



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

ISSN: 1678-4774

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica; Sociedade Brasileira de Patologia; Sociedade Brasileira de Citopatologia

Cavalcante, Elisângela O.; Suzuki, Lisandra A.; Rossi, Claudio Lucio

A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-double-stranded DNA IgG antibodies

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 55, núm. 2, 2019, Março-Abril, pp. 160-169

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica; Sociedade Brasileira de Patologia; Sociedade Brasileira de Citopatologia

DOI: <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20190018>

Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393565098004>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais informações do artigo
- Site da revista em redalyc.org



Sistema de Informação Científica Redalyc

Rede de Revistas Científicas da América Latina e do Caribe, Espanha e Portugal

Sem fins lucrativos acadêmica projeto, desenvolvido no âmbito da iniciativa acesso aberto

Reação imunoenzimática (ELISA) quantitativa para detecção de anticorpos IgG anti-DNA de dupla hélice

A quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of anti-double-stranded DNA IgG antibodies

Elisângela O. Cavalcante; Lisandra A. Suzuki; Claudio Lucio Rossi

Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, São Paulo, Brasil.

RESUMO

Introdução: A detecção de anticorpos contra o ácido desoxirribonucleico (DNA) nativo (ds) é um dos critérios de classificação para o diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico (LES). **Objetivo:** Descrever uma técnica imunoenzimática enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitativa para a detecção de anticorpos imunoglobulina da classe G (IgG) anti-DNAs. **Métodos:** O desempenho da técnica ELISA foi avaliado utilizando o teste de imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae* (CLIFT) como referência. Anticorpos IgG anti-DNAs foram pesquisados por ELISA e CLIFT em amostras de soros de 127 pacientes com LES, 56 pacientes com outras doenças e 37 indivíduos saudáveis. O teste Q de Cochran foi utilizado para comparar as sensibilidades e as especificidades das reações, considerando diferenças significantes entre os testes quando $p \leq 0,05$. **Resultados:** A técnica ELISA apresentou sensibilidade de 92,9% e especificidade de 94,6%, enquanto a sensibilidade e a especificidade da técnica CLIFT foram de 85,8% e 100%, respectivamente. A técnica ELISA apresentou sensibilidade significativamente maior do que a obtida com a técnica CLIFT ($p = 0,0027$); esta apresentou especificidade significativamente maior do que a obtida com a técnica ELISA ($p = 0,0253$). **Conclusão:** A técnica ELISA apresentou excelentes resultados em termos de sensibilidade e especificidade, podendo ser útil em pesquisa e rotina diagnóstica.

Unitermos: lúpus eritematoso sistêmico; anticorpos antinucleares; ensaio de imunoadsorção enzimática; técnica indireta de fluorescência para anticorpo.

ABSTRACT

Introduction: The detection of anti-double-stranded (ds) deoxyribonucleic acid (DNA) antibodies is one of the classification criteria for diagnosing systemic lupus erythematosus (SLE). **Objective:** To describe a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting anti-dsDNA immunoglobulin class G (IgG) antibodies. **Methods:** The performance of ELISA was evaluated using the *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test (CLIFT) as a reference. Anti-dsDNA IgG antibodies were screened by ELISA and CLIFT in serum samples from 127 patients with SLE, 56 patients with other diseases and 37 healthy persons. The Cochran Q test was used to compare the sensitivity and specificity of the reactions, with differences among the results being considered significant when $p \leq 0.05$. **Results:** ELISA had a sensitivity of 92.9% and a specificity of 94.6%, whereas the sensitivity and specificity of CLIFT were 85.8% and 100%, respectively. ELISA was significantly more sensitive than CLIFT ($p = 0.0027$), whereas CLIFT was significantly more specific than ELISA ($p = 0.0253$). **Conclusion:** ELISA showed excellent results in terms of sensitivity and specificity, with a potential use in research and routine diagnostics.

Key words: systemic lupus erythematosus; antinuclear antibodies; enzyme-linked immunosorbent assay; indirect fluorescent antibody technique.

RESUMEN

Introducción: La detección de anticuerpos contra el ácido desoxirribonucleico (ADN) de doble cadena (dc) es uno de los criterios de clasificación para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES). **Objetivo:** Describir una técnica inmunoenzimática (ELISA) cuantitativa para detección de anticuerpos de inmunoglobulina de clase G (IgG) anti-ADNdc. **Métodos:** Se evaluó el desempeño de la técnica ELISA mediante el test inmunofluorescencia indirecta con *Crithidia luciliae* (IFI-CL) como referencia. Anticuerpos IgG anti-ADNdc fueron analizados por ELISA y IFI-CL en muestras de sueros de 127 pacientes con LES, 56 pacientes con otras enfermedades y 37 personas sanas. La prueba Q de Cochran fue utilizada para comparar la sensibilidad y la especificidad de las reacciones considerando diferencias significantes entre los tests cuando $p \leq 0,05$. **Resultados:** La técnica ELISA mostró sensibilidad del 92,9% y especificidad del 94,6%, mientras la sensibilidad y la especificidad de la técnica IFI-CL fueron del 85,8% y 100%, respectivamente. La técnica ELISA mostró sensibilidad significativamente mayor que la obtenida con IFI-CL ($p = 0,0027$); esta mostró especificidad significativamente mayor que la obtenida con ELISA ($p = 0,0253$). **Conclusión:** La técnica ELISA presentó resultados excelentes de sensibilidad y especificidad, con el potencial de ser utilizada en investigación y rutina diagnóstica.

Palabras clave: lupus eritematoso sistémico; anticuerpos antinucleares; ensayo de inmunoadsorción enzimática; técnica del anticuerpo fluorescente indirecta.

INTRODUÇÃO

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença crônica sistêmica autoimune na qual a produção de anticorpos para uma grande variedade de componentes do próprio organismo pode resultar em um amplo espectro de manifestações clínicas e anormalidades laboratoriais⁽¹⁻⁶⁾. Embora a etiologia do LES ainda não seja claramente compreendida, interações genéticas com fatores ambientais têm sido implicadas no desenvolvimento da doença^(5,7-9). Estudos epidemiológicos têm mostrado que o LES pode afetar indivíduos de todas as idades, etnias e ambos os sexos, mas mulheres em idade fértil e certos grupos étnicos (afro-americanos e asiáticos) possuem maior predisposição a desenvolver a doença^(1,6,10).

O diagnóstico de LES baseia-se em achados clínicos e laboratoriais. Na maioria dos casos, o diagnóstico da doença é desafiador por causa do polimorfismo dos sintomas clínicos. A detecção de anticorpos contra o ácido desoxirribonucleico (DNA) nativo (ds) é parte dos critérios de classificação para o diagnóstico de LES^(11, 12). Anticorpos anti-DNAs são geralmente detectados por radioimunoensaio de Farr, teste de imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae* como substrato (CLIFT) e técnica imunoenzimática *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

A técnica de Farr tem características importantes como altas sensibilidade e especificidade e a possibilidade de expressar resultados de forma quantitativa. Porém sua maior desvantagem é a necessidade de usar materiais radioativos. A técnica CLIFT tem alta especificidade, mas em geral tem sensibilidade mais baixa que as técnicas de Farr e ELISA. Outras desvantagens desta técnica são a dificuldade de processar grandes números de amostras, a expressão de resultados semiquantitativos e sua natureza dependente de operador para leitura, o que pode levá-la

à subjetividade na interpretação dos resultados. A técnica ELISA permite o processamento simultâneo de um grande número de amostras, possibilitando a expressão de resultados qualitativos ou quantitativos, além de mostrar sensibilidade relativamente alta comparada com a técnica CLIFT⁽¹³⁻¹⁶⁾. Neste estudo, descrevemos um teste de ELISA quantitativo para detectar anticorpos imunoglobulina da classe G (IgG) anti-DNAs e comparar seu desempenho com o do teste CLIFT, usado como referência.

MÉTODOS

Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou superior e, salvo indicação em contrário, foram obtidos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA).

Padrões séricos

Um *pool* de soro humano positivo para anticorpos IgG anti-DNAs (DNAPo) foi preparado misturando-se partes iguais do soro de 10 pacientes com LES que tinham teste CLIFT positivo $\geq 1:640$. Ao DNAPo foi designado um valor de 100 unidades arbitrárias (UA) de anticorpos por ml. Padrões séricos artificiais contendo diferentes UA/ml foram preparados por diluição do DNAPo com tampão fosfato salino (PBS) contendo 0,1% de Tween 20 (PBS-T). Um *pool* de soro humano negativo para anticorpos IgG anti-DNAs (DNANE) foi preparado misturando-se partes iguais do soro de 10 indivíduos saudáveis que tinham teste CLIFT negativo e nenhuma evidência de LES. Os *pools* DNAPo e DNANE foram usados como controles positivos e negativos nas reações de ELISA e CLIFT.

Determinação das concentrações ótimas dos reagentes

O experimento de ELISA foi padronizado usando-se quantidades em excesso de todos os reagentes, menos daquele sendo testado. Para titulação do antígeno, foram utilizadas quantidades crescentes de DNA de timo de bezerro (0,3 a 100 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Para titulação do conjugado (anticorpos de cabra anti-IgG humana marcados com peroxidase, Sigma Aldrich), foram testadas diluições de 1:500 a 1:64.000.

Linearidade da conversão do substrato

A linearidade da conversão do substrato foi determinada pelo uso de um padrão sérico contendo 50 UA/ml. A taxa de conversão do substrato foi avaliada a diferentes intervalos de tempo de incubação – de 1 a 30 minutos – em temperatura ambiente (TA), no escuro.

O procedimento ELISA

Os poços de fundo arredondado de placas para ELISA (Nunc MaxiSorp®, Thermo Fisher Scientific, EUA) foram preenchidos com 100 µl de tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,5 contendo poli-L-lisina [(PLL), 20 µg/ml] (Sigma-Aldrich). Após incubação da placa por 2 h em TA e de um dia para o outro a 4°C, a solução PLL foi descartada e os poços foram lavados três vezes com 0,15 M PBS, pH 7,4. DNA de timo de bezerro diluído a 20 µg/ml em 0,15 M tampão Tris-HCl/NaCl, pH 8, foi então adicionado aos poços revestidos com PLL (100 µl). Após uma incubação de 3 h 30 min em TA, os poços foram lavados uma vez com PBS-T e os sítios reativos na matriz de poliestireno foram bloqueados com 100 µl PBS-T contendo albumina de soro bovino 0,1% (PBS-T-BSA). Depois de 10 minutos de incubação em TA, os poços foram lavados uma vez com PBS-T e então encheidos com 100 µl de tampão de ácido acético/acetato de sódio 50 mM, pH 4,6, contendo nuclease S1 (40 U/ml) e BSA (5 mg/ml). Seguindo uma incubação de 1 h e 30 min em TA, os poços foram lavados três vezes com PBS-T, e 100 µl de amostras de soro diluídas a 1:200 em PBS-T-BSA foram acrescentadas aos poços. Depois da incubação de 1 h em TA e três lavagens com PBS-T, 100 µl do conjugado diluído a 1:4.000 em PBS-T foram acrescentados a cada poço. Após uma incubação adicional de 45 minutos, em TA e três lavagens com PBS-T, 100 µl do sistema substrato (0,42 mM tetrametilbenzidina e 1,42 mM H₂O₂ em tampão acetato/ácido acético 0,1 M pH 5,5) foram acrescentados aos poços e as placas, incubadas por 10 minutos em TA, no escuro. Passado esse período, as reações foram interrompidas pela adição de 50 µl de 2 N H₂SO₄ a cada poço, e a absorbância resultante foi medida a 450 nm, usando um leitor ELISA (Labsystems, Helsinki, Finlândia). Cada amostra de soro foi testada em triplicata, e os valores de absorbância média foram calculados. Uma diluição seriada com

fator de diluição 2 dos controles padrões positivos (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 UA/ml) foi incluída em cada placa e usada para converter a densidade óptica de cada amostra de soro em UA/ml. O valor de corte para o ensaio foi determinado usando uma *receiver operating characteristic curve* (ROC).

CLIFT

Anticorpos IgG anti-DNAs foram detectados por CLIFT usando kits Immuno Concepts (Immuno Concepts N.A. Ltd, Sacramento, CA, EUA) ou Scimedex (Scimedex Corporation, Dover, NJ, EUA), segundo as instruções do fabricante. Uma titulação de anticorpo CLIFT ≥ 1:10 foi considerada positiva.

Pacientes e controles

Anticorpos IgG anti-DNAs foram pesquisados por ELISA e CLIFT em amostras de soro de 127 pacientes com LES (122 mulheres, cinco homens, idade média = 34 anos), 56 pacientes com outras doenças (36 mulheres, 20 homens, idade média = 48 anos) (artrite reumatoide – $n = 26$; síndrome de Sjögren – $n = 3$; esclerose sistêmica – $n = 3$; mieloma múltiplo – $n = 9$; hepatite A – $n = 4$; hepatite B – $n = 6$; infecção por citomegalovírus (CMV) – $n = 3$; mononucleose infecciosa – $n = 2$) e 37 indivíduos saudáveis (23 mulheres, 14 homens, idade média = 41 anos). Todos os pacientes eram tratados no hospital universitário da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, SP, Brasil. As amostras de soro dos indivíduos saudáveis foram obtidas de estudantes e pessoal do laboratório da Unicamp sem histórico de LES. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM)/Unicamp de acordo com resoluções do Comitê de Ética Brasileiro (CAAE: 45707815.5.0000.5404).

Análise de dados

A acurácia diagnóstica de ELISA e CLIFT foi avaliada pelo coeficiente de $kappa$ (k), utilizando o SAS® System for Windows, versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As variações intra e interensaio foram estudadas no soro padrão contendo 50 UA/ml. Para determinar a variação intraensaio, o padrão foi testado 27 vezes na mesma placa. A variação entre-ensaios foi determinada pela avaliação do padrão sérico em 14 dias alternados. O teste Q de Cochran⁽¹⁷⁾ foi usado para comparar sensibilidade e especificidade das reações. Diferenças entre resultados foram consideradas significantes quando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nas titulações do DNA e conjugado, excesso de antígeno e conjugado foram atingidos em concentrações

> 10 µg/ml e diluições < 1:8.000, respectivamente. Estudos de linearidade mostraram que a taxa de conversão do substrato foi linear por pelo menos 12 minutos para um padrão sérico contendo 50 UA/ml. O teste ELISA foi padronizado usando uma concentração de DNA de 20 µg/ml e uma diluição do conjugado de 1:4.000. A reação foi interrompida 10 minutos após adição do sistema substrato.

Usando o valor de corte determinado pela curva ROC (7,65), ELISA foi positivo em 118 (92,9%) das 127 amostras de soro dos pacientes com LES e negativo em todas as 37 amostras de soro dos indivíduos saudáveis. Vinte e um dos 127 pacientes com LES tinham teste positivo para anticorpos direcionados contra o antígeno Smith (Sm). Embora a frequência de detecção de anticorpos anti-Sm seja baixa, esses anticorpos são altamente específicos para a doença⁽¹⁸⁾. Todos os pacientes com LES com anticorpos anti-Sm também mostraram níveis significantes de anticorpos IgG anti-DNAs por ELISA. A técnica ELISA também foi positiva em cinco (8,9%) dos 56 pacientes com outras doenças: dois com artrite reumatoide [ambos tiveram testes positivos para fator reumatoide e a terceira geração de anticorpos contra peptídeo citrulinado cíclico (CCP3) do isotipo IgG], um com esclerose sistêmica (o paciente tinha teste positivo para topoisomerase 1), um com hepatite B [o paciente tinha teste positivo para antígeno de superfície do vírus de hepatite B (HbsAg)] e um com mononucleose [o paciente tinha testes positivos de imunoglobulina classe M (IgM) e IgG contra antígeno do capsídeo viral do vírus Epstein-Barr (EBV-VCA), com um resultado negativo para o antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr (EBNA)]. Nenhum desses cinco pacientes tinha evidência clínica de LES. Outros estudos detectaram reações positivas a anticorpos IgG anti-DNAs por ELISA em pacientes com artrite reumatoide⁽¹⁹⁻²¹⁾, esclerose sistêmica^(15, 22), hepatite B⁽²³⁾ e mononucleose^(15, 20).

O teste CLIFT foi positivo (títulos $\geq 1:10$) em 109 (89%) das 127 amostras de pacientes com LES, e negativo em todas as 56 amostras de pacientes com outras doenças e nas 37 amostras de indivíduos saudáveis. Nove pacientes com LES tinham resultado de anticorpo IgG anti-DNAs positivo com ELISA e negativo com CLIFT. Com base na história clínica, esses nove pacientes tiveram o diagnóstico de LES confirmado, segundo os critérios do American College of Rheumatology (ACR). Nove pacientes com LES não tiveram anticorpos IgG anti-DNAs detectados nem por CLIFT nem por ELISA. Todos esses nove pacientes estavam sob terapia imunossupressora na época da coleta do soro.

ELISA e CLIFT mostraram alta acurácia diagnóstica, com valores de k de 0,87 e 0,84, respectivamente. Os coeficientes de variação intra e interensaio de ELISA foram 3,1% e 9,6%, respectivamente.

Os resultados obtidos com ELISA e CLIFT para detectar anticorpos IgG anti-DNAs são mostrados na **Tabela**. Em resumo, ELISA mostrou sensibilidade de 92,9% e especificidade de 94,6%, enquanto CLIFT mostrou sensibilidade e especificidade de 85,8% e 100% respectivamente. Com base na análise estatística: 1. ELISA teve sensibilidade significativamente maior que CLIFT ($p = 0,0027$); 2. CLIFT teve especificidade significativamente maior que ELISA ($p = 0,0253$).

O método ELISA descrito aqui foi padronizado levando-se em conta duas exigências para uma técnica quantitativa, isto é: 1. todos os reagentes, exceto aquele em teste (os anticorpos, neste caso), estavam presentes em excesso; 2. a atividade enzimática foi medida durante a porção linear inicial da reação, quando a taxa de conversão do substrato era diretamente proporcional à concentração do anticorpo. Além disso, o uso de uma curva padrão para determinar a concentração de anticorpos anti-DNAs e a subsequente expressão de resultados em unidades arbitrárias de anticorpos reduziram acentuadamente a variabilidade dos achados^(24, 25).

A literatura mostra grande variação no desempenho de testes ELISA para anticorpos IgG anti-DNAs, com sensibilidade variando entre 19% e 98% e especificidade entre 73% e 99%^(15, 18, 19, 26-29). O ELISA descrito neste trabalho mostrou excelente desempenho, com 92,9% de sensibilidade e 94,6% de especificidade. Variações no desempenho de reações sorológicas usadas para detectar anticorpos IgG anti-DNAs são esperadas e provavelmente relacionadas com vários fatores, como a heterogeneidade dos pacientes incluídos no estudo, a condição imunológica do paciente no momento de sua participação no estudo, as propriedades intrínsecas das técnicas usadas para pesquisa de anticorpos, a preparação antigênica, a diversidade de anticorpos produzidos pelos pacientes e o método de calcular o valor de corte.

CONCLUSÃO

O excelente desempenho do teste ELISA descrito neste trabalho torna-o uma ferramenta potencialmente útil para a detecção de anticorpos IgG anti-DNAs em pesquisa e rotina diagnóstica.

TABELA – Resultados de ELISA e CLIFT em pacientes com LES, pacientes com outras doenças e indivíduos saudáveis

	ELISA				CLIFT	
	Pacientes com LES ($n = 127$)	Pacientes com outras doenças ($n = 56$)	Indivíduos saudáveis ($n = 37$)	Sen (%)	Spe (%)	Sen (%)
$\bar{x}$	44,3	4,35	4,4			
V	(3,25-100)	(0,78-16,2)	(1,66-7,47)	92,9	94,6	85,8
						100

ELISA: técnica imunoenzimática enzyme-linked immunosorbent assay; CLIFT: teste de imunofluorescência indireta com *Crithidia luciliae* como substrato; LES: lúpus eritematoso sistêmico; Sen: sensibilidade; Esp: especificidade; $\bar{x}$: média aritmética (UA/ml); V: variação (valores mínimos e máximos, em UA/ml); AU: unidades arbitrárias.

REFERÊNCIAS

1. Cojocaru M, Cojocaru IM, Silosi I, Vrabie CD. Manifestations of systemic lupus erythematosus. *Maedica (Buchar)*. 2011; 6: 330-6.
2. Askanase A, Shum K, Mitnick H. Systemic lupus erythematosus: an overview. *Soc Work Health Care*. 2012; 51: 576-86.
3. Fortuna G, Brennan MT. Systemic lupus erythematosus: epidemiology, pathophysiology, manifestations, and management. *Dent Clin North Am*. 2013; 57: 631-55.
4. Yaniv G, Twig G, Shor DB, et al. A volcanic explosion of autoantibodies in systemic lupus erythematosus: a diversity of 180 different antibodies found in SLE patients. *Autoimmun Rev*. 2015; 14: 75-9.
5. Kaul A, Gordon C, Crow MK, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2: 16039.
6. Pons-Estel GJ, Ugarte-Gil MF, Alarcón GS. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev Clin Immunol*. 2017; 13: 799-814.
7. Kamen DL. Environmental influences on systemic lupus erythematosus expression. *Rheum Dis Clin N Am*. 2014; 40: 401-12.
8. Tsokos GC, Lo MS, Costa Reis P, Sullivan KE. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 716-30.
9. Chen L, Morris DL, Vyse TJ. Genetic advances in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol*. 2017; 29: 423-33.
10. Carter EE, Barr SG, Clarke AE. The global burden of SLE: prevalence, health disparities and socioeconomic impact. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12: 605-20.
11. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982; 25: 1271-7.
12. Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012; 64: 2677-86.
13. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*. 2000; 53: 424-32.
14. Rouquette AM, Desgruelles C. Detection of antibodies to dsDNA: an overview of laboratory assays. *Lupus*. 2006; 15: 403-7.
15. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the Crithidia luciliae immunofluorescence test. *Lupus*. 2010; 19: 906-12.
16. Pavlovic M, Kats A, Cavallo M, Chen R, Hartmann JX, Shoenfeld Y. Pathogenic and epiphenomenal anti-DNA antibodies in SLE. *Autoimmune Dis*. 2010; 2011: 462841.
17. Fleiss JL. Statistical methods for rates and proportions. 3rd ed. New York (NY): John Wiley & Sons Ltd.; 1981.
18. Cozzani E, Drosera M, Gasparini G, Parodi A. Serology of lupus erythematosus: correlation between immunopathological features and clinical aspects. *Autoimmune Dis*. 2014; 14: 321359.
19. Haugbro K, Nossent JC, Winkler T, Figenschau Y, Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies and disease classification in antinuclear antibody positive patients: the role of analytical diversity. *Ann Rheum Dis*. 2004; 63: 386-94.
20. Attar SM, Koshak EA. Medical conditions associated with a positive anti-double-stranded deoxyribonucleic acid. *Saudi Med J*. 2010; 31: 781-7.
21. Enocsson H, Sjöwall C, Wirestam L, et al. Four anti-dsDNA antibody assays in relation to systemic lupus erythematosus disease specificity and activity. *J Rheumatol*. 2015; 42: 817-25.
22. Villalta D, Bizzaro N, Bassi N, et al. Anti-dsDNA isotypes in systemic lupus erythematosus: IgA in addition to IgG anti-dsDNA help to identify glomerulonephritis and active disease. *PLoS One*. 2013; 8(8): e71458.
23. Acay A, Demir K, Asik G, Tunay H, Acarturk, G. Assessment of the frequency of autoantibodies in chronic viral hepatitis. *Pak J Med Sci*. 2015; 31: 150-4.
24. Hancock K, Tsang VC. Development and optimization of the FAST-ELISA for detecting antibodies to *Schistosoma mansoni*. *J Immunol Methods*. 1986; 92: 167-76.
25. Maddison SE. The present status of serodiagnosis and seroepidemiology of schistosomiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1987; 7: 93-105.
26. Kavanaugh AF, Solomon DH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-DNA antibody tests. *Arthritis Rheum*. 2002; 47: 546-55.
27. Janyapoon K, Jivakanont P, Choosang K, Surbrsing R, Charoenying V, Baithong S. Comparative study of anti-double stranded DNA detection by ELISA and *Crithidia luciliae* immunofluorescence. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003; 34: 646-50.
28. Riboldi P, Gerosa M, Moroni G, et al. Anti-DNA antibodies: a diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity*. 2005; 38: 39-45.
29. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, et al. Evaluation of current methods for the measurement of serum anti-double-stranded DNA antibodies. *Ann Sci Acad Sci*. 2007; 1109: 401-6.

AUTOR CORRESPONDENTE

Claudio Lucio Rossi  0000-0001-7268-3515
e-mail: clr@fcm.unicamp.br



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.