

Detección de anticuerpos anti-núcleo con inmunoensayo lineal. Correlación con inmunofluorescencia indirecta*

► Nora Silvia Bovone¹, María Cristina Fuente¹, Mario Omar Eposto³, Paula Londero³

-
1. Bioquímica.
 2. Bioquímico. Jefe de Sección.
 3. Bioquímica. Jefa de residentes.

* Área Proteínas-Autoinmunidad de la Sección Estudios Especiales. Servicio de Bioquímica del Hospital. Nacional A. Posadas, Av. Presidente Illia y Marconi, El Palomar. Provincia de Buenos Aires. Argentina.

Resumen

La prueba usada como *screening* para la detección de autoanticuerpos en enfermedades sistémicas del tejido conectivo es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células Hep-2. No obstante, para identificar el perfil de anticuerpos específicos se emplean métodos adicionales como doble difusión, *immunoblotting*, ELISA o inmunoensayo lineal (LIA). El objetivo del presente estudio fue: a) Evaluar la probabilidad de detectar reactividad fina por un LIA comercial sobre muestras de suero que resultaron IFI positivas en el *screening* y b) Estudiar su correlación con los patrones y títulos observados. Para ello fueron retrospectivamente seleccionadas 161 muestras de suero positivas por IFI que también fueron procesadas por LIA. Se emplearon improntas de Hep-2 (Kallestad) y equipo comercial Innolia-ANA de Innogenetic. Además, 60 de estas muestras fueron estudiadas para anti ácido desoxirribonucleico nativo (anti-dsADN) por IFI sobre improntas de *Crithidia Lucillae* (Kallestad). En las muestras con patrón homogéneo la positividad por LIA fue del 60% con prevalencia de anti-histonas y anti-dsADN. Se destaca el hallazgo de anticuerpos anti-ENA (antígenos nucleares extraíbles) en este grupo. La positividad del patrón moteado fue del 73%. La imagen moteada se asoció en forma más contundente a la presencia de anticuerpos anti-ENA, la imagen homogénea aportó escasa información respecto del perfil de anticuerpos específicos dada la elevada prevalencia de anti-ENA en estas muestras. El patrón centromérico no necesita confirmación. La probabilidad de encontrar reactividad fina por LIA se incrementa con el aumento de título informado, quedando justificada su búsqueda aun en muestras con bajo título de anticuerpos.

Palabras clave: autoanticuerpos * inmunofluorescencia indirecta * inmunoensayo* estadísticas no paramétricas

Summary

ANTI-NUCLEUS ANTIBODIES DETECTION BY LINE IMMUNOASSAY. CORRELATION WITH INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE

The most used screening test to detect autoantibodies in systemic diseases is indirect immunofluorescence (IIF) with Hep-2 cells. However, additional methods, such as double diffusion, immunoblotting, ELISA or line immunoassay (LIA), are used to identify specific antibodies profiles. The aim of this

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

study was: a) To assess the probability of fine detection by a commercial LIA on serum samples that resulted positive by IIF screening and b) To assess the correlation between the patterns and titles observed. A hundred and sixty-one serum samples positive by IIF that had also been processed by LIA were selected. Hep-2 slides of Kallestad and commercial kit Innolia-ANA of Innogenetics were used. Sixty samples were also studied for anti-dsDNA by IIF with Crithidia Lucilliae slides of Kallestad. Sixty per cent of the samples with homogeneous pattern were positive by LIA, with a prevalence of anti-histones and anti-dsDNA. The finding of antibodies anti-ENA in this group was important. In the speckle sample, 73% were positive. In detecting anti-ENA, speckle sample was more forceful than homogeneous pattern which showed little information about a specific antibodies profile. Anticentromere pattern did not need confirmation. The probability of finding fine reactivity by LIA is increased with the rise in title, but its search for low titles is still justified.

Key words: autoantibodies * indirect immunofluorescence * immunoassay * nonparametric statistics

Introducción

La detección de anticuerpos anti-núcleo (ANA) es comúnmente usada ya sea para *screening* como herramienta diagnóstica o para monitoreo de enfermedades del tejido conectivo como lupus eritematoso sistémico (LES), esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren, enfermedad mixta del tejido conectivo y polimiositis. El procedimiento de laboratorio más común para ello es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que usa como sustrato antigénico corte de tejido de roedores, como hígado de rata, o líneas celulares de cultivo como células Hep-2, una línea celular epitelial de origen humano. Este *test* es empleado como *screening* ya que, salvo unas pocas excepciones, una prueba positiva por IFI indica la presencia de ANA pero no permite su identificación (1-3) y dado que la mayoría de las enfermedades del tejido conectivo se asocian a perfiles particulares de autoanticuerpos, la identificación de la reactividad fina es una información valiosa como ayuda diagnóstica (4) (5). Con estos propósitos se emplean *tests* adicionales como inmunoprecipitación en agar, *immunoblotting*, ELISA o inmunoensayo lineal. La disponibilidad de metodologías y marcas en el mercado para la identificación de ANAs es muy amplia y como no existe una estandarización adecuada (6) las diferencias observadas en cuanto a sensibilidad, especificidad y frecuencias de asociación con enfermedad son, en ocasiones, significativas. Incluso, en este sentido, algunos autores han sugerido que la asociación específica con enfermedad publicada en diferentes series de pacientes, es método-dependiente (7) (8). Así pues, es indispensable que cada laboratorio evalúe la *performance* del método seleccionado.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar cuál es la probabilidad de detectar reactividad fina por un inmunoensayo lineal (LIA) comercial sobre muestras de pacientes que resultaron ANA posi-

tivos durante el *screening* por IFI sobre Hep-2 y estudiar su correlación con los patrones y títulos observados.

Materiales y Métodos

Se seleccionaron retrospectivamente 161 muestras de suero que fueron remitidas al sector durante el período comprendido entre agosto de 1999 y febrero de 2002 y dieron ANA positivos por IFI. Se emplearon improntas de Hep-2 Kallestad (Sanofi Diagnostics Pasteur) con una dilución de *screening* de 1 : 40. Toda muestra positiva se tituló comenzando con una dilución de 1 : 100 y haciendo diluciones seriadas al medio. Se probaron al menos dos diluciones, una baja y una alta, para informar el título de anticuerpos. Se empleó un conjugado anti-inmunoglobulina humana total. Todas estas muestras, además, fueron procesadas por un inmunoensayo lineal comercial, Innolia-ANA de Innogenetics. Este es un ensayo multiparamétrico que permite la detección e identificación en suero humano de los siguientes autoanticuerpos: anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro (SSA), anti-La (SSB), anti-centrómero, anti-Scl70, anti-Jo1, anti-ribosomal P e histonas. Bajo la forma de péptidos recombinantes, péptidos sintéticos o proteínas naturales, son depositados como líneas discretas sobre una membrana de nylon con soporte plástico. El sistema de revelado para la reacción antígeno-anticuerpo está basado en el principio de un enzimoimmunoensayo. Se emplea un conjugado anti-IgG humana. El *test* es cualitativo y se interpreta según criterios de positividad establecidos por el fabricante a través de la inspección visual de la tira, la cual es comparada con una tira control de *cut-off* procesada en el mismo ensayo.

De las 161 muestras con ANA positivos por IFI sobre Hep-2 y procesadas por LIA, 111 tenían también efectuada la detección de anticuerpos anti-ácido deso-

xirribonucleico nativo (anti-dsADN). Se empleó IFI sobre improntas de *Crithidia lucilliae* (Kallestad); se comenzó con una dilución 1 : 10 y toda muestra positiva se tituló con diluciones seriadas al medio.

Resultados

En la Tabla I se observa el porcentaje de reactividad por LIA y/o anti-dsADN y su relación con cada uno de los patrones de fluorescencia. Bajo la designación de "otros patrones" se incluyen 2 muestras: una con imagen característica de anti-husos mitótico y la otra compatible con anti-laminina. Ambas fueron reactivas por LIA.

Los resultados obtenidos al asociar el patrón homogéneo con los perfiles de anticuerpos específicos obtenidos por LIA y/o anti-dsADN figuran en la Tabla II. De las 39 muestras que se informaron con patrón homogéneo sólo en 25 se efectuó el dosaje de anti-dsADN, resultando 20 positivas. En 26 (67%) de las muestras de ese grupo se detectó anti-histonas, en 15 (38%) anti-Ro(SSA) y/o anti-La(SSB), en 6 (15%) anti-Sm o anti-RNP y en 2 (5%) se detectó sólo anti-Scl70.

Respecto de las 46 muestras que presentaron patrón moteado, los resultados se exponen en la Tabla III. Sólo

lo fueron estudiadas para anti-dsDNA 24, de las cuales 5 fueron positivas. En 28 (61%) se observó reactividad por LIA anti-Ro(SSA) y/o anti-La(SSB), en 15 (33%) anti-Sm, en 18 (39%) anti-RNP; 4 muestras fueron reactivas frente a histonas y otras 4 a una de las siguientes especificidades: anti-Scl70, anti-proteína B centromérica (Cenp-B), anti-Jo1 y anti-ribosomal P.

Según la Tabla IV hubo una muestra con patrón nucleolar que fue reactiva sólo para anti-Ro(SSA); de las 10 muestras con patrón anti-centrómero, 9 fueron reactivas a Cenp-B y una frente a Scl70. En las muestras con patrones mixtos no se encontró prevalencia de ninguna reactividad en particular sino porcentajes comparables tanto del grupo ENA como de histonas y dsADN.

Para estudiar la distribución de reactividades finas por LIA en función de los títulos y patrones obtenidos por IFI, se consideraron tres intervalos: bajo (1/100-1/200), intermedio (1/400-1/1600) y alto ($\geq 1/3200$). Con fines prácticos sólo fueron tomados los patrones puros. Como observación general, se ve que la proporción de muestras reactivas por LIA se incrementa con los títulos dentro de los grupos con imagen homogénea (Tabla V) y moteada (Tabla VI). La totalidad de las muestras con patrón centromérico fueron reactivas por LIA y de éstas, 7 tuvieron título alto.

Tabla I. Incidencia de anticuerpos antinucleares LIA(+) y/o anti-dsADN respecto de los patrones IFI sobre Hep-2.

Patrón IFI/Hep-2	Homogéneo		Moteado		Nucleolar		Centromérico		Mixto		Otros	
LIA(+) y/o anti-dsADN	39	60%	46	73%	1	33%	10	100%	15	82%	2	100%
LIA(-)	26	40%	17	27%	2	67%			3	18%		
Total n	65		63		3		10		18		2	

Los resultados se expresan en forma absoluta y porcentual al total de muestras observadas con cada patrón. Se consideran todas las muestras positivas por IFI las cuales tenían o no efectuado dosaje de anti-dsADN.

Tabla II. Asociación entre patrón homogéneo de fluorescencia, reactividades finas por LIA y anti-dsADN.

IFI Hep-2	Reactividades finas por LIA										Total n
	aSm	aRNP	aRo y/o aLa	aScl70	aCent	aJo-1	aRib-P	aHist	a-dsADN		
Patrón Homogéneo	6 15%	6 15%	15 38%	2 5%				26 67%	20+/25	39	

a-Cent.=anti-centrómero, a-Rib-P=anti-ribosomal P, a-Hist.=anti-histonas. n=total de muestras obtenidas con patrón homogéneo. Los resultados se expresan en forma absoluta y porcentual al total de las muestras observadas. Se consideró la reactividad presentada como única o asociada a otras especificidades.

Tabla III. Asociación entre patrón moteado de fluorescencia, reactividades finas por LIA y anti-dsADN.

IFI Hep-2	Reactividades finas por LIA										Total n
	aSm	aRNP	aRo y/o aLa	aScl70	aCent	aJo-1	aRib-P	aHist	a-dsADN		
Patrón Moteado	15 33%	18 39%	28 61%	1 2%	1 2%	1 2%	1 2%	4 9%	5+/24	46	

a-Cent=anti-centrómero, a-Rib-P=anti-ribosomal P, a-Hist.=anti-histonas. n=total de muestras obtenidas con el patrón moteado. Los resultados se expresan en forma absoluta y porcentual al total de las muestras observadas. Se consideró la reactividad presentada como única o asociada a otras especificidades.

Tabla IV. Asociación entre los patrones nucleolar, a-centromérico y mixtos de fluorescencia, reactividades finas por LIA y anti-dsADN.

IFI Hep-2 Patrones	Reactividades finas por LIA								Total n	
	aSm	aRNP	aRo y/o aLa	aScl70	aCent	aJo-1	aRib-P	aHist		a-dsADN
nucleolar			1							1
a-centromérico				1	9					10
Mixto	6	7	8	2		1	2	5	7+/11	15

a-Cent=anti-centrómero, a-Rib-P=anti-ribosomal P, a-Hist.=anti-histonas. n=total de muestras obtenidas con cada patrón. Se consideró la reactividad presentada como única o asociada a otras especificidades.

Tabla V. Patrón homogéneo: Reactividades finas por LIA en función de los títulos por IFI sobre Hep-2.

Títulos	LIA(+) y/o anti-dsADN(+)	LIA(-)	Total n
1/100-1/200	7	8	15
1/400-1/1600	11	14	25
≥ 1/3200	21	4	25
Total	39	26	65

n=total de muestras con patrón homogéneo obtenidas con cada intervalo de títulos. Se consideran todas las muestras homogéneas LIA+ que tenían o no efectuado dosaje de anti-dsADN.

Tabla VI. Patrón moteado: Reactividades finas por LIA+ en función de los títulos por IFI sobre Hep-2.

Títulos	LIA(+) y/o anti-dsADN(+)	LIA(-)	Total n
1/100-1/200	6	10	16
1/400-1/1600	19	6	25
≥ 1/3200	21	1	22
Total	46	17	63

n=total de muestras con patrón moteado obtenidas con cada intervalo de títulos. Se consideran todas las muestras moteadas LIA(+) que tenían o no efectuado dosaje de anti-dsADN.

Discusión

La imagen homogénea y la moteada fueron las más frecuentemente observadas en pacientes con enfermedades autoinmunes (9) (Tabla I).

Dentro del grupo con patrón homogéneo, el 60% fue reactivo por LIA y/o anti-dsADN y según se observa en la Tabla II, los anticuerpos que prevalecen son anti-histonas y anti-dsADN. Estos hallazgos son esperables por cuanto estos anticuerpos son los que típicamente se asocian al patrón homogéneo. Además, existieron dos muestras que marcaron para anti-Scl70, lo cual es también un hallazgo común ya que éstos se pueden presentar con imagen homogénea y nucleolar. Es destacable la presencia, en el grupo homogéneo, de 15 muestras con anti-Ro(SSA) y/o anti-La(SSB), 6 muestras con anti-Sm y 6 muestras con anti-RNP, anticuerpos pertenecientes al grupo anti-ENA (ENA: antígenos nucleares extraíbles), los cuales se presentan con patrón moteado. Cabe pensar entonces en la existencia de un patrón moteado enmascarado por el homogéneo y no percibido por el observador. Este efecto puede producirse en distintas

circunstancias, por ejemplo, cuando hay significativa diferencia de títulos entre los anticuerpos que componen la imagen, o por ser imprecisa la definición de la imagen por parte del observador cuando los títulos son bajos. En particular, el antígeno Ro suele solubilizarse o difundir al citoplasma durante el proceso de fijación de las células Hep-2, por lo que la inmunofluorescencia se torna poco sensible para su detección.

En relación a los títulos, se observa en la Tabla V que la proporción de muestras reactivas se incrementa con el título informado. De este cuadro se desprende que, del total de muestras informadas como homogéneas con títulos ≥ 1/3200, 21 entre 25 fueron reactivas por este método, en tanto que de las informadas con títulos entre 1/100 y 1/200, sólo 7 de 15 fueron positivas. La presencia de reactividad a títulos bajos es mayor que la publicada en otras series (10), atribuible tal vez, a la mayor sensibilidad referida por algunos autores para el LIA. Queda aún por discutir dentro del grupo con patrón homogéneo, el 40% (Tabla I) que dio no reactivo por LIA. Se supone que estos resultados se deben a una diferente sensibilidad de las técnicas empleadas en la detección de anticuerpos

pos anti-histonas. Los anticuerpos anti-histonas se encuentran en varias enfermedades sistémicas como LES, lupus inducido por drogas (LID), artritis reumatoidea, esclerodermia localizada, esclerosis sistémica. También fueron descriptos en cirrosis biliar primaria y enfermedades neurológicas (11). Son un espectro de anticuerpos dirigidos principalmente hacia epitopes presentes en la superficie de complejos histonas-ADN (oligonucleosomas-*like*) e histona-histona, ambos considerados como los inmunógenos relevantes *in vivo*. Así pues, la naturaleza del antígeno empleado en los métodos basados en reacción Ag-Ac es un factor esencial para comprender o explicar los resultados. Este LIA comercial emplea como antígeno, histonas naturales extraídas y purificadas H1, H2, H3 y H4. Por lo tanto, los diferentes perfiles de anticuerpos anti-histonas presentes en diferentes pacientes serán detectados con diferente sensibilidad. Por ejemplo, está descrita tanto para LES como para LID, la presencia de anticuerpos dirigidos contra complejos [(H2A-H2B)-ADN] que no serán capaces de reconocer a las histonas individuales (12) (13). También es esperable que sean débilmente detectados algunos anticuerpos anti-histonas que reconocen epitopes conformacionales *in vivo* y que pueden padecer una total o parcial desnaturalización durante el proceso de extracción y purificación.

Hay que considerar también la posibilidad de que se generen anticuerpos por mecanismos, generalmente infecciosos, que por mimetismo molecular den reacción cruzada con antígenos propios. No obstante, en el caso de las histonas hay pocos ejemplos de este fenómeno (11) (13). Finalmente, están descriptos anticuerpos naturales de tipo IgM con especificidad anti-histonas que podrían ser detectados por IFI empleando un conjugado anti-inmunoglobulina humana total y no en aquellos inmunoensayos que emplean conjugados anti-IgG humana como en este caso.

Con respecto al patrón moteado, éste suele hallarse en distintas enfermedades sistémicas como también en síndromes de solapamiento. Se incluyen en este patrón los anticuerpos anti-ENA caracterizados por ser fácilmente extraíbles en solución salina isotónica y que reconocen a proteínas no histonas unidas a ARN de pequeño tamaño. Algunos ejemplos son: anti-U1nRNP, anti-Sm y los anti-Ro(SSA) y anti-La(SSB), estos últimos asociados también a moléculas de localización citoplasmática.

En la Tabla I se observa que el 73% de las muestras informadas con patrón moteado fueron reactivas por LIA, siendo éste considerado uno de los ensayos de detección más sensibles (14) (15). Al analizar las reactividades finas dentro de este grupo, según la Tabla III se puede observar fuerte asociación con la presencia de anti-Ro(SSA) y/o anti-La(SSB) (28/46), seguida por la reactividad al grupo antigénico Sm (15/46) y nRNP

(18/46), asociados entre ellos, o con otros anticuerpos. Al igual que en el grupo anterior se observa que la proporción de muestras reactivas aumenta con el ascenso del título informado (Tabla VI).

Se debe tener en cuenta que en la actualidad se han identificado más de 20 sistemas antigénicos extraíbles dentro del grupo ENA entre los que se encuentran el Ku, Sl, Ki y otros que reaccionan con proteínas solubles localizadas en el nucleoplasma y nucleolos y que no están incluidos dentro de este inmunoensayo (16). También el fenómeno de mimetismo molecular, la presencia de anticuerpos naturales de tipo IgM y la alteración de algunos epitopes conformacionales podrían explicar la existencia de un 27% de muestras dentro de este grupo que fueron no reactivas por LIA (Tabla I).

Es notoria la baja proporción de muestras con patrón nucleolar característico de la presencia de anticuerpos, tales como anti-U3-RNP (anti-fibrilarina), PM-Scl, RNA polimerasa I y otras proteínas nucleolares. Esto podría deberse a que las muestras seleccionadas, objeto de este estudio, estaban orientadas a la búsqueda de anti-ENA.

Se encontró buena correlación entre ambos métodos respecto a los anticuerpos anti-centrómero.

Dentro del patrón mixto, 15 de 18 muestras fueron positivas por LIA (Tabla I). Entre las imágenes observadas se destacó el patrón moteado y homogéneo, como era esperable. Según la Tabla IV, se ve que estuvieron presentes en proporciones comparables tanto los anticuerpos del grupo ENA como los anti-histonas o anti-dsADN.

Conclusiones

La imagen moteada fue la más contundente en revelar la presencia de anticuerpos anti-ENA, mientras que la imagen homogénea fue escasamente informativa respecto del perfil de anticuerpos específicos ya que hubo, en estas muestras, una elevada presencia de anti-ENA.

La imagen centromérica no necesita confirmación.

La probabilidad de encontrar reactividad fina por LIA se incrementa con el aumento de título informado. La hallada a títulos bajos fue elevada por lo que la búsqueda de anticuerpos específicos queda justificada aún en estos casos.

CORRESPONDENCIA

DRA. MARÍA CRISTINA FUENTE
Angela Dorrego N° 2236
1706 HAEDO - Prov. de Bs. As. - Argentina
Tel. particular: 4443-2157
E-mail: fuente@keko.com.ar

Referencias bibliográficas

1. Viñas Gomis O. Autoanticuerpos: importancia clínica y métodos de detección. En: Font Franco J, García Carrasco M, Ramos Casals M, Cervera Segura, Morín MI eds. Autoanticuerpos en la Práctica Clínica. Barcelona: Masson; 2001. p. 3-35.
2. Hollingstworth PN, Pummer SC, Dawkins RL. Antinuclear Antibodies. En: Peter JB, Schoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 84-8.
3. von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic disease. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24 (5): 323-58.
4. Pallares Ferreres L, Juliá Benique MR, Artigues Barceló. Abordaje del estudio por el laboratorio de la enfermedad autoinmune. En: Font Franco J, García Carrasco M, Ramos Casals M, Cervera Segura, Morín M, eds. Autoanticuerpos en la Práctica Clínica. Barcelona: Masson; 2001. p. 75-84.
5. Lopez-Longo EJ, Rodríguez Mathou M, Grau R, Carreño L. Anticuerpos en las enfermedades reumáticas. Clasificación y técnicas de detección. *Rev Esp Reumatol* 1996; 23 (5): 343-9.
6. Bizarro N, Tozzoli R, Tonutti E, Piazza A, Manoni F, Ghirardello A, *et al.* Variability between methods to determine ANA anti-dsDNA and anti-ENA autoantibodies: a collaborative study with the biomedical industry. *J Immunol Methods* 1998; 219 (1-2): 99-107.
7. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Salomon D, MPH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and test for specific autoantibodies to nuclear Ags. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
8. Lock RJ, Unsworth DJ. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift clinical interpretation?. *J Clin Pathol* 2001; 54 (3): 187-90.
9. Homburger HA. Cascada testing for autoantibodies in connective tissue disease. *Mayo Clinic Proc* 1995; 70 (2): 183-4.
10. Kern P, Kron M, Hiesche K. Measurement of antinuclear antibodies: assessment of different test systems. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 1: 72-8.
11. Stemmer Ch, Muller S, Histones autoantibodies other than (H2A-H2B)-DNA. Autoantibodies. En: Peter JB, Schoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 373-83.
12. Rubin RL, Histone (H2A-H2B)-DNA Autoantibodies. En: Peter JB, Schoenfeld Y, eds. Autoantibodies. Amsterdam: Elsevier; 1996. p. 364-70.
13. Bernstein R. Autoantibodies to histonas, Sm and ubiquitins. En: van Venrooij WJ, Maini RN, editors. *Manual of Biological Markers of Disease*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1996; C2.2: 1-7
14. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001; 60 (12): 1131-6.
15. Meheus L, van Venrooij WJ, Wik A, Charles PJ, Tzioufas AG, Meyer O, *et al.* Determination of fine specificity of antinuclear antibodies in connective tissue disease using a multiparameter line immunoassay (LIA) based on recombinant protein. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 205-14.
16. Espinoza Garriga G, Font Franco J, Cervera Segura R, Morín MI. Autoanticuerpos en el lupus eritematoso sistémico. En: Font Franco J, Carrasco MG, Ramos Casals M, Cervera Segura, Morín MI, eds. Autoanticuerpos en la Práctica Clínica. Barcelona: Masson; 2001. p. 87-98.

Acceptado para su publicación el 10 de noviembre de 2005