107:586-589, 1994.
- Shanahan F and Bernstein CN. ANCAs aweigh in colitis. *Gastroenterol* 105:946-947, 1993.
- Lüdemann J, Utecht B and Gross WL. Laboratory methods for détection of antineutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Immunol Newsletter* 10:159-166, 1990.
- Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
- Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health, HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
- Streicher J, Fabian B, Herkner K et al. Anti-cytokeratins are a potential source of false positive indirect immunofluorescence assays for cANCA. *J Clin Lab Analysis*. 12:54-59, 1998.
- Hagen CF, Daha MR, Hermand J et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 53:743-753, 1998.
- Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 53:796-798, 1998.

SCHEMA RECAPITULATIF DU MODE OPERATOIRE

Recherche d'anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles

	Opérations à effectuer	Temps d'incubation
Incubation des sérums	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sortir la lame de son emballage, la placer dans la chambre humide. ▪ Déposer rapidement dans leurs puits respectifs : <ul style="list-style-type: none"> - 1 goutte (≈50 µl) de contrôle positif et négatif - 1 goutte (≈50 µl) d'échantillon préalablement dilué 	30 minutes Température ambiante
Lavage en tampon PBS	Rincer délicatement la lame soit à l'aide d'une pipette contenant 10mL de PBS soit dans un bain de PBS puis laver la immédiatement en la transférant dans un bac à coloration	10 minutes
Incubation du conjugué	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sortir la lame, éliminer l'excès de PBS avec du papier absorbant ▪ Placer la lame dans la chambre humide ▪ Déposer IMMEDIATEMENT dans chaque puits, une goutte de conjugué ▪ Recouvrir la chambre d'incubation 	30 minutes Température ambiante
Lavage en tampon PBS	Plonger la lame dans un becher de PBS pour éliminer l'excès de conjugué puis placer la dans un bac à coloration avec du PBS.	10 minutes
Montage	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Sortir la lame, éliminer l'excès de PBS avec du papier absorbant ▪ NE PAS LAISSER SECHER LA LAME ▪ Déposer IMMEDIATEMENT 1 goutte de milieu de montage ▪ Recouvrir d'une lamelle 	
Lecture	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Lecture au microscope à fluorescence à un grossissement x200 ou plus. 	

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conforme à la réglementation CE				
	Lire les instructions d'utilisation		Test en immunofluorescence indirecte				
	Nombre de tests	<table border="1" data-bbox="943 1346 1114 1391"> <tr> <td>SORB</td> <td>SLD</td> <td>6</td> </tr> </table>	SORB	SLD	6	Lame de 6 puits	
SORB	SLD	6					
<table border="1" data-bbox="256 1402 304 1447"> <tr> <td>REF</td> </tr> </table>	REF	Référence produit	<table border="1" data-bbox="951 1402 1121 1447"> <tr> <td>CONJ</td> <td>FITC</td> <td>IgG</td> </tr> </table>	CONJ	FITC	IgG	Conjugué immunofluorescents
REF							
CONJ	FITC	IgG					
<table border="1" data-bbox="256 1458 304 1503"> <tr> <td>LOT</td> </tr> </table>	LOT	Numéro de lot	<table border="1" data-bbox="970 1458 1102 1503"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>+</td> </tr> </table>	CONTROL	+	Contrôle positif	
LOT							
CONTROL	+						
	Date d'expiration	<table border="1" data-bbox="970 1514 1102 1559"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>-</td> </tr> </table>	CONTROL	-	Contrôle négatif		
CONTROL	-						
 +2°C - +8°C	Température limites de conservation	<table border="1" data-bbox="975 1559 1098 1603"> <tr> <td>MM</td> </tr> </table>	MM	Milieu de montage			
MM							
<table border="1" data-bbox="252 1615 304 1659"> <tr> <td>IVD</td> </tr> </table>	IVD	Pour le diagnostic <i>in vitro</i> uniquement	<table border="1" data-bbox="962 1615 1110 1659"> <tr> <td>BUF</td> <td>WASH</td> </tr> </table>	BUF	WASH	Solution de lavage	
IVD							
BUF	WASH						
<table border="1" data-bbox="204 1671 357 1715"> <tr> <td>CONT</td> <td>NaN₃</td> </tr> </table>	CONT	NaN ₃	Contient de l'azide de sodium	<table border="1" data-bbox="951 1671 1114 1715"> <tr> <td>RCNS</td> <td>1L H₂O</td> </tr> </table>	RCNS	1L H ₂ O	A reconstituer avec 1L d'eau distillée
CONT	NaN ₃						
RCNS	1L H ₂ O						

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



ANTINEUTROPHIL CYTOPLASMIC ANTIBODY (ANCA) TEST SYSTEM

	IMM 1140		<i>(ethanol)</i>
	IMM 1141		<i>(formalin)</i>

INTENDED USE

An indirect immunofluorescence antibody test for the detection and semi-quantitation of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) in human serum. ANCA are found in the sera of patients with necrotizing vasculitides and hence, serve as an aid to the clinical and other laboratory findings in the diagnosis of these disorders.

SUMMARY AND EXPLANATION

ANCA occur in patients with Wegener's granulomatosis, microscopic polyarteritis, necrotizing or crescentic glomerulonephritis, other vasculitides and inflammatory bowel disorders (primarily ulcerative colitis)^{1,11}. Indirect immunofluorescence staining of ethanol fixed neutrophils may exhibit different types of fluorescent staining patterns. These include:

1. Autoantibodies against cytoplasmic antigens of neutrophils giving a diffuse cytoplasmic staining (cANCA).
2. Autoantibodies against neutrophil antigens giving a perinuclear reaction pattern (pANCA).
3. Common antibodies against nuclear antigens (ANA).

The significance of these two types of ANCA differs¹². cANCA are found primarily in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyarteritis, whereas pANCA occurs in various vasculitic disorders, ulcerative colitis (UC) and primary sclerosing cholangitis (PSC).

Eighty percent of patients in whom pANCA are found have histologic evidence of vasculitis, UC or PSC. ANCA occur in more than 90% of patients with active generalized Wegener's granulomatosis and in 67% of patients with active limited disease.

The incidence of ANCA varies in patients with clinical remission. Patients with active Wegener's granulomatosis may occasionally be ANCA negative.

However, in such cases, repeat testing should yield positive ANCA reactions. The indirect immunofluorescence microscope method is considered to be the gold standard for detecting ANCA. Antigen fixation of PMN is usually performed in ethanol.

When fixed in ethanol, two types of ANCA staining reaction patterns have been identified: cytoplasmic (cANCA) and perinuclear (pANCA). The pANCA reactions can be confirmed by repeat testing on formalin fixed slides where pANCA reactions convert to cANCA whereas ANA reactions either remain nuclear or become negative on formalin fixation.

PRINCIPLE OF THE TEST

In the indirect immunofluorescence method used in this kit, patients' sera are incubated on optimized preparations of human neutrophils to allow binding of antibodies to the substrate.

Any antibodies not bound are removed by rinsing the slide.

Bound antibodies of the IgG class are detected by incubation of the substrate with fluorescein-labeled, anti-human IgG conjugate.

Reactions are observed under a fluorescence microscope equipped with appropriate filters. The presence of ANCA is demonstrated by an apple green fluorescence either of the cytoplasm with a diffuse granular cytoplasmic staining (cANCA) or a perinuclear staining (pANCA). The titer (the reciprocal of the highest dilution giving a positive reaction) is then determined by testing serial dilutions¹³.

STORAGE AND PREPARATION

Store all reagents at +2°C/+8°C.

Reagents should be returned to room temperature before beginning the test.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

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

REAGENTS

Each kit contains:	IMM 1140 or IMM 1141				
Human Neutrophil Substrate Slide (fixed with ethanol or formalin) <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>SORB</td><td>SLD</td><td>6</td></tr></table>	SORB	SLD	6	8 x 6 wells	
SORB	SLD	6			
cANCA or pANCA Positive Control: contains human serum with BSA (contains<0.1%NaN ₃) <u>Prêt à l'emploi</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONTROL</td><td>+</td></tr></table>	CONTROL	+	1 x 0,5 mL		
CONTROL	+				
Negative Control contains human serum with BSA (contains<0.1%NaN ₃) <u>Ready to use</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONTROL</td><td>-</td></tr></table>	CONTROL	-	1 x 0,5 mL		
CONTROL	-				
Goat anti-human IgG FITC conjugate, contains BSA (contains<0.1%NaN ₃). Protect from light. <u>Ready to use</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>CONJ</td><td>FITC</td><td>IgG</td></tr></table>	CONJ	FITC	IgG	1 x 5 mL	
CONJ	FITC	IgG			
Sample Diluent, contains BSA (contains<0.1%NaN ₃) <u>Ready to use</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE	1 x 60 mL		
DIL	SPE				
Phosphate Buffered Saline (PBS) - Dissolve each vial to 1 liter. <u>To dilute</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>BUF</td><td>WASH</td><td>RCNS</td><td>1L H₂O</td></tr></table>	BUF	WASH	RCNS	1L H ₂ O	2 vials
BUF	WASH	RCNS	1L H ₂ O		
Mounting Medium (contains<0.1%NaN ₃). Do not freeze. <u>Ready to use</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>MM</td></tr></table>	MM	1 x 5 mL			
MM					
Evans Blue Counterstain <u>Ready to use</u> <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"><tr><td>EVAN'S BLUE</td></tr></table>	EVAN'S BLUE	1 x 1 mL			
EVAN'S BLUE					
Coverslips	12				

PRECAUTIONS

All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. All human serum specimens and human derived products should be treated as potentially hazardous, regardless of their origin. Follow good laboratory practices in storing, dispensing, and disposing of these materials⁽¹⁴⁾.

WARNING - Sodium azide (NaN₃) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide build up. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

Instructions should be followed exactly as they appear in this insert to ensure valid results. Do not interchange kit components with those from sources other than the same catalogue number from BMD. Do not use beyond expiration date.

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Only serum specimens should be used for this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of this test and should not be used.

Store specimens at +2°C/+8°C for no longer than one week. For longer storage, serum should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

PROCEDURE

A. Screening:

Step 1 Dilute each patient serum **1:10** with the Sample Diluent provided (20µL serum + 180µL diluent). For screening, **DO NOT dilute the Positive or Negative Controls**. Save the undiluted sera to determine antibody titers if screening tests are found to be positive.

Step 2 Allow pouches containing substrate slides to equilibrate to room temperature for **10-15 minutes**. Carefully remove the slides from their pouch without touching the substrate.

Step 3 Label the slides and place them in an incubation chamber lined with paper towels moistened with water to prevent drying.

Step 4 Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** (approximately 50µl) of the Negative Control to well #1. Similarly apply 1 drop of Positive Control to well #2. Avoid overfilling the wells.

Step 5 Using a micropipette or Pasteur pipette, apply **1 drop** of patient's diluted serum (approximately 50µl) to the other wells. Avoid overfilling the wells.

Step 6 Place the lid on the incubation chamber and incubate slides **30 minutes at room temperature**.

Step 7 Remove a slide from the incubation chamber. Hold slide at tab end and rinse gently with approximately **10ml** of PBS using a pipette, or rinse slide in a beaker filled with PBS. Do not use wash bottle. Transfer slide immediately into Coplin jar and wash **10 minutes**. Repeat process with all remaining slides.

Step 8 Remove slide(s) from Coplin jar. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. Place the slide in the incubation chamber. Immediately invert the **conjugate** dropper vial and gently squeeze to apply **1 drop** (approximately 50µl) to each well. Repeat steps 7 and 8 for each slide.

Step 9 Replace the lid on the incubation chamber. Incubate **30 minutes** at room temperature.

Step 10 Remove a slide from incubator. Hold the slide at the tab end and dip the slide in a beaker containing PBS to remove excess conjugate. Place slide(s) in a staining dish filled with PBS for **10 minutes**. If desired, **2-3 drops** of Evans blue counterstain may be added to the final wash. Repeat for the remaining slides.

NOTE: Improper washing may impact the morphology of the neutrophils and may lead to increased background fluorescence.

Step 12 Remove a slide from the staining dish. Blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. To prevent slide from drying, proceed immediately with next step while slide is still wet.

Step 13 Mount the coverslip by applying **1 drop** of Mounting Medium gently onto each well and place coverslip over slide. Avoid applying undue pressure and prevent lateral movement of the coverslip.

Step 14 Repeat steps 12 and 13 for each slide.

Step 15 Examine for specific fluorescence under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or 400x. Slides may be read as soon as prepared. However, because of the presence of an antifading agent in the mounting medium, no significant loss of staining intensity occurs if reading is delayed for up to 48 hours. Slides should be stored in the dark at +2°C/+8°C.

B: End Point Determination (Titration)

A serum positive in the screening test may be further tested following **steps 5 through 13** to determine the titer. Each test run should include the Positive and Negative Controls. Make serial two-fold dilutions starting at 1:10. The reciprocal of the highest dilution producing a positive reaction is the titer.

C. Preparation of Serial Dilutions

Number four tubes 1 through 4. Add 180µL of Sample Diluent to tube 1 and 100µL to tubes 2 through 4. Pipette 20µL of undiluted serum to tube 1 and mix thoroughly. Transfer 100µL from tube 1 to tube 2 and mix thoroughly. Continue transferring 100µL from one tube to the next after mixing.

QUALITY CONTROL

Both a Positive and Negative Control should be included with each test run.

The Negative Control should show no specific fluorescence of the neutrophil, whereas the Positive Control should have 2+ or greater staining intensity of the cytoplasm of the neutrophil with cANCA positive control and perinuclear with pANCA positive control on ethanol fixed slides. On formalin fixed slides, the cANCA Positive Control remains cytoplasmic whereas pANCA reaction will become cytoplasmic.

If expected results are not obtained, the run should be repeated. If inadequate results continue to occur with the controls, these may be due to:

- Turbidity. Discard and use another control.
- Problems with the optical System of the fluorescence microscope. These may include: improper alignment, bulb beyond useful life expectancy, etc...
- Allowing the slide to dry during the procedure.

RESULTS

The results of the tests for ANCA should be reported as negative if inferior to 1/10, positive and tittered if greater or equal to 1/10. Read for specific diffuse, granular cytoplasmic staining (cANCA) or perinuclear staining (pANCA).

Other detectable antibodies include antinuclear antibodies (ANA), which sometimes may mimic pANCA reactions.

ANCA patterns on ethanol and formalin fixed slides are presented at the end of the document.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

In some cases the presence of two or more antibodies in a serum which are reactive with the same substrate may cause interference in their detection by immunofluorescence. This interference may cause either failure to detect ANCA or suppression of its titer if the interfering antibody has a higher titer than ANCA. The most common cause of the interference phenomenon in ANCA tests is the coexistence of ANA. In some patients with Wegener's granulomatosis, ANCA tests may be negative. In such cases repeat testing may yield positive results. Patients with Wegener's granulomatosis on treatment invariably are negative for ANCA.

ANA reactions may sometimes be confused with or mimic pANCA staining. To confirm pANCA reactivity, sera providing pANCA reactions should be retested either on formalin fixed slides or for ANA on HEP-2 slides. pANCA specimens on formalin fixed ANCA substrate should give cANCA reactivity, whereas reactions to ANA should be either negative or remain nuclear. Anti-cytokeratin antibodies may result in false positive cANCA reaction¹⁵. In such cases, indirect IF tests on HEP-2 cells may help in distinguishing « pseudo-ANCA » from true cANCA reaction.

The antibody titers do not necessarily associate with disease activity. The results of the ANCA test should be evaluated in light of clinical findings as the presence or absence of ANCA may not be directly associated with a vasculitis disorder. The positive ANCA results obtained by immunofluorescence should be confirmed by ELISA. ANCA of certain antigen specificities are more indicative of a specific vasculitic disorder. Also, ANCA have been associated with immunological disturbances other than vasculitis disorders such as ulcerative colitis^{7,8}.

EXPECTED VALUES

Sixty-four (64) normal samples were tested for ANCA. All samples were negative for ANCA at 1:10 dilution.

A positive ANCA in the appropriate clinical setting is useful in the diagnosis of systemic vasculitides and inflammatory bowel disorders^{7,11}. cANCA staining occurs most commonly in Wegener's granulomatosis and pANCA staining in microscopic polyangitis, pauci-immune crescentic glomerulonephritis and ulcerative colitis^{7,11}. In other vasculitides (polyarteritis nodosa, takayasu disease, giant cell arteritis, Behcet's disease) ANCA are rare or absent. The incidence of ANCA in Wegener's granulomatosis and other vasculitides as abstracted from literature is summarized in Table 1, at the end of the document. In the European ANCA collaborative assay standardization project, Hagan and his collaborators¹⁶ evaluated the usefulness of the indirect IF test towards the diagnosis of idiopathic System vasculitides.

In this study, ANCA was found to be present in 85% of patients with Wegener's granulomatosis, of these, 64% were positive for cANCA and 21% for pANCA.

The pANCA was more prevalent than cANCA in microscoping polyangitis (58% vs 23%) with sensitivity of 81% for microscoping polyangitis and 82% for idiopathic rapidly progressive glomerulonephritis.

Of the disease and healthy controls, ANCA was present in 19% and 6% respectively, thus providing a specificity of 76% in disease controls and 94% in healthy individuals. (Table 2, at the end of the document).

However, the positive predictive value of the ANCA tests is much better and more significant if evaluated in conjunction with clinical signs and symptoms. In an editorial, Jennette Wilmant and Falk¹⁷ reported a positive predictive value of 92% in a patient with serum creatinine >3 mg/dl. Similarly, in patients in which the initial positive predictive value is low, a positive ANCA result increases the likelihood of a disease to a level that may warrant further evaluation. The authors conclude that ANCA testing in patients with strong clinical evidence for pauci-immune crescentic glomerulonephritis is most useful for substantiating the diagnosis whereas ANCA testing in patients with weak clinical evidence is most useful for

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody (ANCA) Test was compared with another indirect immunofluorescence ANCA test. The comparison included a total of 129 serum samples obtained from a diagnostic reference laboratory specializing in the detection of autoimmune diseases. These samples were tested according to the procedures recommended by the manufacturers. The results are as follows:

		BMD		
		Positive	Negative	Total
Other	Positive	49	0	49
	Negative	7	73	80
	Total	56	73	129

Relative Specificity: 91%

Relative Sensitivity: 100%

Relative Agreement: 95%

Seven discrepant samples observed by indirect immunofluorescence methods above were tested by ELISA for antibodies to myeloperoxidase (MPO) or proteinase 3 (PR3) antigens, the two major antigens associated with ANCA. Of the seven positives on BMD and negative on the other test kit, all but one tested positive by ELISA, suggesting thereby, the true positivity of these samples.

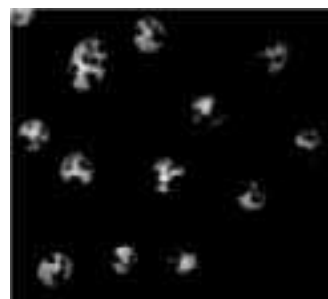
Cross Reactivity:

Antinuclear antibodies (ANA) may exhibit positive reactions on neutrophils. To determine reactivities on neutrophils of ANA, which may be confused for ANCA reactivity, we tested a total of 25 ANA positive samples of varying antibody specificities on ethanol, formalin and COMVT slides. All ANA positive sera with the exception of SS-A (Ro) and SS-B (La) antibody specificities, showed nuclear reactions. These ANA reactions either remain nuclear or become negative on formalin fixed slides.

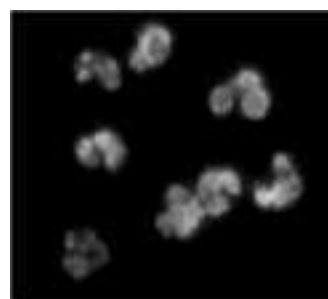
Reproducibility

Studies were performed to demonstrate intra and inter-assay variability. Four ANCA positive (two each of c and p ANCA) and one ANCA negative sera were tested starting at a 1:10 dilution to endpoint. They were tested on 3 different lots each of ethanol, formalin and COMVT slides for four days to determine intra as well as inter-reproducibility. Negative samples remained negative and positive samples provided the expected titer.

ANCA Reactions on Ethanol Fixed Slides

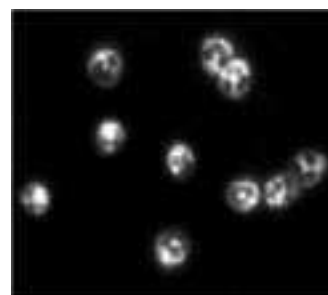


cANCA

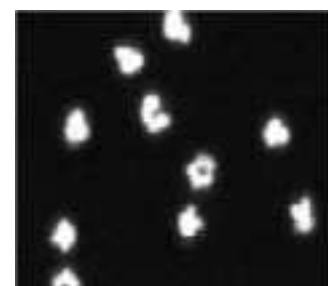


pANCA

Réactions ANCA sur lame fixée au formol



pANCA



ANA

Table 1: Prevalence of ANCA ¹

<u>Clinical Condition</u>	<u>% Positive</u>
Wegener's granulomatosis	
Generalized	
Active	96
Partial remission	71
Full remission	41
Local recurrence	80
Localized	
Active	67
Partial remission	54
Full remission	32
Inflammatory Bowel Disorders	
Ulcerative colitis	70
Primary sclerosing cholangitis	82
Crohn's disease*	27
Disease Controls	
Blood Donors	0
Connective tissue autoimmune disorders**	5
Misc, medical conditions	0

*ANCA titers are usually low

**ANCA reactivity is pANCA

Table 2: Sensivity and Specificity of the IF Test in Patients with Systemic Vasculitides (Adapted from référence 16)

	Sensibility %			
	N	cANCA	pANCA	c or pANCA
Patients				
Wegener's granulomatosis	97	64	21	85
Microscopic polyangitis	44	23	58	81
Idiopathic RPGN	12	36	45	81
Classical polyarteritis nodosal	10	10	30	40
Churg-Strauss syndrome	6	33	33	66
Specificity %				
Controls				
Disease Controls	184	95	81	76
Healthy controls	740	98	96	94

BIBLIOGRAPHY

1. Nölle B, Specks U, Lüderman J, Rohrbach M, DeRemee RA and Gross WL. Anticytoplasmic antibodies: Their immunodiagnostic value in Wegener's granulomatosis. *AnnIntMed* 111: 28-40, 1989.
2. Venning MC, Quinn A, Broomhead V and Bird AG. Antibodies directed against neutrophils (cANCA and pANCA) are of distinct diagnostic value in systemic vasculitis. *Quart J Med* 77: 1287-1296, 1990.
3. Van der Woude FJ, Daha MR and Van Es LA. The current status of neutrophil cytoplasmic antibodies. *ClinExp Immunol* 78: 143-148, 1989.
4. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohrbach MS and DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 64: 28-36, 1989.








5. Tervert JWC, van der Woude FJ, Fauci AS and Ambrus JL. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Int Med* 149: 2461-2465, 1989.
6. Cross CE and Lillington GA. Serodiagnosis of Wegener's granulomatosis: Pathobiologic and clinical implications. *Mayo Clin Proc* 64: 119-122, 1989.
7. Seibold F, Slametschka D, Gregor X and Weber P. Neutrophil Autoantibodies: A genetic marker in primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *Gastroenterol* 107:532-536, 1994.
8. Claise C, Johanet C, Bouhnik Y et al. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in autoimmune liver and inflammatory bowel diseases. *Liver* 16:28-34, 1996.
9. Gigase P, DeClerck LS, Van Cotthem KA et al. Anti-Neutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease with special attention for IgA-class antibodies. *DigDis and Sci* 42:2171-2174, 1997.
10. Shanahan F. Neutrophil autoantibodies in inflammatory bowel disease: Are they important? *Gastroenterol* 107:586-589, 1994.
11. Shanahan F and Bernstein CN. ANCA's aweigh in colitis. *Gastroenterol* 105:946-947, 1993.
12. Lüdemann J, Utecht B and Gross WL. Laboratory methods for détection of antineutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Immunol Newsletter* 10:159-166, 1990.
13. Beutner EH, Kumar V, Krasny SA and Chorzelski TP. Defined immunofluorescence in immunodermatology. In "Immunopathology of the Skin", Beutner EH, Chorzelski TP and Kumar V, Eds, John Wiley and Sons, New York, 3rd Ed, 3-40, 1987.
14. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Center for Disease Control, National Institute for Health, HHS Pub. No {CDC} 93-8395) 1993.
15. Streicher J, Fabian B, Herkner K et al. Anti-cytokeratins are a potential source of false positive indirect immunofluorescence assays for cANCA. *J Clin Lab Analysis*. 12:54-59, 1998.
16. Hagen CF, Daha MR, Hermand J et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. *Kidney Int* 53:743-753, 1998.
17. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 53:796-798, 1998.

SUMMARY OF METHOD

Detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies

	Handling Procedure	Incubation Time
Sera Incubation	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Remove the slide from his pouch and place it in an incubation chamber. ▪ Apply quickly in the respective wells : <ul style="list-style-type: none"> - 1 drop (≈50 µL) of positive and negative control - 1 drop (≈50 µL) of patient's diluted serum 	30 minutes at room temperature
Wash with PBS	Rinse gently with approximately 10ml of PBS using a pipette, or in a beaker filled with PBS then transfer slide immediately into Coplin jar	10 minutes
Incubation of conjugate	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Remove the slide, blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. ▪ Place the slide in the incubation chamber ▪ IMMEDIATELY apply in each well 1 drop of conjugate 	30 minutes at room temperature
Wash with PBS	Place slide(s) in a staining dish filled with PBS to remove excess conjugate.	10 minutes
Mount	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Remove the slide, blot the edge of the slide on a paper towel to remove excess PBS. ▪ DO NOT ALLOW THE SLIDE DRYING ▪ IMMEDIATELY apply 1 drop of the mounting medium ▪ Place the coverslip 	
Reading	Reading under a fluorescence microscope at a magnification of 200x or greater.	

SYMBOLS USED

	Biological risks		EC Declaration of Conformity				
	Consult instructions for use		Immunofluorescent assay				
	Number of tests	<table border="1" data-bbox="943 1317 1114 1352"> <tr> <td>SORB</td> <td>SLD</td> <td>6</td> </tr> </table>	SORB	SLD	6	Slide of 6 wells	
SORB	SLD	6					
<table border="1" data-bbox="256 1361 304 1397"> <tr> <td>REF</td> </tr> </table>	REF	Catalogue Number	<table border="1" data-bbox="951 1368 1118 1404"> <tr> <td>CONJ</td> <td>FITC</td> <td>IgG</td> </tr> </table>	CONJ	FITC	IgG	Fluorescent antibody conjugates
REF							
CONJ	FITC	IgG					
<table border="1" data-bbox="256 1413 304 1449"> <tr> <td>LOT</td> </tr> </table>	LOT	Batch Code	<table border="1" data-bbox="970 1420 1094 1456"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>+</td> </tr> </table>	CONTROL	+	Positive control	
LOT							
CONTROL	+						
	Use by	<table border="1" data-bbox="970 1471 1094 1507"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>-</td> </tr> </table>	CONTROL	-	Negative control		
CONTROL	-						
	Temperature limitation	<table border="1" data-bbox="975 1532 1090 1563"> <tr> <td>MM</td> </tr> </table>	MM	Mounting Medium			
MM							
<table border="1" data-bbox="252 1576 309 1621"> <tr> <td>IVD</td> </tr> </table>	IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device	<table border="1" data-bbox="963 1583 1101 1619"> <tr> <td>BUF</td> <td>WASH</td> </tr> </table>	BUF	WASH	Wash Buffer	
IVD							
BUF	WASH						
<table border="1" data-bbox="204 1637 352 1673"> <tr> <td>CONT</td> <td>NaN₃</td> </tr> </table>	CONT	NaN ₃	Contains sodium azide	<table border="1" data-bbox="951 1637 1114 1673"> <tr> <td>RCNS</td> <td>1L H₂O</td> </tr> </table>	RCNS	1L H ₂ O	Reconstitute with 1L distilled water
CONT	NaN ₃						
RCNS	1L H ₂ O						

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

