

Antinøytrofile cytoplasmaautoantistoffer ved systemiske vaskulitter

Bakgrunn. Antinøytrofile cytoplasmaautoantistoffer (ANCA) er antistoffer rettet mot antigener i cytoplasma til nøytrofile granulocytter og monocytter. Påvisning av ANCA har vist seg å være et nyttig diagnostisk verktøy for en gruppe systemiske vaskulitter, spesielt Wegeners granulomatose.

Materiale og metode. I denne studien er prøvesvar fra 319 pasienter som er testet både ved ELISA og immunfluorescens blitt vurdert. 27 av pasientene hadde diagnosen Wegeners granulomatose.

Resultater. Sensitiviteten for diagnosen Wegeners granulomatose var 70 % med C-ANCA og 63 % for PR3-ELISA. Spesifisiteten var henholdsvis 97 % og 99 %. Positiv prediktiv verdi for diagnosen Wegeners granulomatose var 68 % for C-ANCA og 90 % for PR3-ELISA. Negativ prediktiv verdi var for begge 97 %.

Fortolkning. Vi anbefaler at immunfluorescensmetoden brukes til screening ved spørsmål om ANCA-assosiert vaskulitt. Flere antigenspesifisiteter kan imidlertid gi positiv immunfluorescens, og det skal alltid utføres PR3-ELISA og MPO-ELISA dersom immunfluorescenstesten er positiv.

Antinøytrofile cytoplasmaautoantistoffer (ANCA) er en gruppe antistoffer rettet mot ulike komponenter i de nøytrofile granulocyttenes og monocyttenes cytoplasma. Den kliniske betydningen av ANCA ble antydnet allerede i 1982 av Davies og medarbeidere (1), og tre år senere beskrev van der Woude og medarbeidere ANCA som sensitive og spesifikke markører for Wegeners granulomatose (2). ANCA er sterkt assosiert med systemiske vaskulitter som involverer små kar, slik som Wegeners granulomatose, mikroskopisk polyangiitt, Churg-Strauss' syndrom og idiopatisk nekrotiserende halvmåneglomerulonefritt (tab 1) (3–7).

Det er registrert en økende insidens av systemiske vaskulitter de siste tiår, men det er usikkert om økningen er reell eller om den skyldes økt bevissthet blant klinikerne om disse sykdommene (8–10). Sannsynligvis skyldes en del av økningen innføring av ANCA-tester som et diagnostisk hjelpemiddel. I en norsk studie ble insidensen av

Jostein Skjalg Hagemo

jskjalg@online.no

Medisinsk avdeling

Sykehuset i Vestfold

3116 Tønsberg

Knut Aasarød

Institutt for abdominale fag

Torolf Moen

Institutt for laboratoriemedisin

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

7489 Trondheim

Hagemo JS, Aasarød K, Moen T.

Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in systemic vasculitis.

Tidsskr Nor Lægeforen 2002; 122: 1185–8.

Background. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies (ANCA) are directed against antigens located in the cytoplasm of neutrophil granulocytes and monocytes. Detection of ANCA has proved to be a useful diagnostic tool for a group of systemic vasculitis, especially Wegener's granulomatosis. Both indirect immunofluorescence (IIF) and ELISA have been used to detect ANCA.

Material and methods. In this study, samples from 319 patients tested by both immunofluorescence and ELISA were evaluated; 27 of these were diagnosed with Wegener's granulomatosis.

Results. The diagnostic sensitivity for Wegener's granulomatosis was 70 % for C-ANCA and 63 % for PR3-ANCA. The specificity was 97 % and 99 % respectively. Positive predictive value for the diagnosis of Wegener's granulomatosis in our population was 68 % for C-ANCA and 90 % for PR3-ANCA. Negative predictive value was 97 % and 97 % respectively.

Interpretation. We recommend that immunofluorescence is used for screening when an ANCA-associated vasculitis is suspected. However, a number of antigen specificities can provide the immunofluorescence patterns, and for this reason we recommend PR3-ELISA and MPO-ELISA tests whenever the immunofluorescence test is positive.

Wegeners granulomatose med nyreaffeksjon funnet å være ca. fem per million per år i perioden 1988–98 (11), og med en økende insidens mot slutten av tiårsperioden (K. Aasarød, personlig meddelelse).

Initialt ble ANCA i serum påvist ved indirekte immunfluorescens, der man brukte etanolfikserte normale granulocytter som antigensubstrat. Fluorescensmønsteret på cellene ble beskrevet som cytoplasmatisk (C-ANCA) og perinukleært (P-ANCA) (12).

Ved C-ANCA-positivitet er fluorescensen granulær og fordelt i cytoplasmaet, ofte med en aksentuering mellom de nukleære lappene. P-ANCA-mønsteret innebærer farging av det perinukleære området og representerer et artefakt forårsaket av etanolfikseringen, som fører til at positivt ladede partikler i cytoplasma beveger seg mot den negativt ladede cellekjernen (fig 1). Nøytrale eller svakt kationiske partikler manifesterer ikke dette mønsteret. Ved tilsvarende testing på formalinfikserte granulocytter vil begge disse autoantistoffene gi et cytoplasmatisk mønster. Fluorescensmønstre som atskiller seg fra C- og P-ANCA, betegnes som atypisk ANCA og sees ved andre antigenspesifisiteter (13).

En nøytral serinprotease, proteinase-3 (PR3), er det viktigste antigenet for C-ANCA. PR3 finnes i de primære granula i nøytrofile granulocytter og i monocyttenes lysosomer, og renfremstilte antigener kan anvendes i spesifikke ELISA-tester. Når C-ANCA er til stede hos pasienter med Wegeners granulomatose, er antigenet som oftest PR3 (5). Myeloperoksidase (MPO) er et positivt ladet enzym som også finnes i granula i nøytrofile granulocytter og i monocytter. Hos pasienter med mikroskopisk polyangiitt, Churg-Strauss' syndrom og idiopatisk nekrotiserende halvmåneglomerulonefritt som er P-ANCA-positive, er myeloperoksidase det antigenet det oftest påvises antistoff mot. P-ANCA-mønsteret kan imidlertid også sees hos pasienter med andre sykdommer som for eksempel systemisk lupus erythematosus, revmatoid artritt (14), inflammatorisk tarmsykdom (13, 15) og Henoch-Schönleins purpura (16). Antigenet er da som oftest ikke myeloperoksidase, men kan blant andre være elastase, cathepsin-G, azurocidin, laktoferrin eller lysozym (13). Disse sykdomsassosiasjonene er mindre godt kartlagt, og de er heller ikke så sterke at slik testing har fått praktisk diagnostisk anvendelse.

I denne studien har vi ønsket sammenlikne testmetodene for ANCA-diagnostikk ved St. Olavs Hospital, herunder beregning av sensitivitet og spesifisitet, samt positiv og negativ prediktiv verdi for testene hos pasienter med Wegeners granulomatose.

Materiale og metode

Testprosedyrer

Fra september 1997 til november 1998 ble alle ANCA-rekvisisjoner testet både med ELISA og med immunfluorescens. Fra no-

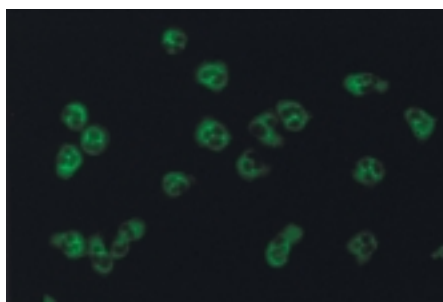
vember 1998 er immunfluorescens brukt som screeningmetode, og alle positive resultater blir kontrollert med ELISA-tester.

NovaLite immunofluorescence assay. Etanol- og formalinfikserte humane nøytrofile granulocytter er bundet i brønner på separate objektglass, og eventuelle antistoffer i pasientserum med spesifisitet for granulocytene bindes ved inkubasjon med serumfortynning. Et fluorescerende antihumant IgG-konjugat tilsettes og binder seg til serumantistoffet (fig 1).

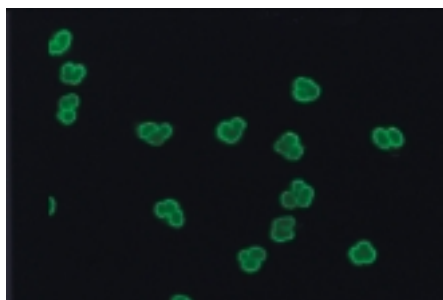
Quanta Lite ELISA kit. To forskjellige analysesett har henholdsvis myeloperoksidase og PR3 som renfremstilte humane antigener bundet til brønnene på mikrotiterplate. Ved inkubasjon med serumfortynning som inneholder antistoff spesifikt mot disse vil antistoffet bindes. Et kromogent substrat bundet til enzymmerket antiglobulin mot humant IgG tilsettes, og fargeintensiteten avspeiler antistoffmengden.

Intertestreliabilitet for immunfluorescens

Alle sera i testperioden var nedfrys til -20°C og tilgjengelig for retesting. Alle sera fra 3. kvartal 1998 som var C/P-ANCA-positive, ble tint opp og testet på nytt med ANCA-immunfluorescens. Dette utgjorde 42 prøver. 23 tilfeldig valgte negative prøver fra samme periode ble også retestet med immunfluorescens. Immunfluorescenstestene ble vurdert av en medisinstudent som hadde gjennomgått et interaktivt opplæringsprogram (ANCA-tutor), samt vurdert 100 immunfluorescenstester i vanlig rutinediagnostikk. Vedkommende hadde ikke kunnskap om tidligere funn. Fullstendig overensstemmelse mellom opprinnelig resultat og resultat av retestingen innebar at



a



b

Figur 1 a) Positivt C-ANCA-immunfluorescensmønster slik det fremstår ved etanolfiksering av nøytrofile granulocytter. Fargeoppladningen er lokalisert i cytoplasma. b) Positivt P-ANCA-immunfluorescensmønster slik det fremstår ved etanolfiksering av nøytrofile granulocytter. Fargeoppladningen er lokalisert perinukleært

både det etanolfikserte og det formalinfikserte preparatet ble vurdert likt. Delvis overensstemmelse forelå dersom enten det formalinfikserte preparatet eller det etanolfikserte preparatet ble vurdert forskjellig. Dersom både etanol- og formalinfiksering var avvikende fra den opprinnelige vurde-

ringen, ble dette kategorisert som fullstendig uoverensstemmelse.

Pasienter med Wegeners granulomatose og vaskulitter

Diagnosene til ANCA-testede pasienter ble hentet frem. Opplysningene fra journalene til pasientene som hadde fått diagnosen Wegeners granulomatose, ble vurdert ut fra klassifikasjonskriteriene utarbeidet av American College of Rheumatology (ACR) (7), og pasientene som oppfylte to eller flere av kriteriene, ble vurdert å ha sykdommen. Positiv ANCA inngår ikke som ett av kriteriene. På bakgrunn av testresultatene ble så sensitivitet og spesifisitet beregnet for hver av de fire ANCA-testene med henblikk på diagnosen Wegeners granulomatose (ICD-9, 446.4).

Resultater

408 sera fra 319 pasienter ble testet for henholdsvis C-ANCA, P-ANCA og med anti-PR3- og -MPO-ELISA.

Av de 319 pasientene var det 29 som hadde fått diagnosen Wegeners granulomatose. 27 av de 29 pasientene oppfylte minst to av de fire ACR-kriteriene for diagnosen Wegeners granulomatose (tab 1). Dette gir en pretest-sannsynlighet i materialet på 8,5 %. Av de 27 pasientene var 17 menn (63 %) og ti kvinner (37 %). Median alder var 42 år, med spredning 14–80 år. For to av de 29 pasientene med diagnosen Wegeners granulomatose sannsynliggjorde en gjennomgang av sykejournalen at det dreide seg om henholdsvis revmatoid artritt og mikroskopisk polyangiitt.

Ved immunfluorescenstest fant vi at av de 27 pasientene med verifisert diagnose var 19 C-ANCA-positive. Dette gir en sensitivitet på 70 %. I tillegg var P-ANCA positiv hos to av pasientene (7 %). For P-ANCA og C-ANCA til sammen gir dette en sensitivitet på 78 % når det gjelder Wegeners granulomatose. Atypisk ANCA ble påvist hos tre pasienter (10 %) med Wegeners granulomatose. I ELISA-testen var 17 av pasientene (63 %) positive for PR3-ELISA, mens to (7 %) var positive for MPO-ELISA. Samlet sensitivitet for ELISA var 70 %.

283 av 292 pasienter uten Wegeners granulomatose var P- og C-ANCA-negative. Dette gir en spesifisitet på 97 %. For ELISA-testen var 290 av 292 negative for PR3-ELISA, en spesifisitet på 99 %. Tilsvarende var 269 MPO-ELISA-negative, en spesifisitet på 92 % (fig 2). Positiv prediktiv verdi for diagnosen Wegeners granulomatose var 90 % for PR3-ELISA, vesentlig høyere enn for C-ANCA (fig 3).

302 av de 319 pasientene som var ANCA-testet var i tillegg testet for antinukleære antistoffer (ANA). 58 av pasientene (19 %) var ANA-positive. Av de pasientene som hadde fått påvist P-ANCA, var 70 % i tillegg vurdert som ANA-positive. Tilsvarende tall for dem med atypisk ANCA var 46 % og for C-ANCA 13 %.

Tabell 1 Benevnelse og definisjoner på ANCA-assosierte systemiske vaskulitter (6, 7)

Wegeners granulomatose

Nasal og oral inflammasjon (smertefulle eller smertefrie orale ulcerasjoner eller purulent/blodig nasal utflod)

Abnormale lungefunn på røntgen (knuter, faste infiltrater eller caverner)

Urinsediment (mikrohematuri eller erytrocyttsylindere i sedimentet)

Granulomatøs inflammasjon i biopsi (histologiske forandringer som viser granulomatøs inflammasjon i arterieveggen eller i det perivaskulære eller ekstravaskulære område i arterier eller arterioler)

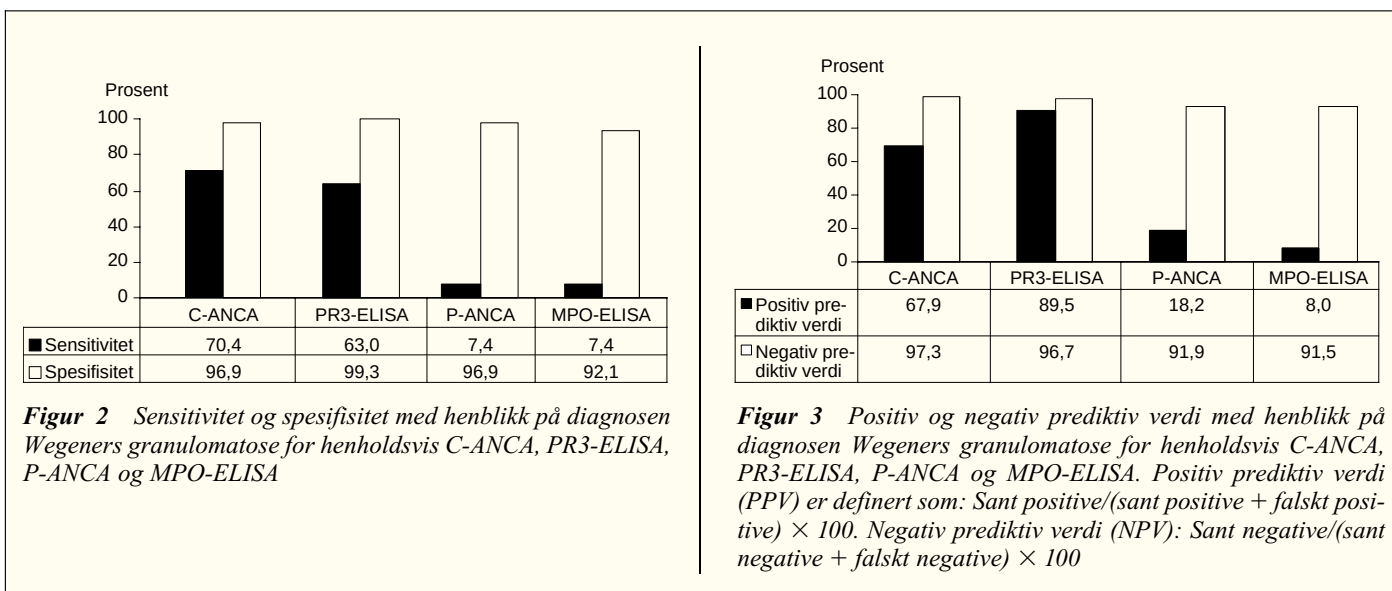
Mikroskopisk polyangiitt¹

Nekrotiserende vaskulitt med få eller ingen immunedslag og som affiserer små kar (kapillærer, venyler eller arterioler). Nekrotiserende arteritt i små til mellomstore arterier kan sees. Betennelse i lungekapillærer er ofte til stede. Nekrotiserende glomerulonefritt er svært vanlig

Churg-Strauss' syndrom

Eosinofilrik og granulomatøs betennelse i luftveiene, samt nekrotiserende vaskulitt i små til mellomstore kar. Tilstanden er assosiert med astma og til eosinofili i blod

¹ Idiopatisk nekrotiserende halvmanøglomerulonefritt (IHGN) regnes som mikroskopisk polyangiitt lokalisert kun til nyrene



Intertestrelabilitet for immunfluorescens

Av de til sammen 65 sera som ble testet om igjen, var det fullstendig overensstemmelse mellom den gamle og den nye vurderingen i 41 av tilfellene (80 %). Delvis overensstemmelse forelå i sju tilfeller (11 %). I seks (9 %) av serumprøvene var det fullstendig uoverensstemmelse. Alle de seks prøvene med full uoverensstemmelse var vurdert som svake reaksjoner, og fem av dem hadde negativ ELISA for anti-MPO og -PR3.

Diskusjon

De siste ti årene har ANCA fått en sentral plass i utredning og oppfølging av pasienter med systemiske vaskulitter. I vårt materiale var sensitiviteten for C-ANCA 70 % for pasienter med Wegeners granulomatose. Sensitiviteten i tilsvarende studier har variert fra 56 % (17) til 93 % (18). En metaanalyse har vist at sensitiviteten er svært avhengig av om sykdommen er aktiv eller i remisjon (19).

Hos pasientene med Wegeners granulomatose hadde PR3-ELISA i vårt materiale en sensitivitet på 63 % og MPO-ELISA tilsvarende 7 %. Det rapporteres i litteraturen om sensitivitet fra 65 % (20) og opptil 85 % (21) for PR3-ELISA i denne pasientgruppen. Tidligere studier har imidlertid vist at opptil 24 % av pasienter med Wegeners granulomatose kan ha MPO-ELISA-positivitet (20).

Spesifisiteten for C-ANCA var i vårt materiale 97 % for diagnosen Wegeners granulomatose. Spesifisiteten for PR3-ELISA var 99 %. Rao og medarbeidere rapporterer en spesifisitet på 98 % (95 % KI 96–99,5 %) når man regner med alle stadier av sykdommen (19). Ingen av pasientene i vårt materiale var positive for både MPO-ELISA og PR3-ELISA. Dette kan tyde på at spesifisitet mot disse to antigenene er gjensidig utelukkende.

Positiv og negativ prediktiv verdi for ANCA-testene vil påvirkes av pretestsannsynligheten for at pasienten har vaskulitt. For en pasient med raskt forløpende glomerulonefrittsyndrom vil positiv prediktiv verdi være ca. 98 % når både C-ELISA og PR3-ELISA er positiv, mens den vil synke til ca. 47 % dersom pasienten kun har proteinuri, hematuri og serum-kreatinin < 130 µmol/l. (22). Med en pretestsannsynlighet på 8,5 % for Wegeners granulomatose, som i vårt materiale, synes en positiv prediktiv verdi for PR3-ANCA på 90 % å være et godt resultat.

I gruppen av pasienter med P-ANCA og atypisk ANCA påviste vi en høy andel av sera som var positive for antinukleære antistoffer (ANA). P-ANCA kan til forveksling likne en homogen/perifer ANA. Der hvor det påvises mulig positiv P-ANCA, bør alltid også ELISA-test utføres, selv om P-ANCA-reaksjonen antas å skyldes positiv ANA. Det er imidlertid viktig å presisere at positiv ANA-test ofte er til stede sammen med positiv ANCA, og at positive prøver på immunfluorescens også bør testes med ELISA. Da immunfluorescensten synes å være mer sensitiv enn ELISA, spesielt for anti-PR3, har vi valgt å bruke immunfluorescenstesten til screening og ELISA som en konfirmerende og kvantitativ test. Flere pasienter som under behandling er blitt ELISA-negative, er fortsatt immunfluorescenspositive.

Retesting av 42 serumprøver som var tilgjengelige ved avdeling for immunologi og transfusjonsmedisin viste at retestrelabiliteten er relativt god for immunfluorescens. Bare 9 % av prøvesvarene var ikke i samsvar med tidligere analyse, og denne uoverensstemmelsen skyldtes i hovedsak ulik tolking av svakt positive resultater.

Vår undersøkelse var ikke utformet for å vise en eventuell sammenheng mellom an-

tistoffenes styrke over tid og sykdommens aktivitet. Flere tidligere undersøkelser konkluderer imidlertid med at for pasienter med Wegeners granulomatose faller ANCA-titrene signifikant når sykdommen går i remisjon (18, 23, 24), og at høye ANCA-titere og titerstigning indikerer økt risiko for tilbakefall (25). Andre studier konkluderer med en relativt begrenset verdi av å bruke ANCA-titer i monitorering av sykdomsforløpet (13, 26, 27).

En patofysiologisk rolle for ANCA i utviklingen av systemisk vaskulitt er sannsynlig, men ennå ikke bevist (28). Aktivisering av nøytrofile granulocytter ved ulike stimuli, slik som TNF-α, IL-1, IF-γ, komplementfragmenter og sannsynligvis også av ANCA selv, kan føre til at proteiner fra de azurofile granula, blant andre PR3, translokere til celleoverflaten, hvor ANCA kan binde seg til dem (29, 30). ANCA bundet til PR3 er vist å indusere oksidativ frigjøring og degranulering (29, 31). Det er også eksperimentelle indisier på at PR3 forbigående kan bli uttrykt på endoteloverflaten og dermed muliggjøre en direkte binding av ANCA til endotelcellene og slik forsterke den inflammatoriske prosessen (32). Det er imidlertid fremdeles et ubesvart spørsmål hvorfor ANCA er til stede hos disse pasientene, og hvorfor antistoffene ikke kan påvises f.eks. i nyrebiopsier hos pasienter med ANCA-assosiert glomerulonefritt (33, 34).

På basis av våre og andres undersøkelser anbefaler vi at hos pasienter der det er klinisk mistanke om systemisk vaskulitt, bør indirekte immunfluorescens-ANCA brukes som screening. Hos pasienter der C-ANCA, P-ANCA eller atypisk ANCA blir påvist, bør MPO- og PR3-ELISA brukes til verifikasjon.

Litteratur →

Litteratur

1. Davies DJ, Moran JE, Niall JF, Ryan GB. Segmental necrotising glomerulonephritis with anti-neutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *BMJ* 1982; 285: 606.
2. van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, van Es LA et al. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* 1985; 1: 425–9.
3. Goeken JA. Antineutrophil cytoplasmic antibody – a useful serological marker for vasculitis. *J Clin Immunol* 1991; 11: 161–74.
4. Geffriaud-Ricouard C, Noel LH, Chauveau D, Houhou S, Grunfeld JP, Lesavre P. Clinical spectrum associated with ANCA of defined antigen specificities in 98 selected patients. *Clin Nephrol* 1993; 39: 125–36.
5. Hagen EC, Andrassy K, Csernok E, Daha MR, Gaskin G, Gross WL et al. Development and standardization of solid phase assays for the detection of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA). A report on the second phase of an international cooperative study on the standardization of ANCA assays. *J Immunol Methods* 1996; 196: 1–15.
6. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL et al. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 187–92.
7. Leavitt RY, Fauci AS, Bloch DA, Michel BA, Hunder GG, Arend WP et al. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1101–7.
8. Scott DG, Bacon PA, Elliott PJ, Tribe CR, Wallington TB. Systemic vasculitis in a district general hospital 1972–1980: clinical and laboratory features, classification and prognosis of 80 cases. *Q J Med* 1982; 51: 292–311.
9. Watts RA, Carruthers DM, Scott DG. Epidemiology of systemic vasculitis: changing incidence or definition? *Semin Arthritis Rheum* 1995; 25: 28–34.
10. Koldingsnes W, Nossent H. Epidemiology of Wegener's granulomatosis in northern Norway. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 2481–7.
11. Aasrod K, Iversen BM, Hammerstrøm J, Bostad L, Jørstad S. Wegener's granulomatosis: clinical course in 108 patients with renal involvement. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 611–8.
12. Wiik A. Delineation of a standard procedure for indirect immunofluorescence detection of ANCA. *APMIS Suppl* 1989; 6: 12–3.
13. Hoffman GS, Specks U. Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1521–37.
14. Merkel PA, Polisson RP, Chang Y, Skates SJ, Niles JL. Prevalence of antineutrophil cytoplasmic antibodies in a large inception cohort of patients with connective tissue disease. *Ann Intern Med* 1997; 126: 866–73.
15. Saxon A, Shanahan F, Landers C, Ganz T, Targan S. A distinct subset of antineutrophil cytoplasmic antibodies is associated with inflammatory bowel disease. *J Allergy Clin Immunol* 1990; 86: 202–10.
16. O'Donoghue DJ, Nusbaum P, Noel LH, Halbwachs-Mecarelli L, Lesavre P. Antineutrophil cytoplasmic antibodies in IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura. *Nephrol Dial Transplant* 1992; 7: 534–8.
17. Ludemann G, Gross WL. Autoantibodies against cytoplasmic structures of neutrophil granulocytes in Wegener's granulomatosis. *Clin Exp Immunol* 1987; 69: 350–7.
18. Cohen Tervaert JW, van der Woude FJ, Fauci AS, Ambrus JL, Velosa J, Keane WF et al. Association between active Wegener's granulomatosis and anticytoplasmic antibodies. *Arch Intern Med* 1989; 149: 2461–5.
19. Rao JK, Weinberger M, Oddone EZ, Allen NB, Landsman P, Feussner JR. The role of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (c-ANCA) testing in the diagnosis of Wegener granulomatosis. A literature review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 1995; 123: 925–32.
20. Hagen EC, Daha MR, Hermans J, Andrassy K, Csernok E, Gaskin G et al. Diagnostic value of standardized assays for anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in idiopathic systemic vasculitis. EC/BCR Project for ANCA Assay Standardization. *Kidney Int* 1998; 53: 743–53.
21. Westman KW, Selga D, Bygren P, Segelmark M, Baslund B, Wiik A et al. Clinical evaluation of a capture ELISA for detection of proteinase-3 antineutrophil cytoplasmic antibody. *Kidney Int* 1998; 53: 1230–6.
22. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Diagnostic predictive value of ANCA serology. *Kidney Int* 1998; 53: 796–8.
23. Specks U, Wheatley CL, McDonald TJ, Rohrbach MS, DeRemee RA. Anticytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and follow-up of Wegener's granulomatosis. *Mayo Clin Proc* 1989; 64: 28–36.
24. Jayne DR, Gaskin G, Pusey CD, Lockwood CM. ANCA and predicting relapse in systemic vasculitis. *QJM* 1995; 88: 127–33.
25. De'Oliviera J, Gaskin G, Dash A, Rees AJ, Pusey CD. Relationship between disease activity and anti-neutrophil cytoplasmic antibody concentration in long-term management of systemic vasculitis. *Am J Kidney Dis* 1995; 25: 380–9.
26. Pettersson E, Heigl Z. Antineutrophil cytoplasmic antibody (cANCA and pANCA) titers in relation to disease activity in patients with necrotizing vasculitis: a longitudinal study. *Clin Nephrol* 1992; 37: 219–28.
27. Nowack R, Grab I, Flores-Suarez LF, Yard B, van der Woude FJ. ANCA titres and soluble CD14 does not reflect disease activity in patients with ANCA associated vasculitis. *Clin Exp Immunol* 2000; 120 (Suppl 1): 70A.
28. Jennette JC. Renal involvement in systemic vasculitis. I: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG, red. Heptinstall's pathology of the kidney. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998: 1059–95.
29. Falk RJ, Terrell RS, Charles LA, Jennette JC. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 4115–9.
30. Csernok E, Ernst M, Schmitt W, Bainton DF, Gross WL. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 244–50.
31. Keogan MT, Esnault VL, Green AJ, Lockwood CM, Brown DL. Activation of normal neutrophils by anti-neutrophil cytoplasm antibodies. *Clin Exp Immunol* 1992; 90: 228–34.
32. Mayet WJ, Csernok E, Szymkowiak C, Gross WL, Meyer zum Buschenfelde KH. Human endothelial cells express proteinase 3, the target antigen of anticytoplasmic antibodies in Wegener's granulomatosis. *Blood* 1993; 82: 1221–9.
33. Ronco P, Verroust P, Mignon F, Kourilsky O, Vanhille P, Meyrier A et al. Immunopathological studies of polyarteritis nodosa and Wegener's granulomatosis: a report of 43 patients with 51 renal biopsies. *QJM* 1983; 52: 212–23.
34. Jennette JC, Wilkman AS, Falk RJ. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and vasculitis. *Am J Pathol* 1989; 135: 921–30.

○