Accuratezza diagnostica dei metodi immunoenzimatici per il dosaggio degli anticorpi anti-cromatina (nucleosomi): l'importanza della sorgente antigenica e della definizione del valore soglia

D. Villalta[a], R. Tozzoli[b], N. Bizzaro[c], E. Tonutti[d], A. Ghirardello[e], A. Doria[e]

[a]*Immunologia Clinica e Virologia, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli," Pordenone*
[b]*Laboratorio di Chimica Clinica e Microbiologia, Ospedale di Latisana*
[c]*Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale di Tolmezzo*
[d]*Immunopatologia e Allergologia, Azienda Ospedaliera "S. Maria della Misericordia" Udine*
[e]*Istituto di Reumatologia, Università di Padova, Padova*

Riassunto

Premesse. **Negli ultimi anni molti studi hanno dimostrato che la cromatina rappresenta il pricipale autoantigene del lupus eritematoso sistemico (LES) e che gli anticorpi che interagiscono specificamente con essa sono importanti marcatori di malattia.**

Metodi. **Al fine di verificare l'accuratezza diagnostica degli anticorpi anti cromatina (nucleosomi) (ANuA) sono stati valutati tre diversi metodi ELISA, ognuno allestito con una diversa preparazione antigenica (1. Quanta-Lite Chromatin, Inova Diagnostics, San Diego, CA; 2. Medizym Anti-nucleo, Medipan Diagnostica, Selchow, Germania; 3. Nucleosome IgG Elisa, D-tek, Wavre, Belgio) e i risultati sono stati paragonati con quelli ottenuti con due differenti metodi ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-nDNA (Axis-Shield, Dundee, UK ed EliA dsDNA, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germania). Sono stati testati i sieri di 321 pazienti: 101 LES, 48 affetti da malattie infettive, 73 con altre malattie autoimmuni (20 artriti reumatoidi, 30 sclerodermie, 23 sindrome di Sjögren) e 99 soggetti sani.**

Risultati. **Utilizzando il cut off proposto dai produttori, la sensibilità dei tre diversi metodi è risultata rispettivamente 69%, 78% e 74% e la specificità 100%, 94.6% e 95.0%. Usando il cut off corrispondente al 95% di specificità, le sensibilità dei metodi per il dosaggio degli ANuA sono risultate 86%, 77% e 74% e pertanto più elevate rispetto a quelle ottenute con i due metodi ELISA per il dosaggio degli anti-nDNA (65% e 64%, rispettivamente).**

Conclusioni. **Questo studio dimostra che: 1) i metodi commerciali impiegati nei laboratori clinici per il dosaggio degli ANuA hanno una buona sensibilità e specificità; 2) gli ANuA sono più sensibili degli anticorpi anti-nDNA nella diagnosi del LES; 3) le differenti preparazioni antigeniche usate e le modalità di definizione del valore soglia influiscono nelle performance cliniche dei test per la determinazione degli ANuA.**

Summary

Diagnostic accuracy of immunoassays for anti-chromatin (nucleosome) detection: the relevance of autoantigen source and of the cut off definition.

Background. In the last few years, several reports have shown that chromatin (nucleosome) represents the main autoantigen-immunogen in systemic lupus erythematosus (SLE), and that specific antibodies are an important marker of the disease.

Methods. To verify the clinical sensitivity and specificity of anti-nucleosome autoantibodies (ANuA), three different ELISA immunoassay methods using different autoantigen preparations were evaluated (1. Quanta-Lite Chromatin, Inova Diagnostics, San Diego, CA; 2. Medizym Anti-nucleo, Medipan Diagnostica, Selchow, Germany; 3. Nucleosome IgG Elisa, D-tek, Wavre, Belgium), and the results were compared with those obtained with two ELISA assays for anti-nDNA antibody determination (Axis-Shield, Dundee, UK and EliA dsDNA, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germany). Sera from 321 patients were tested: 101 SLE, 48 infectious diseases, 73 autoimmune rheumatic diseases (20 rheumatoid arthritis, 30 systemic sclerosis and 23 Sjögren's syndrome) and 99 healthy subjects.

Results. Using the cut-off recommended by the manufacturers, the sensitivity for the three kits was 69%, 78% and 74%, and the specificity was 100%, 94.6% and 95.0%, respectively. Using the cut-off corresponding to 95% specificity, the sensitivity of the methods for the ANuA assay

Corrispondenza a: Dott. Danilo Villalta, Immunologia Clinica e Virologia, Azienda Ospedaliera "S. Maria degli Angeli"
Via Montereale 24, 33170 Pordenone, Italy
Phone: +39 0434 399281- Fax: +39 0434 399344 - Email: danilo.villalta@aopn.fvg.it

was 86%, 77% and 74%, i.e. higher values than those obtained with the two ELISA methods for anti-nDNA (65% and 64%).
Conclusions. This study demonstrates that: 1) the commercial reagents employed in clinical laboratories for ANuA detection show good sensitivity and high specificity; 2) ANuA are more sensitive than anti-nDNA antibodies in diagnosing SLE; 3) different antigen preparations on solid phase and different methods used to define the cut-off levels may affect the clinical performance of the test.
Keywords: anti-chromatin antibodies; anti-nucleosome antibodies; autoantigen source; cut-off; anti-nativeDNA antibodies; receiver operating characteristic curves; systemic lupus erythematosus.

Introduzione

I pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) presentano numerosi autoanticorpi sierici, alcuni dei quali, come gli anti-DNA nativo (nDNA), gli anti-Sm e gli anti-proteine P ribosomiali, sono altamente specifici [1-3]. Negli ultimi anni c'è stato un rinnovato interesse per gli anticorpi anti-cromatina/nucleosoma (ANuA), dovuto non solo alla messa a punto e alla commercializzazione di test immunoenzimatici (ELISA) per il loro dosaggio, ma anche alla dimostrazione del loro ruolo patogenetico nel LES [4,5,6]. In realtà tali autoanticorpi furono i primi autoanticorpi descritti nel LES con la dimostrazione nel 1948 delle cellule LE da parte di Hargraves [7], anche se allora non era conosciuta la specificità anticorpale responsabile del fenomeno. Studi successivi [8] e in particolare la dimostrazione che i nucleosomi, ma non il nDNA o gli istoni, erano in grado di inibire il fenomeno LE, evidenziarono come quest'ultimo fosse correlato alla presenza di ANuA [9].
I nucleosomi sono gli elementi base della cromatina e sono formati da circa 146 paia di basi di DNA che avvolgono un ottamero istonico $(H2A\text{-}H2B\text{-}H3\text{-}H4)_2$. Il nucleosoma contiene inoltre l'istone H1 localizzato esternamente al "core" istonico nel punto di entrata e uscita della catena di DNA dal nucleosoma. La sequenza nucleosomica, tenuta unita dal tratto del DNA riuniente e addensata dagli istoni H1, forma la cromatina, la quale però nella sua forma complessa oltre ad essere composta di nDNA (40%) e istoni (40%) contiene anche proteine non istoniche, RNA e altre macromolecole (20%) [10]. Eventuali autoanticorpi rivolti verso quest'ultime strutture molecolari non sono considerati anticorpi anti-cromatina, i quali per definizione comprendono anticorpi rivolti verso epitopi istonici esposti nella cromatina, verso il nDNA e verso epitopi conformazionali creati dalla interazione tra nDNA e le differenti molecole istoniche (anticorpi nucleosoma-specifici). Anticorpi anti-nucleosomi e anticorpi anti-cromatina, quindi, ai fini pratici possono essere ritenuti sinonimi [11].
Nell'ultima decade sono stati condotti numerosi studi atti a valutare l'accuratezza diagnostica degli ANuA nella diagnosi del LES, quasi sempre paragonata a quelle degli anti-nDNA che a tutt'oggi sono ritenuti il "golden marker" del LES. La sensibilità diagnostica varia ampiamente nei diversi studi (dal 31 al 100%), e in genere risulta superiore a quella degli anti-nDNA (dal 21 al 82%) [12-23]. La specificità per LES è elevata, ma alcuni studi riportano una alta percentuale di positività in pazienti con sclerodermia (SSc) e malattia mista del connettivo (MCTD) [13,15,24]. La diversa accuratezza diagnostica degli ANuA negli studi riportati può in parte essere spiegata dalle diverse caratteristiche delle popolazioni selezionate, ma anche da differenze nei sistemi diagnostici usati e dalle diverse modalità con cui sono stati ottenuti i valori di cut off.
Scopo del nostro studio è stato quello di valutare le performance di tre diversi metodi commerciali ELISA per la determinazione degli ANuA utilizzanti tre diverse preparazioni antigeniche, al fine di valutare se quest'ultime, associate alla modalità di definizione del cut-off, possano influenzare in maniera significativa l'accuratezza diagnostica del test.

Materiali e metodi

Pazienti

Abbiamo studiato 101 pazienti consecutivi affetti da LES, classificati in base ai criteri dell'American College of Rheumathology (ACR) [25,26]. Il rapporto M/F era di 1/9, l'età media di 29.8 ± 9.0 anni e la durata media della malattia di 80.2 ± 69.6 mesi. Come controlli sono stati selezionati 99 soggetti sani (HS), 73 pazienti con altre malattie reumatiche (30 SSc; 23 sindromi di Sjögren (pSS); 20 artriti reumatoidi (RA)), e 48 pazienti con malattie infettive (ID). Tutti i sieri sono stati conservati a –80 °C e i dosaggi degli ANuA e degli anticorpi anti-nDNA sono stati eseguiti in un unico laboratorio.

Metodi per il dosaggio degli ANuA

Per il dosaggio quantitativo degli ANuA sono stati utilizzati tre diversi metodi commerciali ELISA:

a. QUANTA Lite Chromatin ELISA, Inova Diagnostics Inc., San Diego, CA. Questo metodo usa come antigene una cromatina estratta da cellule timiche, altamente purificata: gli istoni H1 e le proteine non istoniche sono state rimosse dalla cromatina, come descritto da Burlingame e Rubin [27].
b. Medizym Anti-nucleo, Medipan Diagnostika, Selchow, Germania. In questo metodo la preparazione dei nucleosomi è stata eseguita a partire da eritrociti di pollo secondo il metodo di Bruns et al.[28]. L'assenza dell'istone H1 è stata verificata tramite controllo elettroforetico, mentre nessuna informazione è fornita dal produttore circa la presenza nel preparato di eventuali proteine non istoniche.
c. Nucleosome IgG Elisa kit, D-tek, Wavre, Belgio. L'autoantigene utilizzato è ottenuto a partire da cromatina di cellule timiche, previa rimozione delle proteine non istoniche. Durante il processo di estrazione non è stata utilizzata la nucleasi, così che l'istone H1 non è stato rimosso e lo scheletro polinucleosomico della cromatina non è stato frammentato a singoli mononucleosomi. L'elettroforesi in gel di agarosio rivela che l'antigene è composto di frammenti di DNA di grandezza variabile tra 1000 e 4180 paia di basi. L'analisi in SDS-PAGE ha evidenziato solo bande proteiche corrispondenti a

Tabella I. Sensibilità (SE) e specificità (SP) diagnostica dei metodi per la misurazione degli anticorpi anti-nucleosomi utilizzando il cut off proposto dal produttore, e sensibilità diagnostica dei tre metodi con livelli di cut off corrispondenti rispettivamente a specificità del 95%, 98% e 99%, ottenute con curve ROC.

Metodo	*Cut Off proposto dal produttore*	*SE%*	*SP%*	*Valore di Cut Off (SP=95%)*	*SE%*	*Valore di Cut Off (SP=98%)*	*SE%*	*Valore di Cut Off (SP=99%)*	*SE%*
Inova	20	69	100	9.5	86	12.0	81	13.5	77
Medipan	25	78	94.6	26.5	77	33.1	72	35.5	67
D-tek	25	74	95.0	24.1	74	29.5	67	32.5	64

subcomponenti del core istonico (H2A, H2B, H3, H4) e all'istone H1.

Tutti i dosaggi sono stati eseguiti secondo le istruzioni dei produttori.

Anticorpi anti-nDNA

Gli anticorpi anti-nDNA di classe IgG sono stati valutati con il metodo dell'immunofluorescenza indiretta (IFI) su Crithidia *luciliae* (cut off = 1:20) (Euroimmun, Lübeck, Germania) e con due metodi ELISA (Axis-Shield, Dundee, UK, ed EliA dsDNA, Pharmacia Diagnostics, Freiburg, Germania). Per entrambi i metodi ELISA il valore di cut off è stato determinato tramite le curve ROC, corrispondente ad una specificità del 95% ed è risultato essere rispettivamente di 30 IU/mL e di 15 IU/mL.

Analisi statistica

Per tutti e tre i metodi relativi al dosaggio degli ANuA i valori di sensibilità e specificità sono stati dapprima calcolati utilizzando il cut off proposto dal produttore. Successivamente sono state eseguite le curve ROC e, per ciascun metodo, i valori di sensibilità sono stati ricalcolati fissando arbitrariamente i livelli di specificità rispettivamente al 95%, 98% e 99%.

La comparazione tra dati non parametrici non appaiati è stata calcolata con il test U di Mann-Whitney. Valori di P inferiori a .05 sono stati considerati statisticamente significativi.

Risultati

Utilizzando il valore di cut off proposto da ciascun produttore, la sensibilità è risultata rispettivamente del 69%, 78%, 74% e la specificità del 100%, 94.6%, 95% per i metodi Inova, Medipan e D-tek (Tabella I). Nessun paziente della popolazione di controllo ha presentato un valore di ANuA superiore al valore di cut-off (20 U/mL) con il metodo Inova (Figura 1a), mentre l'8.6% dei pazienti con pSS, il 23.3% dei pazienti con SSc e il 6.2% dei pazienti con ID hanno presentato valori superiori al valore di cut off (25 U/mL) con il metodo Medipan (Figura 1b) e 8.6% dei pazienti con pSS, 20% dei pazienti con SSc e 4.1% dei pazienti con ID hanno presentato valori superiori al cut off (25 U/mL) con il metodo D-tek (Figura 1c). In ogni caso le positività nella popolazione di controllo sono sempre risultate di poco superiori al valore soglia. Come appare evidente dalle rappresentazioni grafiche, inoltre, fra la popolazione di controllo il gruppo che presenta il maggior numero di positività è quello dei pazienti con SSc. Anche se con il metodo Inova nessuno dei pazienti con SSc risulta positivo, il valore medio degli ANuA è comunque significativamente più elevato (8.1 ± 2.7; P <.001) rispetto a quello degli altri gruppi di controllo (RA, 4.1 ± 1.7; pSS, 4.4 ± 0.9; ID, 4.4 ± 2.2; HS, 5.1 ± 1.6).

Al fine di meglio paragonare l'accuratezza diagnostica, utilizzando i dati ottenuti dalle curve ROC, per ciascun metodo sono stati fissati livelli di cut off corrispondenti al 95%, 98% e 99% di specificità. I nuovi valori espressi in U/mL e le relative sensibilità diagnostiche sono riportate in Tabella I. Il metodo Inova, che utilizzando il valore soglia proposto dal produttore era risultato il meno sensibile, ad un cut off corrispondente alla specificità del 95% risulta più sensibile (86%) rispetto agli altri due metodi e mantiene la sensibilità più elevata anche per valori di specificità del 98% e 99%. In ogni caso, fissando la specificità al 95%, tutti e tre i metodi per il dosaggio degli ANuA hanno evidenziato sensibilità superiori a quelle ottenute con i due metodi ELISA per il dosaggio degli anti-nDNA (rispettivamente 65% e 64% per il metodo Axis-Shield ed EliA, a specificità del 95%) (Figura 2) e ancor maggiori se paragonati ai dati ottenuti con il metodo IFI su Crithidia *luciliae* (55%). Va notato infine che, relativamente ai metodi ELISA per il dosaggio degli anti-dsDNA, il cut off proposto da Axis Shield (30 IU/mL) è perfettamente sovrapponibile a quello da noi scelto al 95% di specificità, mentre quello proposto da Pharmacia Diagnostics per il metodo EliA è di 10 IU/mL (sensibilità 73% e specificità 91.7%).

Discussione

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi atti a valutare l'efficacia diagnostica degli ANuA nel LES, utilizzando tecniche ELISA fra loro diverse nella preparazione antigenica. Più comunemente, come sorgente antigenica, sono stati utilizzati nucleosomi ricostituiti, ottenuti dalla aggiunta di nDNA al core istonico o a dimeri istonici, oppure cromatina purificata, ottenuta in genere dalla digestione con nucleasi micrococcica e successiva rimozione dell'istone H1 e di altre proteine tramite estrazione con NaCl 0.5 M a pH neutro. L'analisi dei principali lavori apparsi recentemente in letteratura evidenzia sensibilità diagnostiche tra il 70% e il 100% [12,15-18,22,23], anche se alcuni autori riportano sensibilità inferiori al 50% [13,14]; la specificità nella maggior parte dei casi è risultata superiore al 90% [11,22,28,31], mentre Wallace et al.[13] riportano una specificità del 45%, Schlumberger et al. [24] del 71% e Amoura et al. [15] del 90%. Le diversità, in termini di accuratezza diagnostica, possono trovare spiegazione sia nei diversi substrati antigenici utilizzati, e in particolare nel loro grado di purificazione rispetto a proteine non istoniche, quali i fattori di trascrizione o altre proteine regolatorie legate al

DNA, sia nelle modalità con le quali sono stati selezionati i cut-off per distinguere i positivi dai negativi. In particolare nei tre studi sopra riportati in cui la specificità è risultata tra il 45% e il 90%, le positività per ANuA in pazienti non affetti da LES sono state riscontrate prevalentemente nel gruppo dei pazienti affetti da sclerodermia. Come già rilevato da altri autori [6,11], ciò potrebbe trovare diverse spiegazioni. Nello studio di Wallace et al.[13] come antigene è stato utilizzato DNA associato a istoni H2A and H2B denaturati e ciò potrebbe permettere il legame di autoanticorpi sierici presenti nella sclerodermia rivolti verso epitopi istonici in genere non esposti nella cromatina nativa. Nello studio di Schlumberger et al.[24] è stata usata una preparazione antigenica scarsamente purificata contenente residui di Scl70, come dimostrato successivamente dagli stessi autori [31]. Essi infatti, utilizzando una nuova preparazione antigenica trattata con una soluzione salina ad alta concentrazione e successiva centrifugazione in gradiente di densità al fine di eliminare proteine non istoniche capaci di legarsi fortemente alla cromatina, hanno dimostrato che nessuno dei pazienti con SSc risultò positivo. Infine nello studio di Amoura et al. [15], i quali usarono una preparazione antigenica non commerciale di mononucleosomi privi di istone H1, sembra che la definizione del cut off (+ 2 DS rispetto al valore medio ottenuto in 406 controlli sani) sia il principale fattore legato alle positività a basso titolo riscontrate nei pazienti con sclerodermia.

I risultati del nostro studio confermano l'importanza della definizione del valore di cut off nel determinare l'accuratezza diagnostica dei diversi metodi per il rilevamento degli ANuA. Infatti, usando il cut off proposto dal produttore, il metodo Inova, pur dimostrando una specificità assoluta, è risultato il meno sensibile, mentre gli altri due metodi, a fronte di una maggiore sensibilità, hanno evidenziato una minore specificità. Al fine di poter comparare in maniera più oggettiva l'accuratezza diagnostica dei tre metodi, sono state eseguite le curve ROC e, fissando i livelli di specificità per ciascun metodo al 95%, 98% e 99%, sono stati valutati i relativi valori di sensibilità. Come è emerso chiaramente dall'analisi dei risultati ottenuti, il metodo che globalmente ha presentato la migliore efficienza diagnostica è risultato il metodo Inova, che presenta anche la maggiore purezza antigenica (rimozione dell'istone H1 e delle proteine non-istoniche).

Gli altri 2 metodi, infatti, usano substrati antigenici diversi a più basso livello di purificazione: il substrato Medipan è privo di istoni H1, ma nessuna verifica è stata condotta circa la eventuale presenza di proteine non-istoniche; il substrato D-tek è privo di proteine non-istoniche, ma possiede l'istone H1. Va rimarcato, comunque, che le positività ANuA in pazienti non affetti da LES sono sempre risultate a basso titolo e che quindi con tutti e tre i metodi valori medi o elevati di ANuA sono risultati altamente spe-

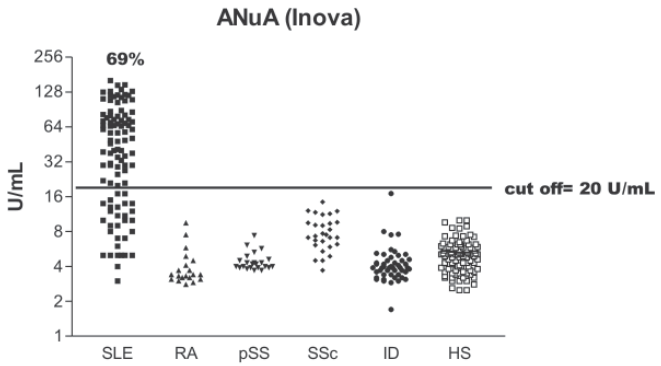

Figura 1a

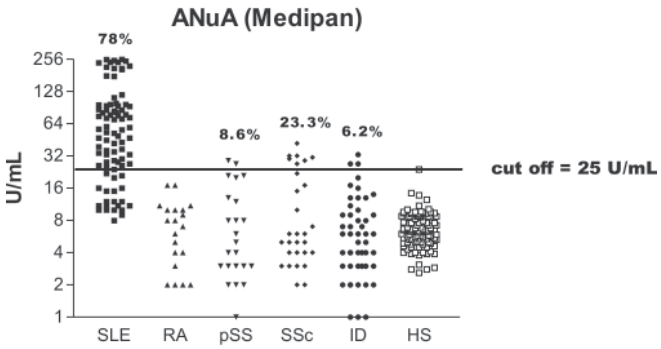

Figura 1b

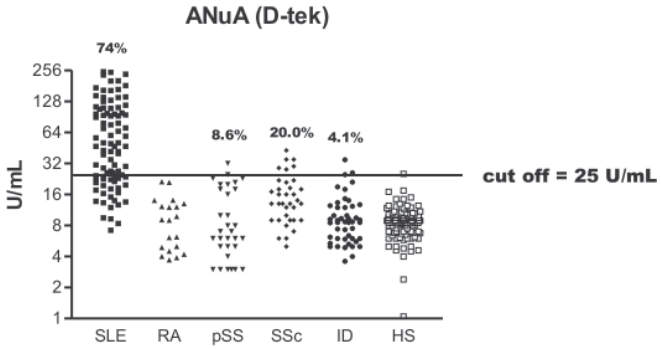

Figura 1c

Figura 1. Distribuzione dei livelli anticorpali degli anticorpi antinucleosomi (ANuA) espressi in U/mL, ottenti con i metodi Inova (a), Medipan (b) and D-tek (c), in 101 pazienti con LES e 220 controlli (RA: artrite reumatoide; SS: sindrone di Sjögren; SSc: sclerosi sistemica; HS: soggetti sani; ID: malattie infettive), usando i livelli di cut off proposti dai produttori.
I valori mostrati indicano la percentuale di campioni positivi di ciascun gruppo.

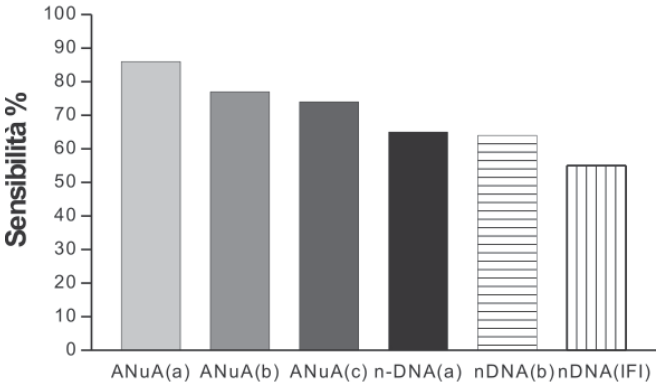

Figura 2. Sensibilità diagnostica dei tre metodi utilizzati per la determinazione degli ANuA (Inova (a); Medipan (b); D-tek (c)), comparati ai due metodi ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-nDNA (Axis-Shield (a); EliA (b)) e alla immunofluorescenza indiretta (IFI) su Chritidia *luciliae*. Per tutti i metodi ELISA il cut off è stato fissato al 95% di specificità.

cifici per LES, come già precedentemente descritto [22]. Inoltre, merita di essere segnalato il fatto che anche con il metodo Inova, che usa una preparazione cromatinica altamente purificata, il valore medio degli ANuA nei pazienti affetti da SSc è risultato significativamente più elevato rispetto agli altri gruppi di controllo, seppur al di sotto del valore soglia. Se in questo caso, quindi, possono essere escluse con alta probabilità reattività autoanticorpali verso proteine non istoniche quali Scl70 e proteine centromeriche, questa evidenza può deporre per la possibile presenza di ANuA a basso titolo nei pazienti con SSc, come già descritto in precedenza da alcuni autori [32]. Va ricordato comunque che la proteina CENP-A, una delle tre forme immunologicamente correlate agli antigeni centromerici, è stata di recente definita essere una variante dell'istone H3 [33]. E' possibile quindi che sieri di pazienti con SSc possano presentare cross-reattività con i nucleosomi mediate da omologie tra alcune regioni dell' istone H3 e del CENP-A.

Infine dal nostro studio emerge chiaramente che, fissando per tutti i metodi ELISA il livello di specificità al 95%, la sensibilità diagnostica di tutti i metodi per la determinazione degli ANuA è superiore a quella dei metodi per la determinazione degli anti-nDNA, dimostrando l'esistenza di un gruppo di pazienti con LES (10-15%), che presentano alla diagnosi ANuA, ma non anti-nDNA.

In conclusione quindi gli ANuA sembrano dotati di una maggiore efficienza diagnostica rispetto agli anti-nDNA. Fra i metodi per il dosaggio degli ANuA le differenze in termini di accuratezza diagnostica sembrano essere dovute sia alle modalità di definizione del valore di cut off da parte del produttore, sia al grado di purezza della preparazione antigenica utilizzata. Rimangono al momento ancora da definire con certezza le ragioni della presenza di bassi valori di ANuA nei pazienti con SSc.

Bibliografia

1. Stollar BD. The specificity and applications of antibodies to helical nucleic acid. CRC Crit Rev Biochem 1975; 3: 45-69.
2. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol 1989; 44: 93-151.
3. Elkon KB, Bonfa E, Brot E. Antiribosomal antibodies in systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 1992; 18: 377-90.
4. Tax WJM, Kramers C, van Bruggen MC, Berden JH. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. Kidney Int 1995; 48: 666-73.
5. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. Arthritis Rheum. 1999; 42: 833-43.
6. Koutouzov S, Jeronimo AL, Campos H, Amoura Z. Nucleosomes in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. Rheum Dis Clin North Am 2004; 30: 529-58.
7. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements: the "tart" cell and the "LE" cell. Mayo Clin Proc 1948; 23: 25-8.
8. Holman HR, Kunkel HG. Affinity between serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. Science 1957; 126: 162-3.
9. Rekvig OP, Hannestad K. Lupus erythematosus (LE) factors recognize both nucleosomes and viable human leukocytes. Scand J Immunol 1981; 13: 597-604.
10. Weintraub H, van Lente F. Dissection of chromosome structure with trypsin and nuclease. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71: 4249-53.
11. Burlingame RW, Cervera R. Anti-chromatin (anti-nucleosome) antibodies. Autoimmun Rev 2002; 1: 321-8.
12. Burlingame RW, Boey ML, Starkebaum G, Rubin L. The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus. J Clin Invest 1994; 94: 184-92.
13. Wallace DJ, Lin HC, Shen GQ, Peter JB. Antibodies to histone (H2A-H2B)-DNA complexes in the absence of antibodies to double-stranded DNA or to (H2A-H2B) complexes are more sensitive and specific for scleroderma-related disorders than for lupus. Arthritis Rheum 1994; 37: 1795-7.
14. Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1995; 38: 1485-91.
15. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, et al. Presence of anti-nucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases: antinucleosome antibodies of the IgG subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2000; 43: 76-84.
16. Mohan C, Liu F, Xie C, Williams RC Jr. Anti-subnucleosome reactivities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients and their first-degree relatives. Clin Exp Immunol 2001; 123: 119-26.
17. Min DJ, Kim SJ, Park SH, Seoy I, Kang HJ, Kim WU, et al. Anti-nucleosome antibody: significance in lupus patients lacking anti-double stranded DNA antibody. Clin Exp Rheumatol 2002 20: 13-8.
18. Ghillani-Dalbin P, Amoura Z, Cacoub P Charvel JL, Diemert MC, Piette JC, et al. Testing for anti-nucleosome antibodies in daily practice; a monocentric evaluation in 1696 patients. Lupus 2003; 12: 833-7.
19. Cairns AP, McMillan SA, Crockard AD, Meenagh GK, Duffy EM, Armstrong DJ, et al. Antinucleosome antibodies in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 2003; 62: 272-3.
20. Cervera R, Vinas O, Ramos-Casals M, Font J, Garcia-Carrasco M, Siso A, et al. Anti-chromatin antibodies in systemic lupus erythematosus a useful marker for lupus nephropathy. Ann Rheum Dis 2003; 62: 431-4.
21. Gonzalez C, Garcia-Berrocal B, Herraez O, Navajo JA, Gonzalez-Buitrago M. Anti-nucleosome, anti-chromatin, anti-dsDNA and anti-histone antibody reactivity in systemic lupus erythematosus. Clin Chem Lab Med 2004; 42: 266-72.
22. Ghirardello A, Doria A, Zampieri S, Tarricone E, Tozzoli R, Villalta D, et al. Antinucleosome antibodies in SLE: a two year follow-up study of 101 patients. J Autoimmun 2004; 22: 235-40.
23. Simon JA, Cabiedes J, Ortiz F, Alcocer-Varela J, Sanchez-Guerrero J. Anti-nucleosome antibodies in pa-

tients with systemic lupus erythematosus of recent onset. Potential utility as a diagnostic tool and disease activity marker. Rheumatology 2004; 43: 220-4.
24. Schlumberger W, Daehnrich C, Frahm S, Siegemund M, Meyer W, Suer W, et al. Diagnostic relevance of autoantibodies against nucleosomes. Autoimmun Rev 2002; 1:32.
25. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF. The revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1982; 25: 1271-7.
26. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 1997; 40: 1725.
27. Burlingame RW, Rubin RL. Subnucleosome structures as substrates in enzyme-linked immunosorbent assays. J Immunol Methods 1990; 134: 187-99.
28. Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2000; 43: 2307-15.
29. Amoura Z, Chabre H, Koutouzov S, Lotton C, Cabrespines A, Bach JF, et al. Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria. Arthritis Rheum 1994; 37: 1684-8.
30. Laderach D, Koutouzov S, Bach JF, Yamamoto AM. Concomitant early appearance of anti-ribonucleoprotein and anti-nucleosome antibodies in lupus prone mice. J Autoimmun 2003; 20: 161-70.
31. Suer W, Dahnrich C, Schlumberger W, Stocker W. Autoantibodies in SLE but not in scleroderma react with protein-stripped nucleosomes. J Autoimmun 2004; 22: 325-34.
32. Hmida Y, Schmit P, Gilson G, Humbel RL. Failure to detect antinucleosome antibodies in scleroderma: comment on the article by Amoura et al. Arthritis Rheum 2002; 46: 281-2.
33. Palmer DK, O'Day K, Trong HL, Charbonneau H, Margolis RL. Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demonstration that it is a distinctive histone. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 3734-8.