

Valoración de técnicas de inmunofluorescencia indirecta e inmunodifusión para la determinación de anticuerpos antinucleares en perros con leishmaniosis (Valuation techniques and indirect immunofluorescence immune to the determination of antinuclear antibodies in dogs with leishmaniasis)

Ginel-Pérez, Pedro J.*; Camacho-Quesada, Soledad; Blanco-Navas, Beatriz; Lucena-Solís, Rosario.

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales, 14014 Córdoba, España.

***Correspondencia:** Dr. Pedro J. Ginel. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria de Córdoba. Campus de Rabanales 14014 Córdoba. Teléfono 34957218713; Fax 34957211093; e-mail pginel@uco.es

RECVET: 2008, Vol. III, Nº 5

Recibido 04.02.08 / Referencia 050801_RECvet / Aceptado: 24.03.08 / Publicado: 01.05.08

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050508.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050508/050801.pdf>

Revista Electrónica de Clínica Veterinaria RECvet® está editada por Veterinaria Organización®
Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org>
y con RECvet®-<http://www.veterinaria.org/revistas/recvet>

Resumen

En perros con leishmaniosis los anticuerpos antinucleares contribuyen al desarrollo de lesiones por depósito de complejos inmunes circulantes como la glomerulonefritis. Existen diversas técnicas para determinar sus niveles séricos y su especificidad antigénica. En este trabajo se comparan los resultados de las técnicas de inmunofluorescencia indirecta sobre hígado de rata, células HEP-2 y *Crithidia luciliae* y de la técnica de doble inmunodifusión para los antígenos nucleares extraíbles de los tipos Sm y RNP. Se emplearon 60 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural. El porcentaje de títulos positivos para la IFI sobre hígado de rata y células HEP-2 fue del 23,4% y del 55,2% respectivamente, con una

correlación positiva de solo el 29%. Sobre *Crithidia luciliae*, solo un perro presentó títulos positivos para anticuerpos anti ADN de doble cadena mientras que todas las muestras fueron negativas para anticuerpos específicos de antígenos nucleares extraíbles Sm y RNP. Según estos resultados, la técnica de inmunofluorescencia sobre células HEP-2 presenta una sensibilidad elevada, a la vez que permite apreciar diversos patrones de fluorescencia. Por otro lado, los anticuerpos antinucleares específicos de ADN de doble cadena y de antígenos nucleares extraíbles Sm y RNP están ausentes en perros con leishmaniosis o las pruebas empleadas carecen de sensibilidad suficiente para su detección.

Palabras clave: Leishmaniosis | ANA | ENA | HEP-2 | Inmunofluorescencia

Abstract

In canine leishmaniasis, antinuclear antibodies are involved in the pathogeny of lesions associated with circulating immunocomplex deposition such as glomerulonephritis. There are different techniques available to determine their serum concentration and their antigenic specificity. In this article, we compare the results of immunofluorescence on rat liver cryocuts, HEP-2 cells, and *Crithidia luciliae* and double immunodiffusion for extractable nuclear antigens Sm and RNP. Sera from 60 dogs with naturally acquired canine leishmaniasis were used. The prevalence of positive indirect immunofluorescence titers on rat liver cryocuts and HEP-2 cells was 23.4% and 55.2% respectively, and positive correlation between both techniques was only 29%. On *Crithidia luciliae* slides, just one dog had a positive titer for anti double-stranded DNA antibodies, whereas all the samples assayed by double immunodiffusion were negative for antibodies against extractable nuclear antigens Sm and RNP.

According to our results, the indirect immunofluorescence assay on HEP-2 cells achieves a higher sensitivity and allows recognition of several immunofluorescence patterns. On the other hand, antinuclear antibodies specific to double-stranded DNA and ENA are either absent in canine leishmaniasis or their serum concentrations are beyond the detection limits of the techniques used.

Key words: Leishmaniosis | ANA | ENA HEP-2 | Immunofluorescence assays

1. Introducción

El término anticuerpos antinucleares (ANA) se usa de forma genérica para describir los autoanticuerpos contra diferentes componentes nucleares como ADN, ARN, histonas y sus complejos moleculares (Tan, 1982). Los ANA contribuyen al depósito de inmunocomplejos circulantes sobre el endotelio vascular y por tanto al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad de tipo III, importantes en la patogenia de glomerulonefritis, dermatitis, uveitis y artritis (Monestier y col., 1995; Hahn, 1998). En perros, los ANA se asocian fundamentalmente con el LES, aunque pueden encontrarse en otras enfermedades inflamatorias e infecciosas como la leishmaniosis canina (Kelly y col., 1994; Lucena y col., 1996; Paul y col., 2005).

La identificación de los ANA es una parte importante de la medicina e inmunología clínicas. De hecho, los tests de determinación de ANA están entre los tests serológicos más realizados a nivel mundial en todos los laboratorios de inmunología clínica (Bradwell y col., 1995). En el caso concreto del perro, la determinación precisa de los ANA caninos se ve dificultada por la capacidad del suero canino para unirse al ADN de forma inespecífica bajo ciertas condiciones. Esto se debe a una beta-globulina ácida que se une al ADN heterólogo y al dAdT (polydeoxyadenylate-deoxythymidylate) un análogo sintético del dsDNA, en el rango fisiológico del pH (Shull y col., 1983).

Los ANA constituyen una población muy heterogénea de anticuerpos dirigidos contra varios antígenos nucleares y por este motivo normalmente para su detección inicial se emplea todo el núcleo de la célula como sustrato. Posteriormente se emplean técnicas que permitan establecer la especificidad de los ANA, es decir, contra qué antígenos nucleares concretos están dirigidos. Conocer la especificidad antigénica de los ANA es fundamental para establecer su asociación con enfermedades concretas e investigar su actividad patogénica (White y col., 1992).

En el pasado, se ha sugerido que el estudio de la especificidad de los ANA estaba clínicamente indicado cuando las pruebas de IFI eran positivas. Sin embargo, cuando los así llamados pacientes ANA-negativos se incluían en los análisis de inmunodifusión, los sueros IFI negativos de varios de ellos eran positivos para los llamados Ag nucleares extraíbles (ENA) como el SS-A/Ro (Wilson y Sanders, 1992).

Teniendo en cuenta las dificultades de la determinación de ANA en el perro, la importancia de su especificidad antigénica y su contribución al desarrollo de algunas lesiones clásicas de la leishmaniosis canina (Ginel y col., 2008), nuestro objetivo es valorar y correlacionar los resultados de las técnicas de IFI sobre hígado de rata, células HEP-2 y *Crithidia lucilliae*, y de la técnica de doble inmunodifusión para ENA en perros con leishmaniosis.

2. Material y métodos

Se emplearon 60 perros con leishmaniosis adquirida de forma natural. La edad de los animales osciló entre 9 meses y 8 años, 42 machos y 18 hembras. Todos los perros eran sintomáticos y el diagnóstico se confirmó mediante observación directa del parásito en aspirados de ganglio linfático o médula ósea.

2.1. Inmunofluorescencia sobre hígado de rata

La técnica se ha descrito previamente (Lucena y col., 1996). Las muestras se prepararon 1:5 en PBS para evitar la inmunofluorescencia inespecífica. Como control positivo se empleó un suero de perro ANA positivo y como control negativo la solución tamponada de PBS. Para la detección de los ANA se empleó un antisuero anti IgG canina (H+L) marcado con isotiocianato de fluoresceína a una dilución de 1:50 en PBS. La presencia de fluorescencia se establece observando las muestras en un microscopio de fluorescencia con una lámpara de 495 nm y empleando un filtro de 515 nm.

2.2. Inmunofluorescencia sobre células HEP-2.

Se determinaron empleando el ANA HEP-2 screening kit (INOVA diagnostics Inc. San Diego, CA). Brevemente, se diluyen las muestras problema con una dilución inicial de 1:40 en PBS a partir de la cual se considera la positividad. Los portaobjetos con el sustrato de células epiteliales se dejan secar a temperatura ambiente durante unos minutos. Se añade una gota en cada pocillo de los controles positivo y negativo en cada uno de los portas. A continuación se colocan 50 µl de cada muestra problema. Los portaobjetos se incuban en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 20 minutos. Después de la incubación se lavan los pocillos con buffer PBS mediante inmersión durante 5 minutos y se sacuden enérgicamente para eliminar el exceso de PBS. En el siguiente paso se añade el conjugado, un suero anti IgG canina (H+L) marcado con un fluorocromo. El conjugado se incuba en cámara húmeda y oscura durante otros 20 minutos, tras los cuales se repite el proceso de lavado. Finalmente se coloca un cubreobjetos sobre el que se han aplicado unas gotas de medio de montaje. La presencia de fluorescencia se establece observando las muestras en un microscopio de fluorescencia con una lámpara de 495 nm y empleando un filtro de 515 nm.

2.3. Determinación de ANA anti ADN de doble cadena: Inmunofluorescencia sobre Crithidia

Se emplearon 34 perros con leishmaniosis del total de 60 perros incluidos en el estudio. Todos los reactivos empleados, salvo el antisuero anti IgG canina corresponden a los suministrados en el kit "*Crithidia lucilliae* double-stranded DNA (The Binding Site, Birmingham, England).

Se diluyen las muestras problema con PBS a una dilución inicial de 1:10 a partir de la cual se considera la positividad. Los portaobjetos con el sustrato se dejan secar a temperatura ambiente durante unos 30 minutos antes de sacarlos de su embalaje. Se colocan en cámara húmeda y se añade una gota en cada pocillo de los controles positivo y negativo en cada uno de los portas. A continuación se colocan 25 µl de cada muestra problema diluida 1:10 en PBS. Los portaobjetos se incuban en cámara húmeda y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Después de la incubación se lavan los pocillos con buffer PBS mediante inmersión durante 10 minutos sin agitación. Después se sacuden los portaobjetos enérgicamente para eliminar el exceso de PBS. En el siguiente paso se añade el conjugado, un suero anti IgG canina (H+L) marcado con un fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína) diluido 1:32 en PBS. Los portaobjetos no deben permanecer al aire durante más de 15 segundos. El conjugado se incuba en cámara húmeda y oscura durante otros 30 minutos, tras los cuales se repite el proceso de lavado. En este paso de lavado, se pueden añadir 2-3 gotas de azul de Evans 1% a cada 100 ml para obtener una contra tinción. La presencia de fluorescencia en el quinetoplasto se establece observando las muestras en un microscopio de fluorescencia con una lámpara de 495 nm y con un filtro de 515 nm.

2.4. ANA frente a ENA: técnica de doble inmunodifusión o de Ouchterlony

Se emplearon las muestras de los animales donde se había investigado la presencia de ANA frente a ADN de doble cadena. Todos los reactivos empleados fueron suministrados por Biognost (Gräfelfing, Germany). Los extractos ENA purificados correspondieron a los autoantígenos: Sm y RNP.

Brevemente, una vez que todos los reactivos se encuentran a temperatura ambiente, los sueros se emplean sin diluir. En los casos donde se observan líneas de precipitación marcadas se vuelven a ensayar diluidos 1:4 en PBS para evitar el efecto de prozona (ausencia de reacción inmune a altas concentraciones de anticuerpos).

Para aplicar las muestras se pipetea 15 µl de suero y de los controles en los pocillos periféricos y 25 µl del extracto ENA en el pocillo central. Las placas se cierran y se incuban a temperatura ambiente (< 25°C) y en cámara húmeda durante 24 horas. Hay que evitar la iluminación directa o la proximidad con radiadores o cualquier fuente de calor. La lectura de las placas se realiza a las 24 horas anotando todas las líneas de precipitación visibles.

3. Resultados

3.1. Determinación de ANA en criocortes de hígado de rata

En total, la determinación se realizó en 60 muestras de perros con leishmaniosis. Las muestras que presentaron fluorescencia a una dilución de 1:20 se consideraron positivas. No se realizaron diluciones posteriores para la titulación definitiva de las muestras positivas.

La prevalencia de ANA fue del 23,3% (14 muestras positivas de 60 analizadas). Los patrones de inmunofluorescencia sobre criocortes de hígado de rata son poco específicos por lo que no se han incluido como resultado. No obstante, el patrón de inmunofluorescencia predominante fue el nuclear (Fig.1).

3.2. Determinación de ANA en células HEP-2

En total, se realizó IFA sobre células HEP-2 en un total de 67 perros con leishmaniosis. En 37 animales (55,2%) se obtuvo un título ≥ 40 y por tanto se consideraron positivos. Los títulos oscilaron entre 40 (19 perros) y 640 (1 perro). En 10 perros se obtuvo un título final de 320.

Sólo tres tipos de patrones de inmunofluorescencia pudieron ser claramente definidos; nuclear, nucleolar y citoplásmico. La mayoría de los perros presentaron sólo un tipo de patrón. El patrón nuclear fue el patrón predominante al estar presente en 15 animales, otros 12 presentaron un patrón citoplasmático y finalmente en 7 animales el patrón fue nucleolar. En 3 ocasiones, las muestras presentaron un patrón mixto que siempre fue una combinación de patrón nuclear y citoplasmático.

El patrón nuclear se caracterizó por ser del tipo homogéneo (Fig. 2). La fluorescencia era de carácter difuso y uniforme sin apreciarse mayor intensidad en la región externa del núcleo. El patrón nucleolar fue también del tipo homogéneo (Fig. 3). La fluorescencia se presentó sobre todo el nucleolo y no se presentó fluorescencia en la región de cromatina condensada del núcleo. El patrón citoplasmático fue de tipo granular. Este patrón no se correspondía con otros tipos de patrones como los patrones mitocondrial, lisosomial o endoplásmico. Siguiendo la clasificación de Bradwell y col (1995), el patrón citoplasmático se correspondía con ribosómico o con el patrón específico de la proteína de reconocimiento de señal común a múltiples receptores citoplasmáticos.

3.3. Correlación entre las técnicas de Inmunofluorescencia

La correlación entre ambas técnicas se estableció a partir de 24 muestras que habían obtenido un título positivo en al menos una de las dos técnicas empleadas. No se incluyeron las muestras negativas en ambas técnicas (correlación negativa) pues su interés clínico es menor y aumenta notablemente el grado de correlación.

Las dos técnicas de IFI mostraron una correlación positiva, definida como muestras positivas concordantes, en 7 de las 24 (29%) muestras analizadas por ambos métodos. En 11 perros (45,8%), las muestras alcanzaron títulos positivos sólo sobre células HEP-2, mientras que 6 muestras (25%) fueron positivas sólo sobre las células de hígado de rata.

3.4. Determinación de ANA anti ADN de doble cadena: Inmunofluorescencia sobre *Crithidia luciliae*

En 34 perros con leishmaniosis se estudió la presencia de ANA específicos para ADN de doble cadena mediante IFI sobre protozoos del género *Crithidia*. Los títulos fueron negativos en todos los animales salvo en el plasma del perro número 23 que presentó fluorescencia con un título de 80.

En el animal positivo la fluorescencia se detectó específicamente a nivel del quinetoplasto y más débilmente sobre el núcleo. En las muestras negativas, la gran mayoría de ellas presentaba fluorescencia sobre el núcleo del protozoo pero no sobre el quinetoplasto, que es la estructura situada más cerca del núcleo.

3.5. Determinación de ANA frente a antígenos nucleares extractables (ENA)

Ninguna de las 34 muestras analizadas fue positiva. No se detectaron por tanto ANA específicos para los autoantígenos Sm y RNP.

4. Discusión

Diversos trabajos han evaluado la prevalencia y la importancia patogénica de los complejos inmunes circulantes (CIC) en la leishmaniosis canina. Los hallazgos clínico-patológicos en perros con leishmaniosis demuestran que los CIC juegan un papel fundamental en la patogenia de la enfermedad y que la insuficiencia renal por depósito de CIC es la principal causa de muerte. Los CIC serían también los responsables de las poliartritis, uveitis y vasculitis cutánea (Slappendel 1988; Lucena y col., Palacio y col., 1997). Los inmunocomplejos estarían compuestos por antígenos parasitarios y anticuerpos del hospedador, pero también por antígenos endógenos como las nucleoproteínas y ANA.

En el LES se ha demostrado que los ANA tienen un papel preponderante en el desarrollo de glomerulonefritis, poliartritis, etc. Una situación similar puede existir en la leishmaniosis canina, donde se ha demostrado una correlación positiva entre los niveles de ANA anti-histonas y el desarrollo de glomerulonefritis (Ginel y col., 2008). Teniendo en cuenta que las técnicas de inmunofluorescencia son las más empleadas para la determinación de ANA, nos propusimos comparar la eficacia de varias técnicas para la detección de ANA en la leishmaniosis canina. Lo más

destacable de nuestros resultados es sin duda la gran diferencia de sensibilidad entre unas técnicas y otras (Gráfica 1).

Empleando la técnica de IFI sobre hígado de rata, 14 de los 60 perros estudiados (23,4%) presentaron un título de ANA positivo. Esta prevalencia es similar a la obtenida en trabajos previos sobre el mismo tipo de sustrato (Slappendel 1988; Lucena y col., 1996). En otro trabajo posterior, 28 de 53 perros (52%) mostraron títulos positivos de ANA (Ciaramella y col., 1997).

Cuando sobre esta misma población se emplearon como sustrato las células HEP-2, el porcentaje de positividad se incrementó hasta el 55,2% y se obtuvieron títulos más elevados que con la técnica de IFI sobre criocortes de hígado de rata, alcanzando en 11 perros títulos igual o superiores a 320 que podemos considerar como clínicamente muy significativos.

La correlación positiva, es decir aquellas muestras positivas en ambos sustratos, se puede considerar reducida (29% de las muestras). Esta baja correlación se debe principalmente a la menor sensibilidad de los cortes de hígado de rata, ya que un 45,8% de muestras alcanzaron un título positivo cuando se ensayaron sobre las células HEP-2 pero fueron negativas sobre los cortes de hígado de rata. La mayor sensibilidad de las células HEP-2 se debe al gran tamaño de sus núcleos, a su disposición monocelular que asegura que todos los núcleos sean visibles y a que algunos antígenos están presentes en mayor concentración en estas células tumorales poco diferenciadas que en tejidos muy diferenciados como el hígado o el riñón (Tan 1982; Fritzier 1992; Bradwell y col., 1995). A pesar de la mayor sensibilidad de las células HEP-2 como sustrato, 6 de las muestras analizadas fueron positivas sólo sobre criocortes de hígado de rata. Una primera hipótesis es que se tratara de falsos positivos. El título de 1:20 como valor de corte para los sueros positivos se estableció a partir de una población amplia de perros sanos (Lucena y col., 1996), sin embargo otros autores han demostrado que las reacciones positivas con diluciones bajas son relativamente frecuentes en perros sanos utilizando como sustrato cortes de hígado de rata. Algunos han sugerido que, con este tejido, el título mínimo para obtener una especificidad del 95% sería de 1:100. Por el contrario, los perros sanos no mostraron reactividad alguna cuando se usaron células HEP-2 como sustrato, incluso analizando las muestras a diluciones tan bajas como 1:15 (Hansson y col., 1996). Estos autores concluyeron que las células HEP-2 eran un sustrato mucho más apropiado para el perro debido a su baja reactividad con los sueros de perros normales.

La falta de correlación entre sustratos también ha sido descrita previamente. Según Fritzier (1992), la expresión de ciertos antígenos nucleares presenta diferencias cualitativas y cuantitativas entre sustratos. Las pruebas de IFI para ANA pueden ser negativas en cortes de órganos y positivas en cultivos celulares o al contrario. Esto ha dado lugar a la

opinión generalizada de que al menos deben emplearse dos sustratos diferentes antes de considerar una muestra como negativa (Fritzler, 1992). En cualquier caso, nuestros resultados indican que la elección más práctica son los cultivos celulares, más sensibles y por tanto con una proporción menor de resultados falsos negativos. Además, las células HEP-2 han demostrado ser un sustrato mucho más fiable que los criocortes de hígado de rata para la investigación de ANA en el perro ya que también producen una menor proporción de falsos positivos (Hansson y col., 1996).

La especificidad antigénica puede guardar relación con el origen y mecanismo de producción de cada tipo de ANA, así como con su grado de patogenicidad. Los anticuerpos anti-ADN son especialmente importantes en la patogenia de algunas enfermedades autoinmunes sistémicas como el LES. Estos anticuerpos pueden reaccionar con ADN de cadena simple o contra ADN de doble cadena (Hahn, 1998).

Para estudiar la presencia de ANA específicos para ADN de doble cadena en perros con leishmaniosis, seleccionamos 34 muestras con títulos positivos sobre células HEP-2 y/o cortes de hígado de rata. La determinación se hizo mediante inmunofluorescencia sobre cultivos del protozoo hemoflagelado *Crithidia lucillae*. Este protozoo se ha demostrado como un sustrato útil para detectar anticuerpos específicos para ADN. Posee una gran mitocondria que contiene ADN relativamente libre de otros antígenos nucleares como las histonas (Halliwell, 1982; Fritzler, 1992). Además de su sencillez, la técnica presenta la ventaja de, a diferencia de otros ensayos de IFI para ANA, detectar tanto Ac de alta como de baja afinidad (Brinet y col., 1988).

Sorprendentemente, de las 34 muestras sólo una de ellas alcanzó un título positivo de 1:80. De estos resultados se desprende que en perros con leishmaniosis el desarrollo de ANA específicos para ADN de doble cadena es excepcional. Otra conclusión sería cuestionar la validez de la prueba. En el perro, algunos autores consideran que la técnica de *Crithidia* carece de sensibilidad suficiente para ser empleada como técnica de rutina, además parece detectar preferentemente Ac de baja afinidad para ADN de doble cadena y recomiendan el empleo de métodos ELISA que son positivos en el 90% de perros con LES (Jones, 1993). También se ha apuntado la posibilidad de que en el suero canino existan ciertos componentes no específicos que se unen al ADN y parecen interferir con la unión de los Ac anti-ADN (Andersson y Sevelius, 1992). Sin embargo, otros autores han aplicado precisamente esta técnica con buenos resultados; Monier y col., (1988) la emplearon para detectar ADN de doble cadena en perros con LES partiendo de una dilución inicial de 1:2, mientras que el método empleado aconseja diluir las muestras al 1:10. Es posible que hubiese un mayor número de positivos si hubiésemos llevado a cabo el ensayo con una dilución menor, pero a bajas diluciones se ha visto que esta técnica, aplicada en suero de perros con LES, produce falsos positivos (Brinet y col., 1988). Más recientemente, se ha publicado la existencia de reacciones cruzadas entre este protozoo y *Leishmania* (Martincovic y Marinculic,

2006). Era de esperar por tanto, una mayor proporción de resultados positivos. Sea cual sea la causa de la práctica ausencia de muestras positivas, nuestros resultados son más compatibles con aquellos autores que consideran esta prueba poco útil en el perro.

Los Ag nucleares Sm y RNP forman parte del grupo denominado Ag nucleares extraíbles (ENA) (Tan 1982). Los Ac frente al Ag Sm se consideran un marcador serológico de LES humano. En perros con LES, los Ac anti-Sm son los que se encuentran con más frecuencia (16% de casos) mientras que el resto de Ac frente a ENA se detectan de forma excepcional o nunca (Chabanne y col., 1995). Mediante la técnica de doble difusión, se investigó la presencia de Ac frente a los Ag Sm y RNP. Ninguna de las 34 muestras analizadas fue positiva y podemos concluir por tanto que los ANA frente a estos antígenos nucleares no son significativos en la leishmaniosis canina.

En conclusión, los ANA específicos para ADN de doble cadena son excepcionales en perros con leishmaniosis o bien la técnica de IFI sobre *Crithidia* carece de sensibilidad suficiente para detectarlos, algo similar ocurre con los ANA específicos de Sm y RNP cuando se investigan mediante técnicas de doble inmunodifusión. Las técnicas de IFI sobre células HEP-2 obtienen una prevalencia mucho mayor de ANA en perros con leishmaniosis que puede ser atribuida a una mayor sensibilidad y sería por tanto la técnica de elección para la determinación de ANA en el perro.

5. Bibliografía

1. Andersson, M., Sevelius, E. Circulating autoantibodies in dogs with liver disease. *Journal of Small Animal Practice*, 1992, vol. 33, p. 389-394.
2. Bradwell, A. R., Stokes, R. P., Johnson, G.D. Atlas of HEP-2 patterns. Editado por Bradwell, A. R. Birmingham (UK):The Binding Site 1995, pp. 37-65. ISBN 0704416220.
3. Brinet, A., Fournel, C., Faure, J. R., Venet, C., Monier, J. C. Anti-histone antibodies (ELISA and immunoblot) in canine lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*, 1988, vol. 74, p. 105-109.
4. Chabanne, L., Cadoré, J. L., Fournel, C. Les examens en immunorheumatologie. *Le Point Veterinaire*, 1995, vol. 26, p. 45-53.
5. Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R. D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected. *Veterinary Record*, 1997, vol. 141, p. 539-543.
6. Fritzler, M. J. Immunofluorescent antinuclear antibody test. En Rose, N. R., Conway, E., Fahey, J. L., Friedman, H., Penn, G. M., Manual of clinical laboratory immunology, 4ª ed. Washington (USA): American Society for Microbiology, 1992, pp. 724-734. ISBN 1-55581-043-8.
7. Ginel, P. J., Camacho, S., Lucena, R. Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Research in Veterinary Science*, 2008, DOI 10.1016/j.rvsc.2008.01.007.
8. Hahn, B. H. Antibodies to DNA. *New England Journal of Medicine* 1988, vol. 338, p. 1359-1368.
9. Halliwell, R. E. W. Autoimmune diseases in domestic animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1982, vol. 181, p. 1088-1096.

10. Hansson, H., Trowald-Wigh, G., Karlsson-Parra, A. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence in dog sera: comparison of rat liver tissue and human epithelial-2 cells as antigenic substrate. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1996, vol. 10, p. 199-203.
11. Jones, D. R. E. Canine systemic lupus erythematosus: new insights and their implications. *Journal of Comparative Pathology*, 1993, vol. 108, p. 215-228.
12. Kelly, P. J., Carter, S. D., Bobade, P.A., Matthewman, L. A., Bell, S. C. Absence of antinuclear antibodies in dogs with Ehrlichia canis. *Veterinary Record*, 1994, vol. 134, p. 382.
13. Lucena, R., Ginel, P. J., López, R., Novales, M., Martín, E., Molleda, J. M. Antinuclear antibodies in dogs with leishmaniosis. *Journal of Veterinary Medicine series A*, 1996, vol. 43, p. 255-259.
14. Martinkovic, F., Marinculic, A. Antibodies against *Leishmania* cross-react with *Crithidia luciliae*: indirect immunofluorescence and Dot-ELISA study in dogs. *Parasitology Research*, 2006, vol., 98, p. 378-380.
15. Monestier, M., Novick, K. E., Karam, E. T., Chabanne, L., Monier, J. C., Rigal, D. Autoantibodies to histone, DNA and nucleosome antigens in canine systemic lupus erythematosus. *Clinical and Experimental Immunology*, 1995, vol. 99, p. 37-41.
16. Monier, J. C., Fournel, C., Lapras, M., Dardenne, M., Randle, T., Fontaine, C. M. Systemic lupus erythematosus in a colony of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1988, vol. 49, p. 46-51.
17. Palacio, J., Liste, F., Gascón, M. Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, 1997, vol. 140, p. 477-480.
18. Paul, S., Wilkerson, M. J., Shuman, W., Harkin, K. R. Development and evaluation of a flow cytometry microsphere assay to detect anti-histone antibody in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005, vol. 107, p. 315-325.
19. Shull, R. M., Miller, H. A., Chilina, A. R. Investigation of the nature and specificity of antinuclear antibody in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1983, vol. 44, p. 2004-2008.
20. Slappendel, R. J. Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 1988, vol. 10, p. 1-16.
21. Tan, E. M. Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology*, 1982, vol. 33, p. 167-240.
22. White, S. D., Rosychuk, R. A. W., Schur, P. H. Investigation of antibodies to extractable nuclear antigens in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 1992, vol. 53, p. 1019-1021.
23. Wilson, M. R., Sanders, R. D. Immunodiffusion assays for antibodies to small nuclear ribonucleoproteins and other cellular antigens. En Rose, N. R., Conway, E., Fahey, J. L., Friedman, H., Penn, G. M. Manual of clinical laboratory immunology, 4ª ed. Washington (USA): American Society for Microbiology, 1992, pp. 741-746. ISBN 1-55581-043-8.

RECVET® Revista Electrónica de Clínica Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Es una revista científica, arbitrada, online, mensual y con acceso completo a los artículos íntegros. Publica preferentemente trabajos de investigación originales referentes a la Medicina y Cirugía Veterinaria desde el aspecto Clínico en cualquier especie animal. Se puede acceder vía web a través del portal Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> o desde RECVET® <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet> Dispones de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por correo electrónico solicitándolo a recvet@veterinaria.org. Si deseas postular tu artículo para ser publicado en RECVET® contacta con recvet@veterinaria.org después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/normas.html>. Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org®, <http://www.veterinaria.org> y RECVET® <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet> Veterinaria Organización® (Copyright) 1996-2008 Email: info@veterinaria.org