

FIDIS™ Vasculitis

REF

MX 007

96

DÉFINITION

Le coffret **FIDIS™ Vasculitis** constitue une méthode d'identification semi-quantitative d'autoanticorps sur supports particuliers utilisant un système de détection par cytométrie de flux.

Il permet la recherche simultanée :

- des **anticorps anti-cytoplasme de polynucléaires neutrophiles** (anti-neutrophil cytoplasm antibodies: ANCA) dirigés contre la myéloperoxydase (MPO) et la protéinase 3 (PR3).
- des **anticorps anti-membrane basale glomérulaire** (MBG) grâce à l'utilisation d'un antigène purifié à partir du collagène IV.

VALEUR DIAGNOSTIQUE

• ANCA

Les ANCA forment une famille d'autoanticorps dont la valeur diagnostique et pronostique au cours des différentes vascularites systémiques primitives, qu'elles soient ou non associées à une glomérulonéphrite, est maintenant bien établie.

Ils sont dirigés contre les constituants antigéniques présents dans les granules primaires azurophiles (granules alpha) des polynucléaires neutrophiles et dans les lysosomes de monocytes.

Les ANCA ont tout d'abord été mis en évidence par immunofluorescence indirecte utilisant des polynucléaires neutrophiles humains fixés à l'éthanol. La présence d'ANCA se caractérise par deux principaux aspects de répartition bien distincts : l'une cytoplasmique et l'autre périmucléaire. Ces deux types dénommés c-ANCA et p-ANCA, sont respectivement liés, de façon prédominante à des anticorps dirigés contre la protéinase 3 (PR3) et contre la myéloperoxydase (MPO).

La détection par immunofluorescence des ANCA pose néanmoins des problèmes de diagnostic différentiel dans la mesure où il est possible de rencontrer ces anticorps en association avec d'autres autoanticorps donnant un aspect très voisin. Ceci existe aussi bien dans le Wegener et les vascularites où l'association d'ANCA à d'autres autoanticorps a été décrite (facteur rhumatoïde, anticorps anti-nucléaire, anti-muscle lisse, anti-thyroïdien, etc.) que dans les collagénoses, les hépatites auto-immunes qui, en plus de leurs autoanticorps spécifiques, peuvent lors de tableaux cliniques particuliers développer des ANCA.

La sensibilité diagnostique des ANCA est particulièrement importante pour la granulomatose de Wegener (anti-PR3), le syndrome de Churg et Strauss, la péri-artérite microscopique et les glomérulonéphrites à croissants (anti-MPO).

Ces maladies représentent une urgence médicale qui implique une stratégie de sécurité en matière d'identification des ANCA basée sur une caractérisation en deux temps:

- 1- par immunofluorescence indirecte où les deux aspects reconnus donnent une première orientation vers un diagnostic.

- 2- une précision fiable des cibles antigéniques (MPO ou PR3) par des techniques immunologiques spécifiques utilisant des antigènes purifiés.

• MBG

La recherche d'autoanticorps anti-membrane basale glomérulaire (MBG) constitue une aide importante au diagnostic du syndrome de Goodpasture, qui associe une glomérulonéphrite nécrisante et une pneumopathie marquée par des hémoptysies par hémorragies intra-alvéolaires. Il constitue une maladie auto-immune due à des autoanticorps réagissant avec les constituants de la membrane basale (chaîne alpha 3 du collagène IV).

Cette maladie progresse rapidement et, de façon fatale dans plus de 75% des cas en absence de traitement. Un diagnostic rapide, basé sur la recherche des autoanticorps anti-MBG en tant que marqueurs spécifiques, est donc crucial avant que le rein, et souvent le poumon, ne subissent une destruction importante. De plus, la persistance de ces autoanticorps implique de différer la transplantation rénale.

Enfin, la recherche des anticorps anti-MBG permet de différencier le syndrome de Goodpasture des néphropathies associées à la présence d'ANCA qui nécessitent un traitement totalement différent. L'obtention d'un résultat négatif constitue, à ce titre, un élément très important pour le clinicien en terme de diagnostic d'exclusion.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ Vasculitis repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre en flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Chaque antigène nécessaire à la réalisation du test est couplé de façon covalente à une catégorie de microsphères colorées. Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents autoanticorps recherchés.

Le coffret **FIDIS™ Vasculitis** permet de détecter 3 anticorps spécifiques : les anticorps anti-MPO, anti-PR3 et anti-MBG.

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par les antigènes MPO, PR3 et MBG. Si l'échantillon contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer au(x) antigène(s) correspondant(s) sur les différentes catégories de microsphères.

- Après incubation, un lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.

- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgG** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.
- Une étape de lavage finale stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps non liés.
- La réaction est alors mesurée par le cytomètre en flux qui identifie chaque type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.
- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité arbitraire (UA/ml) pour chaque spécificité antigénique.

Le coffret **FIDIS™ Vasculitis** peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARIST™**.

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du sérum.
- Éviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum. Au-delà ils devront être congelés à -20°C.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

COMPOSITION DU COFFRET

Plaque de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle. MP	1 plaque
Flacon (A) de 3 catégories de microsphères colorées sensibilisées par les antigènes : MPO (purifié à partir de sang humain), PR3 (purifié à partir de leucocytes humains) et MBG (purifié à partir de tissus bovins). MICROSPHERES <u>Lyophilisées</u> (à reconstituer avec le tampon D)	Qsp 6ml
Flacon (B1) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) <u>Prêt à l'emploi</u> DIL SPE	2 x 115ml
Flacon de calibre titré en unité arbitraire pour les spécificités mesurées. <u>Prêt à l'emploi</u> CAL Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon.	1 x 1,5ml
Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un contrôle de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai. <u>A diluer</u> CONTROL + Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon.	1 x 250µl
Flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	1 x 250µl
Flacon de conjugué anti-IgG humaine couplé à la phycoérythrine <u>Prêt à l'emploi</u> CONJ IgG	1 x 12ml
Flacon (C1) de tampon de lavage (flacon noir) <u>Prêt à l'emploi</u> BUF WASH	1 x 100ml
Flacon (D) de tampon de reconstitution des microsphères <u>Prêt à l'emploi</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6ml

MATÉRIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5µl à 1000 µl.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40µl à 300µl ou 5µl à 2 ml.
- Agitateur
- Chronomètre
- Sonicateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Films pour microplaques

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Le coffret **FIDIS™ Vasculitis** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.
- **FIDIS™ Vasculitis** a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.
- *Les contrôles et le calibre sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.*

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRÉPARATION DU TEST

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec le système FIDIS™ pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de bmd ou de votre distributeur.

- Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.
N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumer. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.
- Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.
- Programmer un lot ou une série de lots multiples sur FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- Placer la microplaque dans le support de plaques du système FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
- A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de désinfection avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à **température ambiante** (+18°C/+25°C) avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des microsphères

- Reconstituer la solution de microsphère en ajoutant tout le flacon **D** de tampon de reconstitution des billes au flacon **A**. Attendre 5 minutes et vortexer.
- Durée de conservation après reprise : 2 mois entre +2°C et +8°C.

2. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au **1/201** dans le tampon de dilution (**B1**).
Exemple : 10µl d'échantillon dans 2000µl de tampon de dilution (B1).
- **Agiter vigoureusement au vortex.**

3. Définition de la configuration du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

a. *Prévoir systématiquement :*

- ✗ 1 puits « blanc réactif »
- ✗ 1 puits pour le contrôle négatif
- ✗ 1 puits pour le contrôle positif
- ✗ 2 puits « calibrateur »

b. *Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution.*

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-après).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™

« Programmation d'un batch ou d'un Multibatch. ».

Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	E4	E12	E20								
B	Ctrl-	E5	E13	E21								
C	Ctrl+	E6	E14	E22								
D	Cal	E7	E15	E23								
E	Cal	E8	E16	E24								
F	E1	E9	E17	E25								
G	E2	E10	E18									
H	E3	E11	E19									

Exemple 2 :

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blanc	E4	E12	E20	E28	E36	E44	E52		
B			Ctrl-	E5	E13	E21	E29	E37	E45	E53		
C			Ctrl+	E6	E14	E22	E30	E38	E46			
D			Cal	E7	E15	E23	E31	E39	E47			
E			Cal	E8	E16	E24	E32	E40	E48			
F			E1	E9	E17	E25	E33	E41	E49			
G			E2	E10	E18	E26	E34	E42	E50			
H			E3	E11	E19	E27	E35	E43	E51			

MODE OPÉRATOIRE

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

☞ Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.

☞ Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :

⇒ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution (**B1**) pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage (C1) :

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration.
(vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- c. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Distribuer 300µl de tampon de lavage (C1).
- f. Déclencher la pompe. Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- g. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.
- h. Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
- i. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- j. Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué.

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué
- Laisser incubé 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
⇒ Refermer le flacon après utilisation.

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution (B1) :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.

Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B1 et C1.

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe.
Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».

- c. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- f. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1) et procéder à l'analyse de la microplaque.
En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution** (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.

6. Analyse

☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation **FIDIS™** et **MLX BOOSTER™**.

CRITÈRES DE VALIDATION DES RÉSULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés.

En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

- a. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
- b. La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 20 UA/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test. Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Unités Arbitraires (UA/ml)	< 20 UA/ml	20 – 25 UA/ml	> 25 UA/ml
Interprétation	Négatif	Limite ^(*)	Positif

() Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.*

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RÉSULTATS

☞ Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

Les sérums hémolysés, lipémiques, ictériques, présentant des taux élevés en IgG monoclonal, des complexes immuns ou des facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide.

CONTRÔLE DE QUALITE

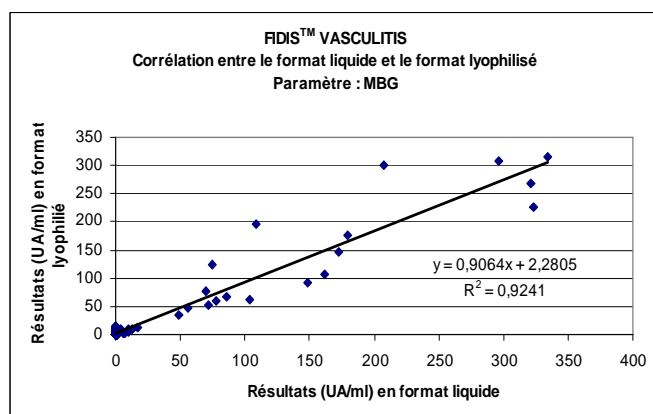
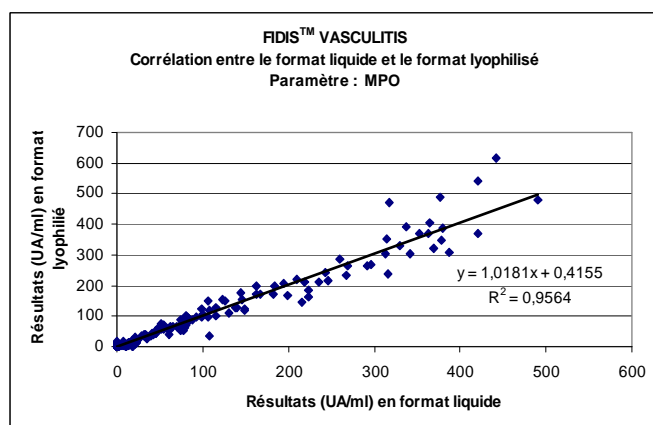
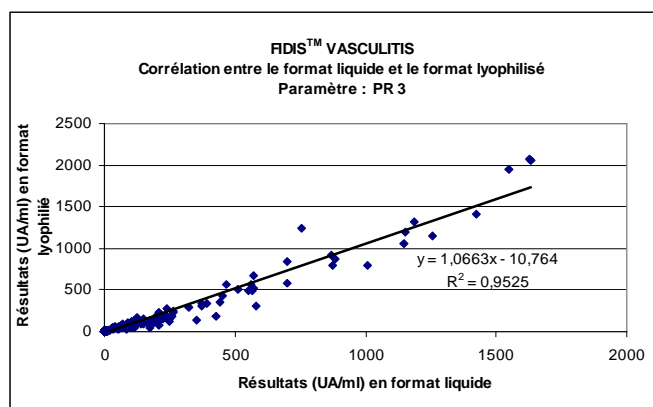
Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour les différentes spécificités. Le contrôle multiparamétrique Immunotrol I (bmd, réf.: HM036) renferme des anticorps humains dirigés contre les spécificités recherchées. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

CORRELATION

Les performances du coffret **FIDIS™ Vasculitis** (sous sa nouvelle forme lyophilisée) ont été comparées à celles de l'ancien coffret **FIDIS™ Vasculitis** (format liquide) sur une population de 283 échantillons.

L'analyse de la courbe de régression linéaire montre que les deux produits sont équivalents.



FIDÉLITÉ DU COFFRET FIDIS™ VASCULITIS (FORMAT LYOPHILISÉ)

Spécificité antigénique	Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Inter-essais (5 tests dans 5 essais différents)	
	Valeur moyenne (UA/ml)	CV (%)	Valeur moyenne (UA/ml)	CV (%)
MPO	43	3,2	48	10,2
MPO	83	2,9	150	7,9
MPO	146	4,2	288	6,4
PR3	20	5,1	24	8,9
PR3	51	1,5	100	13,4
PR3	161	3,2	220	11,7
MBG	50	11,2	90	8,0
MBG	99	2,4	127	5,6
MBG	384	2,5	371	5,3

SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ, CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES MÉTHODES

FIDIS™ Vasculitis a été comparé à trois tests ELISA commercialisés. L'ensemble des résultats discordants a été confirmé avec trois autres tests ELISA 2.

L'étude a porté sur 182 échantillons :

⇒ 117 échantillons positifs provenant de patients souffrants de pathologies associées à la présence d'anticorps anti-ANCA et anti-MBG.

⇒ 65 échantillons négatifs ou susceptibles de provoquer des interférences (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, immunoglobulines monoclonales, complément, facteur rhumatoïde, plasma, échantillons hémolysés et lipémiques)

L'évaluation a été faite sur des échantillons sélectionnés dont les médecins ont demandé des essais sur les désordres des marqueurs ANCA et GMB. Aucune information sur l'âge, le sexe et le statut clinique de l'échantillon n'est disponible.

Le coffret **FIDIS™ Vasculitis** et le test comparatif ELISA s'utilisent sur sérum.

Tous les résultats limites fournis soit par le coffret **FIDIS™ Vasculitis** ou soit par le test ELISA comparatif ont été considérés négatifs.

Résultats

MPO	ELISA	
	Positifs	Négatifs
FIDIS™ Vasculitis Positifs	31	3
Négatifs	2	146

PR3	ELISA	
	Positifs	Négatifs
FIDIS™ Vasculitis Positifs	39	3
Négatifs	7	132

MBG	ELISA	
	Positifs	Négatifs
FIDIS™ Vasculitis Positifs	14	0
Négatifs	0	161

Performances sur la population étudiée

Spécificité antigénique	Sensibilité relative (%)	Spécificité Relative (%)	Concordance (%)
MPO	93.9 (31/33)	98.0 (146/149)	97.3 (177/182)
PR3	84.8 (39/46)	97.8 (132/135)	94.5 (172/182)
MBG	100 (14/14)	100 (161/161)	100 (182/182)

Analyse des résultats discordants

Spécificité antigénique	Résultat FIDIS™+ / ELISA 1 -	Résultat FIDIS™. / ELISA 1 +	Confirmation par le test ELISA 2
MPO	3	/	2/3
	/	2	0/2
PR3	3	/	1/3
	/	7	5/7

⇒ Ces résultats correspondent principalement à des valeurs en limite de positivité, ce qui tend à engendrer des discordances qui restent négligeables.

Mode de détermination du seuil de positivité

Estimé à partir des deux populations utilisées dans l'étude comparative :

⇒ 37 échantillons d'individus sains

⇒ 28 échantillons présentant des interférences potentielles

Le seuil de négativité (20UA/ml) correspond au 100^{ème} percentile pour les spécificités MPO/MBG et au 98.5^{ème} percentile pour PR3.

BIBLIOGRAPHIE

HAGEN EC et al.

Development and standardization of solid-phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application: report of a large clinical evaluation study. Proceedings of the 6th International ANCA Workshop. Paris, 28 June - 1 July 1995.

Clin Exp Immunol, 101/1: 29, 1995.

JENNETTE JC et al.

Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies.

lab Invest 70: 135-137, 1994.

LESAVRE P. et al.

Les autoanticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA). Signification clinique et rôle pathogène.

Polynucléaire Neutrophile et Biologie Clinique. Hôpital Rothschild PARIS. 7avril 1995.

NOEL LH et al.

Les anticorps anticytoplasme des neutrophiles (ANCA): associations cliniques et aspects immunologiques.

Grüfeld JP, éd. Actualités Néphrologiques de l'hôpital Necker. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 223-253, 1992.

RASMUSSEN N. et al.

An ELISA for the detection of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA).

J Immunol Meth 127: 139-145, 1990.

SANCHEZ-LALLOYER N.

Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.

Spectra Biologie, 93/3: 38-43, 1993.

SAXENA R et al.













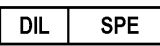

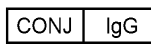

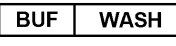
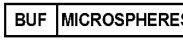

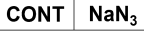

Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome.

J.Intern. Med. 1995, 237, 143-152

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RÉACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits			
Incubation des échantillons	100µl	Tampon de dilution (B1) : blanc réactif	30 min. Température ambiante
	100µl	Contrôle négatif dilué <i>en tampon de dilution (B1)</i>	
	100µl	Contrôle positif dilué <i>en tampon de dilution (B1)</i>	
	100µl	Calibrateur prêt à l'emploi (en double)	
	100µl	Echantillons dilués <i>en tampon de dilution (B1)</i>	
Lavage 1	Laver 2 fois au tampon de lavage (C1) (300µl/puits)		
Incubation du conjugué	100µl	Conjugué anti-IgG Prêt à l'emploi	30 min. Température ambiante
Lavage 2	Laver 1 fois avec du tampon de dilution (B1) (100µl/puits)		
Lecture	<p>Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B1) et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux</p> <p><i>En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.</i></p>		

LEGENDE DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conservé à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Déclaration de conformité CE
	Microplaque		Contrôle négatif		Microspheres
	Diluant échantillon		Contrôle positif		Conjugué IgG
	Calibrateur		Tampon de lavage		Tampon de reconstitution des microsphères
	Test FIDIS		Contient de l'azide de sodium		A reconstituer

BioMédical Diagnostics SA

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

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

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



FIDIS™ Vasculitis

REF

MX 007

96

INTENDED USE

The **FIDIS™ Vasculitis** kit is a quantitative homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the simultaneous detection of 3 autoantibodies specificities:

- **anti-neutrophil cytoplasm antibodies (ANCA)** directed against Myeloperoxidase (*MPO*) and Serine Proteinase 3 (*PR3*).
- **anti-glomerular basement membrane (GBM)** antibodies using a purified antigen based on type IV collagen.

SUMMARY AND EXPLANATION

• ANCA

ANCA antibodies form a family of autoantibodies of which the diagnostic and predictive value for the different necrotising vasculitis and 'overlap' systemic vasculitis, associated with glomerulonephritis or not, is now well established.

They are directed against antigens present in the primary azurophilic granules (alpha granules) of polynuclear neutrophils and in the lysosomes of monocytes.

ANCA antibodies are in the first place detected by means of indirect immunofluorescence using human ethanol-fixed neutrophil slides. The presence of ANCA is characterised in two distinct staining patterns: one cytoplasmic and the other perinuclear. These two types called c-ANCA and p-ANCA, are predominantly related respectively with antibodies to proteinase 3 (PR3) and myeloperoxidase (MPO).

The detection of ANCA with IFA only, may give problems in the differential diagnosis when one realizes that it is possible to have very similar patterns caused by other autoantibodies. This holds true as well in Wegener's granulomatosis and vasculitis, where the association of ANCA with other autoantibodies is described (rheumatoid factor, anti-nuclear antibodies, anti-smooth muscle antibodies, anti-thyroid, etc.) as in collagenosis, autoimmune hepatitis where, besides specific autoantibodies, also ANCA could develop.

The diagnostic sensitivity of ANCA is of particular importance with Wegener's granulomatosis (anti-PR3), Churg Strauss syndrome, microscopic periarteritis and idiopathic crescentic glomerulonephritis (anti-MPO).

These diseases represent a medical emergency and require a safe strategy for the identification of ANCA based on one characterisation in two ways:

- 1- By indirect immunofluorescence where two known patterns give a first orientation to the diagnosis.

- 2- A reliable identification of antibodies against the target antigens (MPO and PR3) with specific immunologic techniques using purified antigens.

• GBM

The measurement of anti-glomerular basement membrane (GBM) autoantibodies is intended as an aid in the diagnosis of Goodpasture's syndrome, based on clinical signs of rapidly progressive renal failure and lung haemorrhage. It concerns an autoimmune disease due to autoantibodies reacting with the components of the glomerular basement membrane (alpha chain 3 of type IV collagen).

This disease progresses rapidly and in a fatal manner in more than 75% of the cases without treatment. A quick diagnosis, based on the examination of anti-GBM autoantibodies as specific markers, is indispensable before the kidney and often the lung undergo important damage. Besides, the continuous presence of these autoantibodies implies a delay of renal transplantation.

The detection of anti-GBM antibodies allows to distinguish Goodpasture's syndrome from other nephropathies of immunologic origin (glomerulonephritis associated with anti-neutrophil cytoplasmic antibodies) who need a total different treatment. A negative result is a very important element for the clinician to exclude the diagnosis of Goodpasture's syndrome.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ Vasculitis kit is based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the external second molecule fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

Each antigen required for the assay is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups. The different antigen coupled microspheres are mixed together constituting the final microspheres reagent.

The **FIDIS™ Vasculitis** kit allows to detect three specific antibodies: anti-MPO, anti-PR3 and anti-GBM antibodies.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains one or more of the suspected antibodies, this(ese) antibody(ies) binds to the corresponding antigen(s) on the various sets of microspheres.
- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.

- A phycoerythrin labelled **anti-human IgG** conjugate is then added that binds to the previously bound antibodies.
- A final wash step allows to stop the reaction.
- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence colour while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.
- A calibration system allows the determination of the titer (AU/mL) of each sample by interpolation for each antigenic specificity.

The **FIDIS™ Vasculitis** kit could be used with **CARIS™** system (diluting and dispensing device).

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

REAGENTS SUPPLIED

96 wells microplate with filtering membrane and lid. MP	1 plate
Vial (A) of color-coded microsphere set of 3 sensitized by MPO (purified from human blood), PR3 (purified from human leucocytes) and GBM purified from bovine tissues) MICROSPHERES <u>Lyophilized</u> (to be reconstituted with the buffer named D)	Sq 6mL
Vial (B1) of sample dilution buffer (white vial) <u>Ready to use</u> DIL SPE	2 x 115mL
Vial of calibrator titrated in arbitrary unit for the specificities to be measured. <u>Ready to use</u> Each titer is printed on the vial label CAL	1 x 1,5mL
Vial of positive control concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. CONTROL + <u>To be diluted</u> Expected values are printed on the vial label.	1 x 250µL
Vial of negative control concentrate <u>To be diluted</u> CONTROL -	1 x 250µL
Vial of anti-human IgG coupled to phycoerythrin <u>Ready to use</u> CONJ IgG	1 x 12mL
Vial (C1) of washing buffer (black vial) <u>Ready to use</u> BUF WASH	1 x 100mL
Vial (D) of reconstitution buffer for the microsphere set <u>Ready to use</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6mL

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5µL to 1000µL
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40µL to 300µL or 5µL to 2 mL
- Vortex mixer
- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath
- Absorbent towel
- Serological pipettes
- Microplate sealing films

CAUTION

- Reagents in solution contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.
- The **FIDIS™ Vasculitis** kit has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ Vasculitis** kit has been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.*

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

TEST SET-UP

FIDIS™ Washer

☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact bmd subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual.
NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.

2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance.

Calibration should also be performed when the temperature is out of the determined range shown on the run batch screen.

3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™ as described in the User's Manual.

4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User's Manual.

5. Analyze the results according the User's Manual.

6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User's Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, allow them to warm up to **room temperature** (+18°C to +25°C), and mix them well.

1. Microsphere preparation

- Reconstitute the microsphere solution by adding the vial **D** of reconstitution buffer to the vial **A** of lyophilized microspheres. Wait 5 minutes and vortex.
- Stable 2 months at +2°C to +8°C, after reconstitution.

2. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:201** in dilution buffer (**B1**).
Ex.: 10µL sample in 2000µL dilution buffer (**B1**).
- **Vortex vigorously.**

3. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. When setting up the test, systematically take into account the following well requirements: ⇒ See examples below

- ✗ 1 "reagent-blank" well
- ✗ 1 well for negative control
- ✗ 1 well for positive control
- ✗ 2 "calibrator" wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one serie of tests if unused wells are protected by microplate sealing film. Any single well can only be used once.

To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user's manual: "Creating a batch or a multi-batch".

Example 1:

- The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S4	S12	S20								
B	Ctrl-	S5	S13	S21								
C	Ctrl+	S6	S14	S22								
D	Cal	S7	S15	S23								
E	Cal	S8	S16	S24								
F	S1	S9	S17	S25								
G	S2	S10	S18									
H	S3	S11	S19									

Example 2:

- 16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blank	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52		
B			Ctrl-	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53		
C			Ctrl+	S6	S14	S22	S30	S38	S46			
D			Cal	S7	S15	S23	S31	S39	S47			
E			Cal	S8	S16	S24	S32	S40	S48			
F			S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49			
G			S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50			
H			S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51			

ASSAY PROCEDURE

1. Microspheres dispensing

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- Ⓢ If CARIS™ is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.
- Ⓢ If a dispensing/diluting device is used (like CARIS™), the procedure steps 1 and 2 should be reversed: ⇒ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres

2. Addition and Incubation of the samples

- Dispense 100µL of sample dilution buffer (**B1**) for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. Wash step 1

Wash the plate 2 times with washing buffer (C1) using filtration unit:

- a. Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- c. Dispense 300µL of washing buffer (C1) in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- e. Dispense 300µL of washing buffer (C1) in all the used wells.
- f. Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- g. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.
- h. Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.
- i. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.
- j. Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. Incubation of the conjugate

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
⇒ After using, close the vial carefully.

5. Wash step 2

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer (B1).

*Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps.
Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both B1 and C1 buffers).*

- a. Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.

- c. Dispense 100µL of dilution buffer (B1) in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- e. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.
- f. Dispense 100µL of dilution buffer (B1) in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.
The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. Reading of the test

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

- a. The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.
- b. The negative controls should be less than 20 AU/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with MLX BOOSTER™ software.

INTERPRETATION OF RESULTS

Arbitrary units (AU/mL)	< 20 AU/mL	20 – 25 AU/mL	> 25 AU/mL
Interpretation	Negative	Borderline ^(*)	Positive

() Borderline results should be repeated on a second sample and the interpretation of the results should be treated in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.*

Each laboratory should establish and maintain its own references (normal) range values, based on the patient population and other local factors.

CALCUL OF RESULTS

☞ The results are automatically calculated by MLX-BOOSTER™ software and can be printed for each assay.

LIMITATION

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

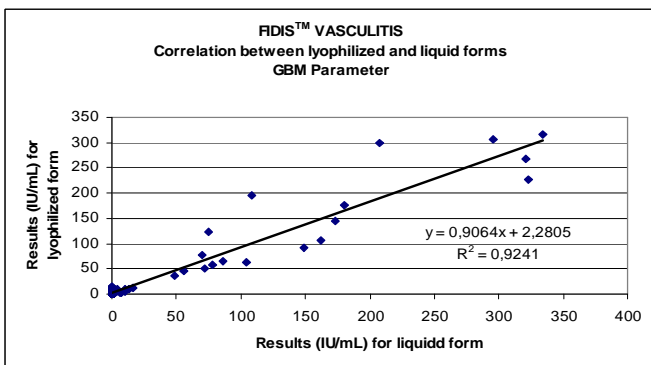
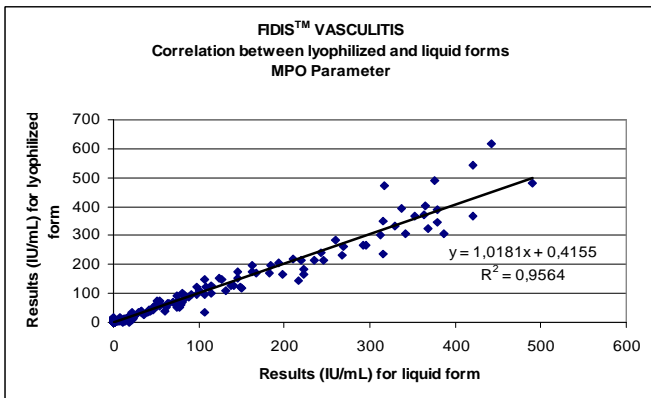
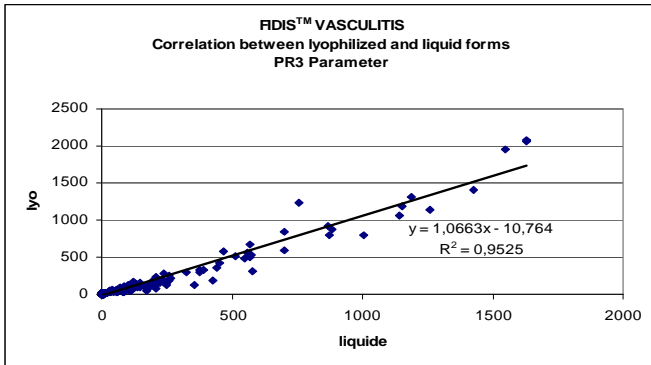
QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. Immunotrol I multiparametric control (bmd, Cat. n° HM036) contains human auto-antibodies directed against researched specificities. To be assayed in the same manner as the unknown samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

CORRELATION

The performances of **FIDIS™ Vasculitis**, lyophilized form were assessed on a population of 283 samples and compared to the performances of **FIDIS™ Vasculitis**, liquid form. A linear regression analysis of the two products showed that both are equivalent.



REPRODUCIBILITY / PRECISION (LYOPHILIZED FORM)

Antigenic specificity	Within-run (10 tests in the same run)		Between-run (5 tests in 5 different runs)	
	Mean value (AU/mL)	CV (%)	Mean value (AU/mL)	CV (%)
MPO	43	3.2	48	10.2
MPO	83	2.9	150	7.9
MPO	146	4.2	288	6.4
PR3	20	5.1	24	8.9
PR3	51	1.5	100	13.4
PR3	161	3.2	220	11.7
GBM	50	11.2	90	8.0
GBM	99	2.4	127	5.6
GBM	384	2.5	371	5.3

INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH OTHER METHODS

A comparative study was conducted to evaluate the performance characteristics of **FIDIS™ Vasculitis** test, relative to three other commercially available ELISA kits.

The study was performed on 182 samples from patients:

⇒ 117 positive samples for one parameter ANCA or GBM.

⇒ 65 negative samples and samples with potential biological interferences.

The evaluation was made on samples selected from a routine laboratory which were asked for markers tests of ANCA and GBM disorders by the physician. No information about age, gender and clinical status is available.

FIDIS™ Vasculitis and predicate devices use serum. All borderline results with **FIDIS™ Vasculitis** test or comparative ELISA tests were considered as negative.

MPO	ELISA	
	Positive	Negative
FIDIS™ Vasculitis Positive	31	3
FIDIS™ Vasculitis Negative	2	146

PR3	ELISA	
	Positive	Negative
FIDIS™ Vasculitis Positive	40	3
FIDIS™ Vasculitis Negative	7	132

GBM	ELISA	
	Positive	Negative
FIDIS™ Vasculitis Positive	21	0
FIDIS™ Vasculitis Negative	0	161

Performances for the selected population

Antigen	Positive percent agreement	Negative percent agreement	Overall agreement
MPO	93.9 % (31/33)	98.0 % (146/149)	97.3 % (177/182)
PR3	85.1 % (40/47)	97.8 % (132/135)	94.5 % (172/182)
GBM	100 % (21/21)	100 % (161/161)	100 % (182/182)

Discrepant results analysis

Antigen	FIDIS™+ / ELISA 1 – results	FIDIS™- / ELISA 1 + Results	Confirmed results with ELISA 2
MPO	3	/	2/3
	/	2	0/2
PR3	3	/	1/3
	/	7	5/7

⇒ a lot of these results are in limit of positivity, which can lead to no significant discrepancies.

Expected values

They were estimated from the 2 populations previously used for the comparative study:

⇒ 37 samples from blood donors

⇒ 28 samples selected for their potential biological interferences

The negative thresholds (20AU/mL) correspond to the 100th of percentile for MPO/GBM and 98.5th of percentile for PR3 for the populations studied.













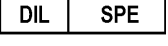

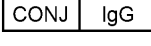

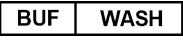
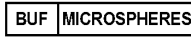



BIBLIOGRAPHY

- HAGEN EC et al.
Development and standardization of solid-phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) for clinical application: report of a large clinical evaluation study. Proceedings of the 6th International ANCA Workshop. Paris, 28 June - 1 July 1995.
Clin Exp Immunol, 101/1: 29, 1995.
- JENNETTE JC et al.
Pathogenic potential of anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibodies.
lab Invest 70: 135-137, 1994.
- LESAVRE P. et al.
Les autoanticorps anti-cytoplasme des neutrophiles (ANCA). Signification clinique et rôle pathogène.
Polynucléaire Neutrophile et Biologie Clinique. Hôpital Rothschild PARIS. 7avril 1995.
- NOEL LH et al.
Les anticorps anticytoplasme des neutrophiles (ANCA): associations cliniques et aspects immunologiques.
Grüfeld JP, éd. Actualités Néphrologiques de l'hôpital Necker. Paris: Flammarion Médecine-Sciences, 223-253, 1992.
- RASMUSSEN N. et al.
An ELISA for the detection of antineutrophil cytoplasm antibodies (ANCA).
J Immunol Meth 127: 139-145, 1990.
- SANCHEZ-LALLOYER N.
Les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles.
Spectra Biologie, 93/3: 38-43, 1993.
- SAXENA R et al.
Circulating autoantibodies as serological markers in the differential diagnosis of pulmonary renal syndrome.
J.INTERN. MED. 1995, 237, 143-152

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

	VOLUME TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used			
Incubation of the samples	100µL	Dilution buffer (B1): reagent blank	30 min. Room temperature
	100µL	Diluted negative control <i>in dilution buffer (B1)</i>	
	100µL	Diluted positive control <i>in dilution buffer (B1)</i>	
	100µL	Ready-to-use Calibrator (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples <i>in dilution buffer (B1)</i>	
Washing 1	Wash twice in washing buffer (C1) (300µL/well)		
Incubation of the conjugate	100µL	Ready to use Anti-IgG conjugate	30 min Room temperature
Washing 2	Wash 1 time in Dilution buffer (B1) (100µL/well)		
Reading	Add 100µL/well of Dilution buffer (B1) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument <i>The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight</i>		

SYMBOLS USED

	Biological risk		Temperature limitation		Catalog Number
	Read instructions for use		In Vitro Diagnostic Use		Lot Number
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Microplate		Negative control		Microspheres
	Specimen diluent		Positive control		IgG Conjugate
	Calibrator		Wash Buffer		Microsphere reconstitution buffer
	FIDIS test		Contains sodium azide		Reconstitute with

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

