

LAVORO ORIGINALE

Lupus neonatale: manifestazioni cliniche e rischio di blocco cardiaco congenito in neonati da madri con anticorpi antiRo/SS-A

Neonatal lupus: clinical features and risk of congenital cardiac heart block in newborns from mothers with anti Ro/SSA antibodies

M. Frassi¹, A. Brucato⁴, I. Cavazzana¹, F. Franceschini¹, D. Faden², M. Motta³, A. Doria⁹, R. Cimaz⁷, M.P. Pisoni⁵, M. Muscarà⁶, G. Castellino⁶, G. Brambilla⁴, P.L. Meroni⁸, R. Cattaneo¹, C. Biasini Rebaioli¹, C. Antonioli¹, G. Balestrieri¹, A. Tincani¹

¹Servizio di Immunologia Clinica; ²Ginecologia e ³Ostetricia, Neonatologia Spedali Civili di Brescia; Medicina ⁴«Brera»; ⁵Ostetricia e ⁶Ginecologia, Reumatologia, Ospedale Niguarda di Milano; ⁷Clinica Pediatrica, ICP, Milano; ⁸IRCCS Auxologico Italiano, Milano. ⁹Divisione e Cattedra di Reumatologia, Padova

SUMMARY

Objective: To assess the prevalence of Congenital Heart Block (CHB) in newborns from anti Ro/SS-A antibodies positive mothers affected by connective tissue diseases (CTD) and to evaluate the prevalence of other manifestations of Neonatal Lupus (NL) and the electrocardiographic abnormalities.

Methods: A prospective study was conducted on 100 anti Ro/SS-A positive mothers that were followed before and during their 118 pregnancies (4 twin pregnancies and 18 second pregnancies). Counterimmunoelectrophoresis (CIE) and immunoblot (IB) were used to test antibodies to extractable nuclear antigens (ENA).

Results: Only 2 cases of CHB (1.8%) were found among the 112 living newborns. In one case the mother with primary Sjögren's Syndrome (pSS) was anti Ro 60 and 52kD positive while in the other case the mother affected by undifferentiated connective tissue disease (UCTD) was anti Ro 60kD and anti La positive. No fetal death was due to CHB. There were no cutaneous rashes at birth while mild hepatic enzyme alterations were observed in 21 (68%) of the 31 tested newborns. In 22 healthy newborns an ECG have been registered and in 4 cases (18.2%) sinus bradycardia was found. During the follow up 7 suckling showed Cutaneous Neonatal Lupus. Moreover a six month girl developed Kawasaki Syndrome.

Conclusions: The risk of delivering a child with CHB is 1.8% in anti Ro/SS-A positive mothers with CTD. This finding is extremely important in the preconceptional counseling of anti-Ro/SS-A positive women. Furthermore mild electrocardiographic abnormalities may be found in their healthy newborns.

Reumatismo, 2001; 53(4):298-304

INTRODUZIONE

Numerosi studi hanno messo in evidenza che esiste una stretta correlazione tra le manifestazioni cliniche del Lupus Neonatale, comprendenti il rash cutaneo, la colestasi epatica, le citopenie (anemia, leucopenia, piastrinopenia), il blocco cardia-

co congenito (CHB) e la presenza degli anticorpi anti Ro/SS-A. Le alterazioni tipiche di questa sindrome, coinvolgendo tessuti capaci di rigenerarsi, sono in genere reversibili mentre non lo è il CHB, la manifestazione più severa, dal momento che il tessuto cardiaco una volta danneggiato è sostituito da tessuto fibrotico con conseguente perdita della sua funzionalità (1, 2). Alla luce di quanto detto risulta di fondamentale importanza conoscere il rischio di sviluppare CHB legato alla presenza di questi particolari autoanticorpi. I dati forniti sull'argomento dalla letteratura scientifica non sono molto chiari: in uno studio retrospettivo il rischio è del 5% mentre in uno studio prospettico che include

Lavoro premiato al XXXVII Congresso SIR di Milano, 2000

Indirizzo per la corrispondenza:

Micol Frassi, Indirizzo: Piazzale Spedali Civili 1,
Servizio di Immunologia Clinica e Allergologia, 25125 Brescia
E-mail:frassimicol@yahoo.it

solo pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico è dello 0% (3, 4).

Gli anticorpi anti Ro/SS-A, insieme agli anti La/SS-B, fanno parte del gruppo degli anticorpi rivolti verso antigeni nucleari estraibili (ENA). L'antigene Ro è costituito da una proteina di 60 kD (Ro 60), complessata con RNA citoplasmatici; è stata inoltre identificata un'altra proteina Ro di 52 kD (Ro 52) antigenicamente e strutturalmente distinta dal Ro 60 (5). La presenza degli anticorpi anti Ro 52 e/o anti La/SS-B si associa più frequentemente al CHB rispetto alla presenza degli anti Ro 60 isolati (6-8).

Recentemente dati sperimentali mostrano che gli anticorpi anti Ro/SS-A possono determinare una serie di effetti elettrofisiologici sul tessuto cardiaco fetale interferendo con i canali del calcio e danneggiando il nodo atrioventricolare ed il nodo del seno (9, 10).

Il presente studio è stato intrapreso allo scopo di valutare in modo prospettico la frequenza di CHB nei figli nati da donne anti Ro positive affette da malattie autoimmuni sistemiche e di stabilire se alla nascita erano presenti alterazioni elettrocardiografiche o altre manifestazioni di lupus neonatale (ematologiche, cutanee ed epatiche).

PAZIENTI E METODI

Pazienti

Lo studio è stato condotto in quattro Centri con esperienza nella gestione di pazienti con malattie autoimmuni sistemiche e gravidanze ad alto rischio ostetrico (ARO): Spedali Civili di Brescia, Università di Padova, Ospedale Niguarda e Università di Milano. Tutte le donne arruolate nello studio erano regolarmente seguite presso i suddetti centri e l'unico criterio di selezione è stato la positività anticorpale per l'antigene Ro/SS-A prima dell'inizio della gravidanza. Cinquantatré pazienti erano affette da Lupus Eritematoso Sistemico (LES), secondo i criteri ACR (11), 19 da Connettivite Indifferenziata (UCTD) (12), 25 da Sindrome di Sjögren Primaria (pSS) (13, 14), 1 da Sclerosi Sistemica (SSc) (15), 1 da Malattia Mista del Connettivo (MCTD) (16) e 1 da Sindrome da Antifosfolipidi Primaria (PAPS) (17). In ogni paziente sono stati testati gli anticorpi anti-Ro/SS-A prima della gravidanza e la positività è stata poi riconfermata durante la gravidanza; sono state infatti incluse nello studio solo le donne che si sono confermate anti-Ro/SS-A positive con la controimmunolettrofo-

resi (CIE). Tutte le donne sono state seguite mensilmente fino alla fine della gravidanza; il monitoraggio ostetrico includeva un controllo ecografico trimestrale, l'ecocardiografia fetale eseguita settimanalmente dalla 18^a alla 24^a settimana e la Velocimetria doppler placentare eseguita alla 24^a settimana con successivi controlli quando ritenuto necessario dall'operatore. Il CHB è stato diagnosticato durante il periodo fetale con la dimostrazione ecocardiografica di una dissociazione atrio-ventricolare.

METODI

Gli anticorpi anti-nucleo (ANA), anti-dsDNA, anti-ENA e anti-cardiolipina sono stati mensilmente valutati durante il periodo gravidico. Gli ANA, determinati con immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2 (Kallestad, Chaska, MN, USA), sono stati considerati positivi se presentavano un titolo superiore a 1:80. Gli anticorpi anti-dsDNA sono stati rilevati con metodica di Farr (Kodak Clinical Diagnostics LTD, Amersham, UK) e gli anticorpi anti-cardiolipina sono stati determinati con metodica ELISA, secondo quanto suggerito dall'International Standardization Workshop (18).

Gli anticorpi anti Ro/SSA sono stati studiati con metodica di controimmunolettroforesi (CIE), usando come substrato un estratto di milza umana separata secondo le indicazioni di Clark et al. (19). Gli anticorpi rivolti contro altri ENA sono stati determinati con CIE utilizzando un estratto di timo di coniglio (Peel-Freeze, Rogers, Arkansas, USA). La fine specificità degli anticorpi anti-Ro/SS-A è stata analizzata tramite tecnica di Immunoblotting (I.B.) su estratto di milza umana.

RISULTATI

Centodiciotto gravidanze di cui 18 seconde gravidanze sono state seguite prospetticamente in 100 donne con età media al primo parto di 31 anni (range 23-40). Si sono registrati 7 aborti spontanei e 3 morti endouterine; le restanti 108 gravidanze hanno avuto esito favorevole con nascita di 112 bambini (4 parti gemellari) (Tab. I).

In due feti (1 maschio e 1 femmina) è stato diagnosticato il CHB rispettivamente alla 22^a e 20^a settimana di gestazione. Il rischio di CHB si è rivelato essere del 2% considerando solo i nati in prima gravidanza (2 casi su 100 bambini), dell'1,8%

Tabella I - Esito gestazionale delle 100 donne Anti Ro/SS-A positive.

Diagnosi (100 pz)	AS (7)*	MEU (3)	Nati vivi (112)
53 LES	4	2	58 (3 P.G.)**
25 SS	0	1	29 (1 P.G.)
19 UCTD	1	0	22
1 MCTD	0	0	2
1 SSc	2	0	0
1 PAPS	0	0	1

* 1 gravidanza extrauterina; ** parti gemellari.

considerando anche i nati in seconda gravidanza (2 casi su 112 neonati) e dell'1,7%, calcolandolo in rapporto al numero complessivo delle gravidanze (2 casi su 118 gravidanze); non si sono avuti casi di CHB nelle 18 seconde gravidanze. Prima della diagnosi di CHB una delle 2 madri, affetta da pSS, assumeva fluocortolone a un dosaggio di 10 mg/die per il riscontro di piastrinopenia; l'altra con diagnosi di UCTD non era sottoposta ad alcun trattamento farmacologico. In seguito alla diagnosi di CHB ad entrambe le donne è stato immediatamente somministrato desametasone al dosaggio di 4 mg/die ed entrambe hanno subito taglio cesareo alla 38^a settimana. I neonati mostravano ritardo di crescita intrauterino (IUGR) e non erano presenti segni di idrope o segni di scompenso cardiaco. Nella femmina è stata necessaria l'applicazione di un pace-maker ad 8 mesi dalla nascita, mentre nel maschio a 3 anni. Attualmente ambedue i bambini godono di buona salute.

In due Centri (Ospedale Niguarda e Università di Milano) è stato eseguito routinariamente un elet-

trocardiogramma in 24 neonati; sono stati così registrati 4 casi di bradicardia sinusale, definita come una frequenza cardiaca inferiore al 3° centile per età (20, 21). In tutti e quattro i casi è stata esclusa la possibilità di alterazioni elettrolitiche e/o interferenza farmacologica come causa di bradicardia. Quest'ultima si è risolta spontaneamente in tutti i casi nell'arco di due settimane senza lasciare esiti. Un allungamento dell'intervallo QT è stato osservato in 9 casi alcune settimane dopo la nascita come è stato descritto recentemente (22) (Tab. II). Alla nascita in 31 bambini sono stati valutati gli enzimi epatici e nel 68% (21/31) sono state riscontrate lievi alterazioni. Sono state valutate l'aspartato transaminasi (AST), l'alanina aminotransferasi (ALT), la γ glutamil transferasi (γ GT) e la fosfatasi alcalina (ALP) e sono stati considerati nella norma valori inferiori a 60 U/I per l'AST, a 25 U/I per l'ALT, a 100 U/I per la γ GT e di 160U/L per l'ALP (23) (Tab. III).

Sette casi di Lupus Cutaneo Neonatale sono stati registrati tra il 5° ed il 7° mese di vita casi che, tuttavia, si sono risolti spontaneamente. In una bambina di 6 mesi è stata posta diagnosi di Sindrome di Kawasaki in seguito alla comparsa di iperpiresia, iperemia congiuntivale bilaterale, mucosite, linfadenopatia laterocervicale, eritema ed edema palmoplantare con desquamazione. Le indagini di laboratorio mostravano alterazioni tipiche della vasculite quali leucocitosi, aumento degli indici di flogosi e piastrinosi (Tab. IV).

Tutte le madri avevano gli anticorpi anti-Ro/SS-A, mentre gli anticorpi anti-La/SS-B erano presenti in 28 casi. Quattro madri presentavano anticorpi anti Ro 52 kD isolati, 30 pazienti avevano anti Ro 52 e 60 kD, 52 presentavano anti Ro 60 kD isolati. Sette casi non hanno mostrato alcuna reattività in IB.

Tabella II - Descrizione dei 4 casi di bradicardia sinusale.

Bradicardie sinusali	1° caso	2° caso	3° caso	4° caso
Sesso	maschio	maschio	femmina	femmina
E.G.	40	38	39	41
Parto	P.V. spontaneo	T.C.	P.V. spontaneo	P.V. spontaneo
Peso	3390	2340	2670	3200
Apgar 1' - 5'	9 - 9	9 - 10	9 - 10	9 - 10
Freq. Card.	85	90	90	70
Effettuazione della diagnosi: gg dalla nascita	1	2	2	2

Tabella III - Alterazioni degli enzimi epatici nel 68% dei bambini testati (21/31).

	Percentuale di bambini con alterazione degli enzimi epatici	Range	Valori Normali
AST	9 / 31 (29%)	64 - 163	< 60 U/L
ALT	2 / 31 (6,4%)	39 - 42	< 25 U/L
GGT	12 / 31 (38,7%)	104 - 802	< 100 U/L
ALP	12 / 31 (38,7%)	174 - 368	< 160 U/L

Tabella IV - Dettagli sul caso di Sindrome di Kawasaki

Femmina di 6 mesi

La madre è affetta da LES e SS con Ro 60, ANA pos. Punteggiato 1:640 e dsDNA 12.4U/l

Sintomatologia: Iperpiressia, iperemia congiuntivale bilaterale, mucosite, linfadenopatia laterocervicale, eritema ed edema palmoplantare con desquamazione, enterite, xerosi cutanea, iperemia membrane timpaniche.

		Esami di laboratorio			
Peso	6490 g	G.B.	18200/mm ³	C3/C4/CH50	Punt. 1:80
Lunghezza	69 cm (90° cent.)	Hb	10.5 g/dl	Prot. Tot.	6,6 g/dl
Circ. Cranica	42 cm (25°-50° cent.)	HCT	34%	ALT /AST	24 /17 U/l
Freq. Card.	160 bpm	PLT	467000/mm ³	GGT	19 U/l
		Fibrinogeno	1080	ALP	117 U/l
		VES /PCR	92 /170 µg/ml	LDH	239 U/l

Rx Torace: disomogeneo addensamento parenchimale a livello del corno ilare inferiore dx.

Eco Addome: normale.

Ecocardiografia ripetuta per 3 volte: nella norma, non dilatazioni aneurismatiche coronariche.

Terapia: Ig endovena- ceftriaxone – ASA – Dipiridamolo – soluzione glucosalina parenterale-paracetamolo

Tabella V - Fine specificità degli anticorpi Anti Ro e Anti La e loro relazione con il CHB.

Diagnosi materna	Anti Ro 52 kD e/o Anti La	Anti Ro 60 kD da solo o Non blotter
53 LES	25 (47%)	28 (53%)
25 SS	17 (68%)	8 (32%)
19 UCTD	11 (58%)	8 (42%)
1 MCTD, 1 SSc, 1 PAPS	2 (67%)	1 (33%)
CHB	2/55 (3,6%) madri con pSS e UCTD	0

La mamma di uno dei bambini con CHB era positiva agli anti Ro 52 e 60 kD e negativa agli anti La/SS-B; mentre l'altra era positiva agli anti Ro 60 kD e agli anti La/SS-B. La prevalenza del CHB nelle gravidanze di donne positive agli anti Ro 52

kD e/o agli anti La/SS-B è del 3,6% (2 casi in 55 gravidanze), mentre nelle 45 gravidanze di donne negative per anti Ro 52 kD e anti La/SS-B non sono stati osservati casi di CHB (i dati sono mostrati nella tabella V).

DISCUSSIONE

Il riscontro di 2 casi di CHB nello studio di 100 pazienti anti-Ro positive fornisce, per la prima volta, uno strumento di quantificazione del rischio a chi valuta pazienti con questi anticorpi nel corso della visita preconcezionale. In effetti, la letteratura precedente non focalizzava con chiarezza il problema in quanto un lavoro retrospettivo (3) in pazienti con LES e anticorpi anti Ro/SS-A riportava un'incidenza del 5%, mentre un lavoro prospettico fatto su un numero non elevato di pazienti con la stessa forma (4) riportava un rischio pari a zero.

Inoltre è rilevante che in questo studio prospettico i risultati si riferiscano a donne valutate alla CIE come anti Ro/SS-A positive prima della gravidanza. In effetti, il fatto che il metodo sia certamente specifico ma forse non tra i più sensibili, fa supporre di aver valutato come positive solo donne con una positività anticorpale più che sicura. Probabilmente una valutazione che prendesse in considerazione donne positive anche soltanto in metodiche ELISA porterebbe ad una frequenza di CHB anche più bassa.

Gli autoanticorpi anti Ro/SS-A sono diretti verso due antigeni a peso molecolare diverso: 52 e 60 kD. La distinzione non è puramente accademica, in quanto osservazioni effettuate in madri che hanno avuto figli con CHB identificano come particolarmente a rischio le donne con anticorpi anti Ro 52 kD e/o anti La/SS-B (5-7). Il nostro lavoro, sia pure nella relativa limitatezza dei casi, conferma tale associazione in quanto i due casi di CHB si sono verificati il primo in una paziente con anticorpi anti Ro 52 kD, il secondo in una paziente con anticorpi anti La/SS-B.

Nel nostro studio i casi di CHB sono stati osservati in donne affette da pSS e UCTD mentre nessuna donna con LES ha dato alla luce un neonato con CHB; questo riscontro potrebbe trovare spiegazione nel fatto che, nei pazienti con lupus sistemico, gli anticorpi anti Ro 52 kD sembrerebbero essere poco rappresentati (24, 25).

In tutte e 2 le nostre pazienti il CHB è stato diagnosticato in utero, a 20 e a 22 settimane. Pertanto in tutti e 2 i casi è stato possibile instaurare il trattamento che viene consigliato da taluni autori come potenzialmente terapeutico (26). Si tratta di un trattamento con corticosteroidi fluorati che hanno una significativa biodisponibilità per il feto e sono somministrati nell'intento di controllare il danno flogistico del tessuto di conduzione media-

to dagli anticorpi anti Ro/SS-A e anti La/SS-B. In entrambi i casi di blocco, che comunque si presentava come completo dalla diagnosi, il trattamento non ha portato alcuna significativa variazione.

Dati sperimentali condotti su cuori fetali umani e murini hanno evidenziato un'interferenza degli anticorpi anti Ro/SS-A e anti La/SS-B sull'attività elettrica cardiaca (13) ed in particolar modo sulla conduzione del nodo atrio ventricolare (14). Nel 1999 Mazel et al. hanno osservato bradicardia sinusale e blocco cardiaco incompleto nei topi nati da madri immunizzate passivamente con boli di anticorpi Anti Ro/SS-A e Anti La/SS-B. Ciò spiegherebbe come gli effetti degli anticorpi sui canali del calcio riguardino non solo il nodo atrio ventricolare ma anche il nodo del seno (9). L'attendibilità di questi studi è confermata dal nostro riscontro di 4 casi di bradicardia sinusale nei 24 bambini osservati. A conferma che le turbe elettriche sono possibili in questa situazione, un'altra alterazione elettrocardiografica, e cioè il prolungamento del QT (corretto secondo la formula di Bazett (>440 msec)), è stata recentemente segnalata in bimbi nati da madri anti Ro/SS-A positive (22).

A parte il CHB, il lupus neonatale, legato alla presenza di anticorpi anti Ro/SS-A nella madre, comprende manifestazioni cutanee, alterazioni degli enzimi epatici e citopenie. Tutte queste alterazioni sono descritte come transitorie (27).

In accordo con quanto descritto, abbiamo osservato 7 casi di alterazioni cutanee compatibili con la diagnosi di lupus neonatale, tutte verificatesi tra il 5° e il 7° mese. In nessuno dei bimbi abbiamo riscontrato alterazioni significative della crasi ematica.

Al contrario, è di interesse ricordare che alterazioni degli enzimi epatici sono state riscontrate nel 68% dei 31 bambini esaminati. Tale coinvolgimento è spesso sottostimato dal momento che la normale valutazione neonatale non include la funzionalità epatica, che le alterazioni sono spesso lievi e transitorie e che non sempre il prelievo alla nascita è in quantità sufficiente ad eseguirla.

In conclusione nel presente studio abbiamo rilevato una prevalenza dell'1,8% di CHB nei neonati da madri con anticorpi Anti Ro/SS-A e/o Anti La/SS-B. Alterazioni elettrocardiografiche e di laboratorio possono essere riscontrate in questi bambini ma sono necessari ulteriori studi al fine di poter attribuire una correlazione significativa con la sindrome del lupus neonatale.

RIASSUNTO

L'obiettivo dello studio è di stabilire la prevalenza del Blocco Cardiaco Congenito nei nati da donne con anticorpi Anti Ro/SS-A e affette da malattie autoimmuni sistemiche e di valutare la prevalenza delle altre manifestazioni di Lupus Neonatale. Abbiamo seguito prospetticamente le gravidanze di 100 madri positive per gli Anti -Ro/SS-A che sono stati determinati mediante controimmuno-elettroforesi e immunoblotting. Tra i 112 nati vivi si sono avuti 2 casi (1,8%) di CHB, nessun caso di rash cutaneo, 21 casi (68%) su 31 bambini testati di lievi alterazioni degli enzimi epatici e 4 casi (18,2%) su 22 neonati valutati di bradicardia sinusale. La prevalenza del CHB è dell'1,8% e nei neonati sani si possono rilevare lievi alterazioni elettrocardiografiche.

Parole chiave: Blocco cardiaco congenito, anti Ro/SS-A, anti La/SS-B, lupus neonatale, bradicardia sinusale.

Key words: *Congenital heart block, anti Ro/SS-A, anti La/SS-B, neonatal lupus, sinus bradycardia.*

BIBLIOGRAFIA

1. Brucato A, Buyon JP, Horsfall AC, Lee LA, Reichlin M. Fourth international workshop on neonatal lupus syndromes and the Ro/SSA-La/SSB system. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17: 130-36.
2. Buyon JP, Hiebert R, Copel J, Craft J, Friedman D, Katholi M et al. Autoimmune-associated congenital heart block: demographics, mortality, morbidity and recurrence rates obtained from a national neonatal lupus registry. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1658-66.
3. Ramsey-Goldman R, Hom D, Deng JS, Ziegler GC, Kahl LE, Steen VD et al. Anti-SS-A antibodies and fetal outcome in maternal systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1269-73.
4. Lockshin MD, Bonfa E, Elkouf K, Druzin ML. Neonatal lupus risk to newborns of mothers with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 697-701.
5. Ben Chetrit E, Chan EK, Sullivan KF, Tan EM. A 52-kD is a novel component of the SS-A/Ro antigenic particle. *J Exp Med* 1988; 167: 1560-71.
6. Julkunen H, Kurki P, Kaaja R, Heikkilä R, Immonen I, Chan EK et al. Isolated congenital heart block. Long term outcome of mothers and characterization of the immune response to SS-A/Ro and to SS-B/La. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1588-98.
7. Buyon JP, Winchester RJ, Slade SG, Arnett F, Copel J, Friedman D et al. Identification of mothers at risk for congenital heart block and other neonatal lupus syndrome in their children. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and immunoblot for measurement of anti-SS-B-La antibodies. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1263-73.
8. Colombo G, Brucato A, Coluccio E, Compasso S, Luzzana C, Franceschini F et al. DNA typing of maternal HLA in congenital complete heart block: comparison with systemic lupus erythematosus and primary Sjogren syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1757-64.
9. Mazel JA, El Sherif N, Buyon J, Boutjdir M. Electrocardiographic abnormalities in a murine model injected with IgG from mothers of children with congenital heart block. *Circulation* 1999; 99: 1914-18.
10. Boutjdir M, Chen L, Zhang ZH, Tseng CE, DiDonato F, Rashbaum W et al. Arrhythmogenicity of IgG and anti-52-kD SSA/Ro affinity-purified antibodies from mothers of children with congenital heart block. *Circ Res* 1997; 80: 354-62.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982; 25 (11): 1271-77.
12. Mosca M, Tavoni A, Neri R, Bencivelli W, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases: the clinical and serological profiles of 91 patients followed for at least 1 year. *Lupus* 1998; 7: 95-100.
13. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerli R, Patron PY et al. (The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's Syndrome). Assessment of the European classification criteria for Sjögren's Syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 116-21.
14. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Balestrieri G, Bencivelli W, Bernstein RM et al. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheum* 1993; 36(3): 340-47.
15. Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA, Altman RD, D'Angelo WA, Fries JF et al. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-90.
16. Alarcon-Segovia D, Cardiel MH: Comparison between 3 diagnostic criteria for mixed connective tissue disease. Study of 593 patients. *J Rheumatol* 1989; 16: 328-34.
17. Wilson WA, Gharavi AE, Koike T, Lockshin MD, Branch DW, Piette JCP et al. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1309-11.
18. Harris EN. The second international anticardiolipin standardization workshop. The Kingstom antiphospholipid antibody study (KAPS) group. *Am J Pathol* 1990; 94: 476-84.
19. Clark G et al. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; 102: 117-22.
20. Brucato A, Cimaz R, Catelli L, Meroni P. Anti-Ro-associated sinus bradycardia in newborns [letter]. *Circulation* 2000; 102: E88-E89.

21. Southall et al. Study of cardiac arrhythmias and other forms of conduction abnormalities in newborn infants. *Br Med J* 1977; 2: 597-9.
22. Cimaz R, Stramba-Badiale M, Brucato A, Catelli L, Panzeri P, Meroni PL. QT interval prolongation in asymptomatic anti-SSA/Ro-positive infants without congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1049-53.
23. Burgio GR, Perinotto G, Ugazio AG. *Pediatria essenziale*. Quarta edizione. Utet 1997.
24. Bernstein RM, Bunn CC, Hughes GRV. Identification of antibody to acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 554-55.
25. Clark G, Reichlin M, Tomasi TB. Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1969; 102: 117-22.
26. Saleeb S, Copel J, Friedman D, Buyon JP. Comparison of treatment with fluorinated glucocorticoids to the natural history of autoantibody-associated congenital heart block. *Arthritis Rheum* 1999; 42 (11): 2335-45.
27. Lee LA. Maternal autoantibodies and pregnancy. II. The neonatal lupus syndrome. *Clin Rheum* 1990; 4: 69-75.