

Anti-dsDNA antikorlarının saptanmasında üç ELISA yönteminin CLIF testiyle karşılaştırılması

Comparison of three ELISA methods with CLIF test for detection of anti-dsDNA antibody

Feyza ÇETİN¹, Alparslan TOYRAN¹, Özlem AYTAÇ¹, Feride ALACA-COŞKUN¹,
İpek MUMCUOĞLU¹, Feyza ALP¹, Altan AKSOY¹

ÖZET

Amaç: Sistemik lupus eritematozus (SLE) hücre çekirdeğindeki antijenlere karşı antikorların oluşturduğu otoimmün bir hastalıktır. Amerikan Romatoloji Derneği (ACR) kriterlerine göre SLE tanısında kullanılan immünolojik parametreler anti nükleer antikor (ANA) ve anti-dsDNA otoantikorlarıdır. Bu çalışmada anti-dsDNA antikorlarının saptanmasında, CLIF yöntemi referans yöntem kabul edilerek, üç farklı ELISA kitinin özgülüğünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmaya 1 Mayıs - 31 Temmuz 2013 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik olarak SLE tanısı almış olan 81 hastanın serum örnekleri dahil edilmiştir. Bu serumlarda ANA varlığı öncelikle immüno Floresan antikor (IFA) yöntemiyle araştırılmıştır. Pozitif serum örnekleri -80 °C'de prospektif analiz için saklanmış ve aynı gün dört farklı anti-dsDNA testi ile çalışılmıştır. Bu testler; üç adet anti-dsDNA ELISA kiti; CHORUS dsDNA-G (DIESSE Diagnostica Senese, İtalya), Anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG (EUROİMMUN, Almanya), QUANTA Lite dsDNA SC ELISA (INOVA Diagnostics, Kaliforniya) ve CLIF testi (Crithidia luciliae anti-dsDNA, EUROİMMUN, Almanya) idi.

Bulgular: Hastaların IFA yöntemi ile ANA paternleri; %35,8 homojen patern, %22,2 homojen+diğer patern, %24,7 granüler patern, %8,7 granüler + diğer paternler, %7,4 nükleolar patern ve %1,2 sentromer patern olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre SLE hastalarında en

ABSTRACT

Objective: Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease caused by antibodies which produced against antigens commonly on cell nuclei. According to the criteria of American College of Rheumatology (ACR), the immunological parameters which are used for diagnosis of SLE, are anti- nuclear antibodies (ANA) and anti- dsDNA autoantibodies. In this study it is aimed to investigate the specificity of three different ELISA tests by comparing with CLIF test, as a reference method, for the determination of anti-dsDNA antibodies.

Methods: Sera of 81 patients who were diagnosed as SLE and sent to the Microbiology Department of our hospital between 1 May - 31 July 2013, were included in the study. In these sera, ANA positivity was firstly investigated by immunofluorescence antibody test (IFA). Positive sera were stored at -80 °C for prospective analysis and processed with four different anti-dsDNA assays at the same day. These assays were three anti-dsDNA ELISA kits including; CHORUS dsDNA-G (DIESSE Diagnostica Senese, Italy), anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG (EUROİMMUN, Germany, California), QUANTA Lite dsDNA SC ELISA (INOVA Diagnostics) and CLIF test (Crithidia luciliae anti-dsDNA, EUROİMMUN, Germany).

Results: ANA patterns of patients defined by IFA were determined as; 35.8% homogeneous pattern, 22.2% homogeneous and other patterns, 24.7% granular pattern, 8.7% granular and other patterns, 7.4% nucleolar pattern and 1.2% centromere pattern.

¹ Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, ANKARA



İletişim / Corresponding Author : Özlem AYTAÇ

Ankara Numune Eğitim Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, ANKARA

Tel : +090 506 388 93 45

E-posta / E-mail : ozlemozlem5@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.06.2014

Kabul Tarihi / Accepted : 22.12.2014

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2015.88393

Çetin F, Toyran A, Aytaç Ö, Alaca-Coşkun F, Mumcuoğlu İ, Alp F, Aksoy A. Anti-dsDNA antikorlarının saptanmasında üç ELISA yönteminin CLIF testiyle karşılaştırılması. Turk Hij Den Biol Derg, 2015; 72(2): 103-8.

sık rastlanan ANA paterni homojen patern olmuştur. Çalışılan 81 serum örneğinin anti-dsDNA pozitiflikleri; CLIF yöntemi ile 22 (%27), INOVA ile 46 (%56), EUROIMMUN ile 34 (%41), CHORUS ile 50 (%61) saptanmıştır. CLIF referans yöntem kabul edildiğinde ELISA kitlerinin özgüllükleri ve pozitif prediktif değerleri (PPD) sırasıyla; CHORUS ile %50, %42; INOVA ile %54, %41; EUROIMMUN ile %71, %50'dir.

Sonuç: ANA pozitif olgularda incelenen yöntemler içinde Anti-dsDNA-NcX ELISA IgG yöntemi diğer yöntemlere göre daha yüksek özgüllük ve PPD'e sahiptir. Bu çalışmanın CLIF yöntemi kullanılmadığında seçilecek ELISA yöntemi açısından laboratuvarlara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Sistemik lupus eritematozus, SLE, anti-dsDNA, CLIF, ELISA

According to these results, most common ANA pattern in SLE patients was found as homogeneous pattern. Anti-dsDNA positiveness of 81 sera samples were 22 (27%) with CLIF test, 46 (56%) with INOVA, 34 (41%) with EUROIMMUN and 50 (61%) with CHORUS. When CLIF test was considered as reference method, specificity, and positive predictive value (PPV) of ELISA kits were respectively; 50%, 42% for CHORUS; 54%, 41% for INOVA and 71%, 50% for EUROIMMUN.

Conclusion: Anti-ds DNA-NcX IgG ELISA method had higher specificity and PPV than other tested methods in ANA positive cases. It is thought that this study may guide the laboratories to choose ELISA method in lack of CLIF method.

Key Words: Systemic lupus erythematozus, SLE, anti-dsDNA, CLIF, ELISA

GİRİŞ

Sistemik lupus eritematozus (SLE) sıklıkla hücre çekirdeğindeki antijenlere karşı antikolların oluşturduğu otoimmün bir hastalıktır (1). SLE tanısında kullanılan Amerikan Romatoloji Derneği (ACR) kriterlerinde anti-dsDNA, anti-Sm, anti nükleer antikor (ANA) pozitifliği gibi çeşitli otoantikolar yer alır (2, 3).

Hücre çekirdeğine karşı gelişen her antikora anti nükleer antikor (ANA) denir (1). Anti nükleer antikor (ANA) pozitif olan her hasta SLE değilken, SLE tanılı hastaların çoğunda (%95) ANA pozitifliği vardır (1, 4). Anti nükleer antikor (ANA) tespitinde yaygın olarak kullanılan test kemirgen karaciğeri veya insan epitelyal hücrelerinin (HEP2) kullanıldığı İmmunfloresan antikor testi (IFA) iken Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) testleri de kullanılan testler arasındadır. Anti nükleer antikor (ANA), SLE için oldukça duyarlı olmasına rağmen yaşlı bireylerde de ANA pozitifliği görülebilir. Bu nedenle ANA'nın özellikle seçilmemiş bir popülasyonda veya düşük titrelerdeki pozitifliklerde SLE için pozitif prediktif değeri (PPD) düşüktür ve tanı koydurucu değildir (5 - 7).

SLE tanısında kullanılan başka bir parametre de anti-dsDNA antikorudur. SLE tanılı hastalarda anti-dsDNA pozitifliği %30 - %70 arasında değişkenlik

göstermektedir (1). Anti-dsDNA antikoları SLE tanısı için en sık kullanılan otoantikordur (8). Sistemik lupus eritematozus (SLE) tanısı ve hastalığın aktivasyonunu belirlemede kullanılan önemli serolojik belirteç olarak değerlendirilir (9, 10). Epstein-Barr virüs, hepatit B virüs enfeksiyonu, ilaç kullanımı (hidralazin, TNF inhibitörleri, interferonlar, sülfasalazin) gibi durumlarda anti-dsDNA titreleri yüksek olabilir (11). Bu nedenle SLE tanısı konulurken bu etkenler göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu antikor ELISA, Farr radioimmunoassay (Farr RIA), *Crithidia luciliae* immünfloresan (CLIF) testi gibi üç farklı sistemden biri kullanılarak tespit edilir (10). Bu testler arasında duyarlılık ve özgüllük açısından büyük farklar mevcuttur ve özellikle de anti-dsDNA ELISA'nın farklı ticari kitleri arasında bu fark belirgindir (11). ELISA testi ile çalışılan anti-dsDNA sonuçları IgG spesifik CLIF veya Farr RIA yöntemleri ile doğrulanmalıdır (12, 13).

Bu çalışmada ACR kriterlerine göre klinik olarak SLE tanısı almış hastalarda anti-dsDNA antikollarının varlığı üç farklı ticari ELISA kiti ve iki IFA yöntemi ile araştırılmıştır. *Crithidia luciliae* immünfloresan (CLIF) testi referans yöntem kabul edilerek ELISA kitlerinin özgüllüğünün saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya 1 Mayıs - 31 Temmuz 2013 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji seroloji laboratuvarına gönderilen ACR kriterlerine göre SLE tanısı almış olan 76'sı kadın, 5'i erkek toplam 81 hastanın serum örnekleri dahil edilmiştir. Amerikan Romatoloji Derneği (ACR) kriterleri ilk kez 1982'de tanımlanmış olup 1997'de güncellenmiştir. Bu kriterler; malar rash, diskoid rash, fotosensitivite, oral ülser, artrit, serozit, renal hastalık, nörolojik hastalık, hematolojik hastalık, immünolojik hastalık (anti-DNA, anti-Sm) ve ANA pozitifliği olarak belirlenmiştir. Buna göre bir hastanın SLE tanısı alması için 11 ACR kriterinden en az 4'ü açısından pozitif olması gerekmektedir. Çalışmaya dahil edilen olguların serum örnekleri tüm olgular tedavi altında iken toplanmıştır.

Sistemik lupus eritematozus tanısı almış hastalarda IFA testi ile ANA varlığının araştırılması için standart IFA testi kullanılmıştır (IFFT Mosaic: Hep-20-10/Liver Monkey, EUROIMMUN, Almanya). Kemirgen karaciğeri ve HEP2 hücreleri ile kaplı özel lam alanları üzerine serumların 1/100 dilüsyonları eklenerek üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Sonuçlar floresan mikroskopunda x20 ve x40 objektiflerle ve öncelikle araştırmanın IFA sertifikalı sorumlu asistan hekimi tarafından değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda bir farklılık gözlenmemiştir. Anti nükleer antikor (ANA) varlığı tespit edilen serum örnekleri üç ELISA yöntemi ve CLIF yöntemi çalışılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır. Depolanan serumlar oda sıcaklığına geldikten sonra prospektif analiz için dört farklı anti-dsDNA test kiti ile çalışılmıştır. ELISA testleri için ticari olarak elde edilen anti-dsDNA ELISA kitleri; ELISA testi 1 (ET1) (CHORUS dsDNA-G, DIESE Diagnostica Senese, İtalya), ELISA testi 2 (ET2) (Anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG, EUROIMMUN, Almanya), ELISA testi 3 (ET3) (QUANTA Lite dsDNA SC ELISA, INOVA diagnostics, Kaliforniya); IFA testi için yine ticari olarak elde edilen CLIF (Crithidia luciliae anti-dsDNA, EUROIMMUN, Almanya) kullanılmıştır.

İmmunofloresan antikor testi (IFA) ile anti-dsDNA araştırılmasında antijenik substrat olarak *Crithidia luciliae* içeren lamlara serum örneklerinin

1/10 dilüsyonları eklenmiş ve test üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Sonuçlar floresan mikroskopunda x20 ve x40 objektiflerle ve öncelikle araştırmanın IFA sertifikalı sorumlu asistan hekimi tarafından değerlendirilmiş, daha sonra araştırmanın IFA sertifikalı yürütücüsü uzman hekim ve sorumlu öğretim üyesine danışılmıştır. Değerlendiriciler arasında sonuçlar açısından farklılık gözlenmemiştir.

Çalışılan üç ELISA yöntemi; ET1, ET2 ve ET3, dsDNA'ya karşı oluşan antikordardan IgG sınıfına ait antikoları saptamış ve kalitatif değerlendirme yapılmıştır. ET1 ile çalışılan serumlar dilüe edilmezken, ET2 ile çalışılan serumlar buffer solüsyon ile 1/200 oranında, ET3 ile çalışılan serumlar dilüsyon solüsyonu ile 1/100 oranında dilüsyon yapılarak üretici firmaların talimatları doğrultusunda çalışılmıştır.

BULGULAR

Sistemik lupus eritematozus (SLE) tanısı almış olan 76'sı kadın, 5'i erkek toplam 81 hastanın serum örneği çalışılmıştır. Çalışmaya alınan hastaların yaş ortalaması $39,6 \pm 11,6$ bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen 81 hastanın IFA yöntemi ile ANA paternleri değerlendirilmiştir. Hastaların immünofloresan antikor yöntemi ile ANA paternleri; %35,8 homojen patern, %22,2 homojen+diğer patern, %24,7 granüler patern, %8,7 granüler + diğer paternler, %7,4 nükleolar patern ve %1,2 sentromer patern olarak bulunmuştur (Tablo 1). Bu hastaların ANA paternlerine bakıldığında homojen patern en sık rastlanan patern olmuştur. Aynı zamanda CLIF yöntemi ile pozitif olan hastalarda da en sık homojen patern görülmüştür (Tablo 2).

Çalışılan 81 serum örneğinin anti-dsDNA pozitiflikleri; CLIF yöntemi ile 22 (%27), ET3 ile 46 (%56), ET2 ile 34 (%41), ET1 ile 50 (%61) saptanmıştır. CLIF yöntemi ile pozitif bulunan 22 serum örneğinin 21'i ET1, 19'u ET3, 17'si ET2 ile pozitif bulunmuştur (Tablo 3). CLIF yöntemi ile pozitif olan hastaların 13'ü her üç ELISA kiti, üçü ET3 ve ET1 ile biri de sadece ET1 ile pozitif tespit edilmiştir.

CLIF yöntemi referans yöntem kabul edildiğinde ELISA kitlerinin özgüllükleri; ET1 %50, ET2 %71, ET3

%54; pozitif prediktif değerleri (PPD); ET1 %42, ET2 %50, ET3 %41 olarak bulunmuştur (Tablo 3).

Tablo 1. SLE hastalarının IFA ANA patern dağılımı

ANA paterni	Hasta Sayısı	(%)
Homojen	29	35,8
Homojen + Granüler	12	14,8
Homojen + Nükleolar	5	6,2
Homojen+ Sentromer	1	1,2
Granuler	20	24,7
Granuler + Granüler kromozom bantlanması	2	2,5
Granuler + Nükleolar	4	5,0
Granuler +Nükleer dots	1	1,2
Nükleolar	6	7,4
Sentromer	1	1,2
Toplam	81	100

Tablo 2. CLIF yöntemi ile pozitif hastaların ANA paternleri

ANA paterni	Hasta Sayısı	(%)
Homojen	12	54,69
Homojen + Granuler	2	9,1
Homojen + Nükleolar	2	9,1
Granüler	3	13,6
Granüler + Nükleolar	2	9,1
Nükleolar	1	4,5
Toplam	22	100

Tablo 3. CLIF yönteminin üç farklı ELISA kiti ile karşılaştırılması

		CLIF	
		POZİTİF	NEGATİF
CHORUS (ET1)	POZİTİF	21	29
	NEGATİF	1	30
EUROIMMUN (ET2)	POZİTİF	17	17
	NEGATİF	5	42
INOVA (ET3)	POZİTİF	19	27
	NEGATİF	3	32

TARTIŞMA

Anti nükleer antikor (ANA) tespiti için hala altın standart yöntem olarak kullanılan immünfloresan mikroskopunun kullanımı 1950'lilerde Holman, Kunkel ve Friou tarafından başlatılmıştır (14 - 17). Farklı ANA paternlerinin bulunması farklı nükleer antijenlere karşı antikor oluşmasına bağlıdır ve bu farklı paternler tanı koymada yardımcı olabilir (18, 19).

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda tanı anında immünfloresan yöntemiyle ANA pozitif olan hastaların zamanla ANA pozitifliklerini büyük oranda (%24) kaybettikleri görülmüştür (20). Frodlund ve ark.'ları immünfloresan yöntemiyle ANA pozitifliğinin devam ettiği SLE tanılı hastalar arasında yaptıkları çalışmada ANA paternlerini %62 oranında homojen ± diğer patern, %10'unda sadece granüler patern olarak rapor etmişlerdir (21). Bizim çalışmamızda immünfloresan yöntemiyle ANA paterni değerlendirilen SLE tanılı hastaların %35,8'i homojen patern, %22,2'si homojen patern + diğer paternler, %24,7'si granüler patern, %8,7'si granüler + diğer paternler, %7,4'ü sadece nükleolar patern ve %1,2'si sadece sentromer patern olarak bulunmuştur. Ülkemizde SLE tanılı hastalarda ANA paterni dağılımı ile ilgili fazla çalışmaya rastlanmamıştır.

Amerikan Romatoloji Derneği (ACR)' ne göre SLE tanı kriterlerinden biri de anti-dsDNA antikorunun varlığıdır. Klinik laboratuvarlarda anti-dsDNA antikorunu saptamak için rutin uygulamalarda ELISA, Farr RIA ve CLIF yöntemlerinden biri kullanılmaktadır (22). Farr RIA ve CLIF, SLE tanısında kullanılan en yararlı yöntemlerdir (23). Yüksek duyarlılığına rağmen düşük özgüllüğünden dolayı ELISA yöntemleri ile tespit edilen anti-dsDNA IgG antikorlarının, özgüllüğü daha yüksek olan testlerle doğrulanması önerilmektedir (24). Bu nedenle anti-dsDNA IgG ELISA testi ile pozitif sonuç alınan örnekler genellikle Farr RIA veya CLIF testi ile doğrulanmaktadır (24). Farr RIA testinin anti-dsDNA'nın sadece IgG sınıfı değil tüm immünglobülin sınıflarını saptayabilmesi avantaj olsa da testte radyoaktif madde kullanılması ve otomatize edilememesi kullanımını azaltmaktadır (27). CLIF testi orta ve yüksek aviditeli izotipe özgü anti-dsDNA antikorlarını tespit edebildiği için yüksek özgüllüğe (%98-100) ve düşük duyarlılığa sahiptir

(%47-55) (25, 26). Ayrıca CLIF testi kullanımında Farr RIA' da söz konusu olan yüksek radyasyon maruziyeti riski yoktur. Bu nedenle araştırmamızda CLIF testi, özgüllüğünün hayli yüksek olması da göz önünde bulundurularak referans yöntem olarak seçilmiştir. Kullanılan CLIF testi kitinin SLE tanısı için özgüllüğü üretici firma tarafından kit prospektüsünde >%99 olarak verilmiştir.

Çalışmamızda dikkat çeken bir bulgu IFA ile ANA pozitifliği saptanan 47 hastanın sadece 22 (%46,8)'sinde CLIF testi ile anti-dsDNA pozitifliği saptanmış olmasıdır. ANA pozitif SLE hastalarında CLIF testinin pozitif olma oranının ne olduğu açısından literatür incelendiğinde testin düşük duyarlılığının ve yüksek özgüllüğünün ön plana çıktığı görülmüştür (24, 28). CLIF testinin PPD'sinin araştırıldığı çok merkezli bir kohort çalışmasında yöntemin düşük duyarlılığı (%28-32) ve düşük pozitif prediktif (%46-61) değerine karşın oldukça yüksek özgüllüğe (%96-97) sahip olduğu vurgulanmıştır (28). Chiaro ve ark.'nın 300 olgu üzerinde yürüttüğü başka bir kohort çalışmasında CLIF testi diğer ELISA yöntemleriyle karşılaştırılmış, ANA pozitif hastaların ancak %68'inde CLIF testi pozitif bulunmuştur (24). Bu veriler ışığında, araştırmamızda belirlenen ANA pozitif SLE'li olgularda %46,8'lik CLIF testi pozitifliği, testin yüksek özgüllüğü ile ilişkilendirilmiştir.

ELISA testi ile çalışılan anti-dsDNA sonuçları IgG spesifik CLIF veya Farr RIA yöntemleri ile doğrulanmalıdır (12, 13). Bu çalışmada CLIF yöntemi referans yöntem kabul edilerek üç farklı ELISA kitinin özgüllük ve pozitif prediktif değerleri (PPD) karşılaştırılmıştır. CCLIF testi

referans yöntem kabul edildiğinde ELISA kitlerinin özgüllük ve PPD'leri sırasıyla; CHORUS dsDNA-G ile %50, %42; QUANTA Lite dsDNA SC ELISA ile %54, %41; Anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG ile %71'e, %50 bulunmuştur.

Rutin laboratuvarlarda immünfloresan yöntemiyle ANA testine ek olarak ELISA yöntemi kullanılmaktadır. Çalışmamız sonucunda Anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG ELISA kiti CLIF yöntemi referans test kabul edildiğinde özgüllüğü ve PPD'si en yüksek test olarak bulunmuştur.

Çalışmamızın kontrol grubunun olmaması en önemli kısıtlılık olarak sayılabilir. Sağlıklı kontroller çalışmada yer almadığından CLIF referans testiyle karşılaştırılan ELISA testlerinin duyarlılıkları tespit edilememiş, özgüllükleri ve PPD'leri hesaplanmış ve bu açıdan karşılaştırılmışlardır. Hastaların tedavi sürecinde bulunmaları anti-dsDNA pozitifliğini etkileyebilme ihtimali de ayrı bir kısıtlılık olarak ifade edilebilir. Ancak ilk tanı alan ya da tedavisi yeni planlan olguların değil en az 2 yıl süreli tedavi alan olguların çalışmaya dahil edilmesiyle grup homojenizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır.

Sonuç olarak; ülkemizde anti-dsDNA antikorunu saptayan yöntemleri karşılaştıran yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. İncelenen yöntemler içerisinde klinisyen tarafından SLE ön tanısıyla laboratuvara yönlendirilen ANA pozitif olgularda Anti-dsDNA-Ncx ELISA IgG yöntemi daha yüksek özgüllüğü ve daha yüksek PPD'si ile ön plana çıkmaktadır. Bu çalışma CLIF yöntemiyle çalışılmayan durumlarda hangi ELISA yönteminin kullanılmasının daha faydalı olacağı konusunda yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*, 2000; 53 (6): 424-32.
2. 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): 1271-7.
3. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1997; 40 (9): 1725.
4. Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, Hilton JF, Nakagawa M. Comparison of antibody testing methods: immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. *Clin Diag Lab Immunol*, 1997; 4 (2): 185-8.
5. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*, 1997; 40 (9): 1601-11.
6. Juby AG, Davis P. Prevalence and disease associations of certain autoantibodies in elderly patients. *Clin Invest Med*, 1998; 21 (1): 4-11.

7. Sheil WC Jr, Jason M. Diagnostic associations of patients with antinuclear antibodies referred to community rheumatologists. *J Rheumatol*, 1989; 16 (6): 782-5.
8. Hughes R, Ul-Hassan S. Anti-dsDNA antibodies: their role in the detection and monitoring of SLE. *CLI*, 2006; 7: 12-7.
9. Isenberg DA, Manson JJ, Ehrenstein MR, Rahman A. Fifty years of anti-dsDNA antibodies: are we approaching journey's end? *Rheumatology*, 2007; 46(7): 1052-6.
10. Hahn BH. Antibodies to DNA. *N Engl J Med*, 1998; 338(19): 1359-68.
11. Biesen R, Dahnrich C, Rosemann A, Barkhudarova F, Rose T, Jakop O et al. Anti-dsDNA-NcX ELISA: dsDNA-loaded nucleosomes improve diagnosis and monitoring of disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*, 2011; 13(1): 26.
12. Werle E, Blazek M, Fiehn W. The clinical significance of measuring different anti-dsDNA antibodies by using the Farr assay, an enzyme immunoassay and a *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *Lupus*, 1992; 1: 369-77.
13. Hodinka L, Meretey K, Jancso A, Falus A, Korda J, Bozsoky S. Antibodies to native DNA in connective tissue disease. A comparison of radioimmunoassay, counter immunoelectrophoresis and indirect immunofluorescence on *Crithidia luciliae* substrate. *ArchImmunol Ther Exp*, 1979; 27: 641-6.
14. Holman HR, Kunkel HG. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science*, 1957; 126: 162-3.
15. Friou GJ. Antinuclear antibodies: diagnostic significance and methods. *Arthritis Rheum*, 1967; 10: 151-9.
16. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis*, 2010; 69(8): 1420-2.
17. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum*, 2002; 47(4): 434-44.
18. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*, 1995; 24(5): 323-58.
19. Fritzler MJ. Clinical relevance of autoantibodies in systemic rheumatic diseases. *Mol Biol Rep*, 1996; 23(3-4): 133-45.
20. Sjöwall C, Sturm M, Dahle C, Bengtsson AA, Jönsen A, Sturfelt G et al. Abnormal antinuclear antibody titer are less common than generally assumed in established cases of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 2008; 35(10): 1994-2000.
21. Frodlund M, Dahlström O, Kastbom A, Skogh T, Sjöwall C. Associations between antinuclear antibody staining patterns and clinical features of systemic lupus erythematosus: analysis of a regional Swedish register. *BMJ*, 2013; 3(10): e003608.
22. Suh-Lailam B, Chiaro TR, Davis KW, Wilson AR, Tebo AE. Evaluation of a high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol*, 2011; 4(8): 748-54.
23. Venner AA, Ibanez D, Gladman DD, Urowitz MB, MacKinnon A, Blasutig IM et al. Comparison of three anti-dsDNA assays: Performance and correlation with systemic lupus erythematosus disease activity. *Clinical Biochemistry*, 2013; 46: 317-20.
24. Chiaro TR, Davis KW, Wilson A, Suh-Lailam B, Tebo AE. Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus--implications for inter-laboratory testing. *Clin Chim Acta*. 2011; 412 (11-12): 1076-80.
25. Buzzulini F, Rigon A, Soda P, Onofri L, Infantino M, Arcarese L et al. The classification of *Crithidia luciliae* immunofluorescence test (CLIFT) using a novel automated system. *Arthritis Research Therapy*, 2014; 16: 71.
26. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, Afeltra A, Galeazzi M, Gerli R et al. Diagnostic accuracy of currently available anti-double-stranded DNA antibody assays. *Clin Exp Rheumatol*, 2011; 29(1): 50-6.
27. Andrejevic S, Jeremic I, Bukilica MS, Nikolic M, Stojimirovic B, Nikolic BB. Immunoserological parameters in SLE: high-avidity anti-dsDNA detected by ELISA are the most closely associated with the disease activity. *Clin Rheumatol*, 2013; 32: 1619-26.
28. Compagno M, Jacobsen S, Rekvig OP, Truedsson L, Heegaard NH, Nossent J et al. Low diagnostic and predictive value of anti-dsDNA antibodies in unselected patients with recent onset of rheumatic symptoms: results from a long-term follow-up Scandinavian multicentre study. *Scand J Rheumatol*, 2013; 42(4): 311-6.