



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

“COMPARACIÓN DE UN MÉTODO DE
QUIMIOLUMINISCENCIA VERSUS
ELISA PARA LA BÚSQUEDA DE
ANTICUERPOS ANTI-Sm, EN APOYO
AL DIAGNÓSTICO DEL LUPUS
ERITEMATOSO SISTÉMICO”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN INMUNOLOGÍA.

NATALIA LETICIA RODRIGUEZ SISNIEGA

LIMA - PERÚ

2023

ASESOR

Doctor en Bioquímica y Biología Molecular,

Victor Neyra Chagua.

JURADO DE TESIS

MG. ALFREDO ENRIQUE BERROCAL KASAY

PRESIDENTE

MG. WILLY MANUEL CERÓN TELLO

VOCAL

MG. JOSÉ LUIS ROJAS VILCA

SECRETARIO

DEDICATORIA.

A mi padre que me despertó la curiosidad científica.

AGRADECIMIENTOS.

A mi marido e hijos por su infinita paciencia, durante
las circunstancias desafiantes del año 2020
que fueron el motor para cumplir este sueño.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

Asociación Española Primera de Socorros Mutuos
y el laboratorio Bidiagnóstico
como proveedores de los reactivos
en la rutina laboral.

COMPARACIÓN DE UN MÉTODO DE QUIMIOLUMINISCENCIA VERSUS ELISA PARA LA BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS ANTI-Sm, EN APOYO AL DIAGNÓSTICO DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|----|
| 1 | www2.rmu.org.uy Fuente de Internet | 1% |
| 2 | autoimmunhighlights.biomedcentral.com Fuente de Internet | 1% |
| 3 | advancesinrheumatology.biomedcentral.com Fuente de Internet | 1% |
| 4 | Jordan J. Baechle, Nan Chen, Priya Makhijani, Shawn Winer, David Furman, Daniel A. Winer. "Chronic inflammation and the hallmarks of aging", Molecular Metabolism, 2023 Publicación | 1% |
| 5 | www.degruyter.com Fuente de Internet | 1% |
| 6 | Tammo E. Brunekreef, Leon C. Reteig, Maarten Limper, Saskia Haitjema et al. "Microarray analysis of autoantibodies can | 1% |

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

| | |
|-------------------------------------|----|
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. HIPÓTESIS | 4 |
| III. OBJETIVOS..... | 5 |
| IV. METODOLOGÍA..... | 6 |
| V. RESULTADOS..... | 14 |
| VI. DISCUSIÓN | 21 |
| VII. CONCLUSIONES..... | 23 |
| VIII. RECOMENDACIONES..... | 25 |
| IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 26 |

RESUMEN

Los Anticuerpos (Ac.) Anti-Sm son específicos para el diagnóstico de Lupus eritematoso sistémico (LES) pero infrecuentes. Frente a una enfermedad autoinmune sistémica probable varias guías recomiendan un protocolo escalonado de estudio, que en la práctica clínica no siempre se cumple. El laboratorio de la “Asociación Española” (Montevideo-Uruguay), comenzó a utilizar el método de quimioluminiscencia (CLIA), observando en ocasiones reactividades Anti-Sm no esperadas. Los objetivos fueron determinar el “cut-off” óptimo del método de CLIA y comparar su desempeño diagnóstico con el ELISA para Ac. Anti-Sm. Se comparó el “cut-off” del CLIA con respecto al ELISA e Inmunofluorescencia indirecta (IFI, ANA HEp-2) utilizando un material de referencia. Se determinaron los Ac. Anti-Sm por método de CLIA y ELISA en 40 sueros de pacientes. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), negativo (VPN) y el “cut-off” óptimo del CLIA (curva ROC). Se calculó el χ^2 , el coeficiente kappa (Cohen) y el R² entre el CLIA y el ELISA. Los “cut-off” hallados fueron: IFI 1/4096, CLIA 1/1024 y ELISA 1/512. La sensibilidad del CLIA y ELISA fue 95%, y la especificidad: 93% y 100% respectivamente; El VPP del CLIA y ELISA: 76% y 100%, y el VPN 93% y 95%. respectivamente. El “cut-off” óptimo del CLIA fue 41.5 CU (Sensibilidad 85% y Especificidad 95%), el χ^2 de 18.2 (p: < 0.01), el coeficiente kappa de 65% (p: < 0.01) y un coeficiente R² de 0,83 (p: 1,92 x 10⁻¹⁶). El CLIA puede ser utilizado como una alternativa al ELISA para la búsqueda de Ac. Anti-Sm ajustando el “cut off” del método a la población de cada laboratorio utilizando el método IFI, ANA HEp-2 en paralelo o en forma escalonada.

PALABRAS CLAVE:

CLIA, ELISA, IFI (ANA-HEp-2), Anticuerpos Anti-Sm, Lupus Eritematoso Sistémico.

ABSTRACT

Anti-Sm Antibody (Ab.) is a specific marker for Systemic Lupus Erythematosus, although unusual. Several guidelines recommend a phased study protocol if a systemic autoimmune disease is suspected, although in clinical practice this is not always fulfilled. The “Asociación Española”’s laboratory (Montevideo-Uruguay) started to use the chemiluminescence method (CLIA) for Anti-Sm determination and sometimes unexpected reactivities were observed. The aim was determine the CLIA’s optimal cut-off and compare it’s diagnostic performance against the ELISA method for Anti-Sm Ab. The CLIA’s and ELISA’s cut-off for Anti-Sm Ab. were compared with the HEp-2 indirect immunofluorescence (IIF) method using a reference material. Sera from 40 patients were screened for Anti-Sm Ab by CLIA and ELISA methods. Sensitivity, specificity, negative (NPV) and positive predictive values (PPV) for the CLIA method for Anti-Sm Ab optimal cut-off were calculated as well (ROC plots). The association and the degree of agreement between ELISA and CLIA methods were evaluated (chi² and Cohen’s kappa coefficient respectively) as the R² coefficient was also calculated. The cut off values of the three methods were: 1/4096 IIF, 1/1024 CLIA and 1/512 ELISA. The CLIA and ELISA sensitivities were equal (95%) while the specificities were 93% y 100% respectively; PPV and NPV for CLIA method were 76% and 93%, and for ELISA 100% and 95%. The optimal cut-off for CLIA method was 41.5 CU (85% sensitivity and 95% specificity). The chi² value was 18.2, p: < 0.01, the Cohen’s kappa coefficient: 65%, p: < 0.01, and the R² coefficient: 0.83 (p: 1,92 x 10⁻¹⁶). Anti-Sm Ab by CLIA method can be used adjusting the cut-off value for

each laboratory population, using IIF method in parallel or using a stepped protocol.

KEY WORDS:

CLIA, ELISA, IIF (ANA-HEp-2), Anti-Sm Antibody, Systemic Lupus Erythematosus.

I. INTRODUCCIÓN:

Los Ac. Anti-Sm son auto-anticuerpos dirigidos contra antígenos ubicados en las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), específicamente frente a las proteínas B/B', D1, D2, D3, E, F y G. Estas snRNPs son moléculas de ARN que junto a otras proteínas forman el "spliceosoma", estructura encargada del corte y empalme del pre ARN mensajero.

Los Ac. Anti-Sm producidos durante la respuesta autoinmune están dirigidos fundamentalmente contra las proteínas B/B', D1 y D3 (1). Estos Ac. pertenecen a un grupo denominado Ac. Anti antígenos extraíbles del núcleo (ENA) (1)(2)(3), siendo muy específicos para el diagnóstico del Lupus eritematoso sistémico (LES) pero solo se detectan en 15 a 30% de los pacientes y raramente en personas normales (3).

En los pacientes con sospecha de Enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS) varios consensos y guías, tanto nacionales como internacionales recomiendan comenzar el estudio con la determinación de los Ac. Antinucleocitoplasmáticos sobre el sustrato celular HEp-2 (ANA-HEp-2) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) basados en su alta sensibilidad, y posteriormente si los ANA-HEp-2 son positivos a títulos significativos ($\geq 1/160$) pasar a identificar al Ac. involucrado mediante la búsqueda de ENA y Ac. anti DNAds (4) (5–10).

Con respecto a los criterios de clasificación del LES en el año 2019 la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) y el Colegio Americano de Reumatología (ACR) unieron esfuerzos con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de los criterios de clasificación ya existentes (ACR 1982, revisados

en 1997 y las Clínicas de Colaboración Internacional del LES (SLICC) 2012) incluyeron al resultado positivo de los ANA-HEp-2 con un título $\geq 1/80$ como criterio de entrada para la clasificación del LES (10).

En la práctica clínica no siempre se sigue este protocolo y si el médico clínico lo solicita se pueden realizar los ENA a pesar del ANA-HEp-2 negativo o con bajos títulos(1/80), observando en ocasiones reactividades de Anti Sm aisladas que pueden generar confusión, tratamientos inadecuados y gastos médicos innecesarios en el paciente.

Existen varios métodos para la determinación de ENA de uso habitual en los laboratorios clínicos (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima o ELISA, inmunoensayo de quimioluminiscencia o CLIA, Inmunoblot, etc) que difieren en términos de desempeño diagnóstico, valores de referencia, sustrato antigénico utilizado entre otras características, siendo el ELISA el método más utilizado, no existiendo hasta el momento un método de referencia (11)(12)(13).

En el año 2020 el laboratorio de Inmunología de la “Asociación Española 1° de Socorros Mutuos” (AEPSM) (institución privada de atención médica) de la ciudad de Montevideo (Uruguay) comenzó a utilizar el método de CLIA para la determinación de Ac. Anti ENA, sustituyendo al ELISA clásico.

La tecnología de CLIA en los ensayos inmunológicos entre otras características incorpora como fase sólida perlas paramagnéticas, como estrategia de separación de los inmunocomplejos formados en la reacción, con alta capacidad de unión de los Ac. aumentando más la sensibilidad analítica con respecto al ELISA

convencional (14). Más aún, hay autores que reportan una alta especificidad del método CLIA en comparación con la IFI para la búsqueda de ANA-HEp-2 (12).

Justificación:

Desde el advenimiento del método CLIA en el laboratorio de la AEPSM se han evidenciado casos aislados de pacientes con resultados positivos discordantes “no esperados” de Ac. Anti-Sm, definiendo como tales aquellos resultados con ANA-HEp-2 negativos (4) (11).

Frente a esta problemática surgen las siguientes preguntas de investigación:

¿El desempeño diagnóstico del método de CLIA es comparable con el método de ELISA para la búsqueda de Ac. Anti-Sm?

¿En apoyo al diagnóstico certero de LES, el límite de detección del método de **CLIA** es comparable al método de **ELISA** y con respecto al resultado positivo de tamizaje de la **IFI (ANA-HEp-2)** para la búsqueda de Anticuerpos Anti-Sm?

¿Cómo debe proceder el laboratorio frente a resultados “no esperables” de Autoanticuerpos como los Anti-Sm cuando recientemente se implementó una metodología nueva para su detección en un laboratorio de rutina?

II. HIPÓTESIS:

El desempeño diagnóstico del método de CLIA es comparable al método de ELISA, mientras que el "cut off" del método de CLIA será menor al "cut off" de los ANA-HEp-2 por IFI y del ELISA.

III. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Determinar el desempeño diagnóstico y el cut off óptimo del método de CLIA para la búsqueda de Ac. IgG Anti-Sm.

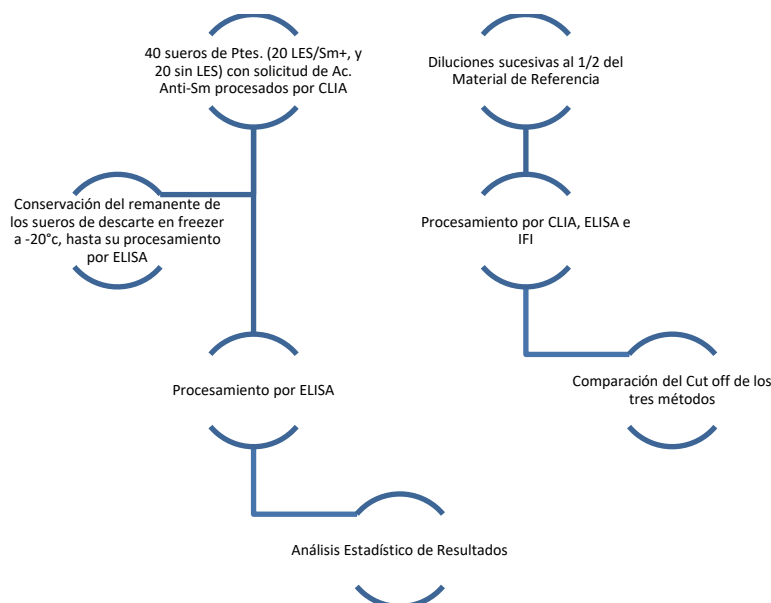
Objetivos específicos:

- a. Determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) así como el cut off óptimo de la prueba de CLIA para Ac. Anti-Sm.
- b. Comparación del límite de detección entre los métodos CLIA y ELISA, y con respecto al resultado positivo de tamizaje de la **IFI**, ANA-HEp-2.

IV. METODOLOGÍA:

1. Diseño del Estudio:

El presente trabajo es un estudio transversal, analítico de prueba diagnóstica.



2. Población y muestras de estudio:

Para el presente trabajo se utilizaron muestras remanentes de suero de 40 pacientes (tabla 1) de los cuales 20 presentaban diagnóstico de LES según criterios de ACR/EULAR 2019 y antecedentes de Ac. Anti-Sm positivos [LES/Sm+], y 20 fueron seleccionados como controles sin LES (10 presentaban otra EAS y 10 sin EAS) que fueron derivados oportunamente por el médico tratante, para la extracción de sangre y su procesamiento, al laboratorio de inmunología de la AEPSM, con la solicitud de Ac. Anti ENA por método de CLIA. Una vez que fueron procesados por este

método, los remanentes de descarte de los sueros, fueron conservados en freezer a -20°C hasta el momento de su procesamiento por el método de ELISA. Un 80% de estas muestras remanentes ya habían sido conservadas en freezer a -20°C para otro fin (controles internos de calidad de la rutina del laboratorio). El período de recolección de las muestras fue desde Enero 2020 a Julio 2022.

Tabla 1. Dato clínico, sexo y edad de la población control y población con LES/Ac. Anti Sm + (n:40)

| Nº Codificación | Sexo | Edad (años) | Dato Clínico | Nº Codificación | Sexo | Edad (años) | Dato Clínico |
|-----------------|------|-------------|--------------|-----------------|------|-------------|--------------|
| 1 | F | 78 | Control | 21 | F | 67 | LES |
| 2 | F | 36 | Control | 22 | F | 34 | LES |
| 3 | F | 47 | Control | 23 | F | 52 | LES |
| 4 | F | 63 | Control | 24 | F | 58 | LES |
| 5 | F | 65 | Control | 25 | F | 37 | LES |
| 6 | F | 58 | Control | 26 | F | 39 | LES |
| 7 | F | 66 | Control | 27 | F | 29 | LES |
| 8 | F | 52 | Control | 28 | F | 58 | LES |
| 9 | F | 46 | Control | 29 | F | 29 | LES |
| 10 | M | 71 | Control | 30 | F | 43 | LES |
| 11 | F | 71 | EMTC | 31 | F | 29 | LES |
| 12 | M | 57 | ED | 32 | F | 29 | LES |
| 13 | F | 64 | PM | 33 | F | 62 | LES |
| 14 | F | 63 | SJOGREN | 34 | F | 29 | LES |
| 15 | F | 72 | SJOGREN | 35 | F | 21 | LES |
| 16 | F | 34 | EPID | 36 | F | 47 | LES |
| 17 | F | 53 | PAR | 37 | F | 37 | LES |
| 18 | F | 62 | SJOGREN | 38 | F | 24 | LES |
| 19 | M | 71 | VASCULITIS | 39 | F | 18 | LES |
| 20 | F | 48 | ARTRITIS | 40 | F | 36 | LES |

3. Materiales y Reactivos:

Para la determinación de los Ac. Anti-Sm por el método de CLIA, ELISA y ANA-HEp-2 por IFI se utilizaron reactivos de la marca comercial “QUANTA Flash”, “QUANTA Lite” y “NOVA Lite, HEp-2 Select” respectivamente, del laboratorio “INOVA Diagnostics”, San Diego, California-USA.

Con el fin de realizar la comparación de los “cut off” entre los métodos de CLIA, ELISA e IFI (ANA-HEp-2), se adquirió un material de referencia de Ac. Anti-Sm provisto por el “Autoantibody standarization Committee”

Florida-USA, CAT#: IS2076: [Anti-Sm \(nuclear large/coarse speckled pattern AC-5\)](#).

4. Operacionalización de variables:

a. Ac. Anti Sm:

-Definición operacional: La búsqueda de Ac. Anti-Sm (Tabla 2) se realizará por diferentes métodos de inmunoensayo que se basan en revelar la presencia de Ac. IgG Anti-Sm en el suero del paciente mediante un conjugado formado por un Ac. dirigido a las IgG humanas, unido a distintas sustancias según el método utilizado (enzimas-método de ELISA, sustancia quimioluminiscente-método de CLIA y sustancia fluorescente-método de IFI). El Antígeno (Ag) Sm se encuentra fijo en una fase sólida (Ag. Recombinante humano en el fondo del pocillo de ELISA, Ag purificado nativo unido a la superficie de micropartículas paramagnéticas en el método de CLIA, Ag en su estado nativo en un sustrato celular proveniente de una línea de carcinoma laríngeo humano o HEp-2, fijo a una lámina en el método de IFI). La reacción se evidencia mediante la adición de un sustrato cromógeno de la enzima en el ELISA generando un color, por la aplicación de una sustancia iniciadora de la reacción o “trigger” generando emisión de luz de la sustancia quimioluminiscente en el método de CLIA o mediante la emisión de fluorescencia bajo un microscopio de fluorescencia en el método de IFI. La luz generada en el método de CLIA se extrapola a una curva de calibración y los resultados son expresados en unidad de quimioluminiscencia (CU), con respecto al

ELISA se lee la densidad óptica (OD) del color generado luego de parar la reacción con un ácido fuerte, mediante un espectrofotómetro, calculando el resultado por regla de tres con la OD de un control “cut off” con concentración conocida de Ac. Anti-Sm expresado en unidades por mililitro (U/ml) y con respecto a la IFI el resultado será expresado como la fracción de la dilución realizada (título) del suero en caso de evidenciarse fluorescencia. Se realizará el procesamiento de los sueros y el material de referencia siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un resultado se considera positivo para el método de CLIA cuando el valor es igual o mayor a 20 CU), y para el método de ELISA un valor igual o mayor a 20 U/ml según recomendación del fabricante. Para los ANA-HEp-2 por IFI se considera un resultado positivo la presencia de fluorescencia con un patrón moteado grueso a partir de la dilución de tamizaje de 1/80.

b. Edad:

Ver tabla 2.

c. Sexo:

Ver tabla 2.

| Tabla 2. Variables del Estudio | | | | | | |
|---------------------------------------|--|--|--|-------------------------|------------------------|-----------------|
| Variable | Definición conceptual | Tipo | Indicadores | Rango de valores | Valor "Cut off" | Unidades |
| Ac. Anti Sm | Son Auto-Anticuerpos (Ac) dirigidos contra antígenos de las ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs), integran el grupo de Ac. Anti antígenos extralibres del núcleo (ENA) (1)(2)(3). | Semicuantitativa/ Continúa/ Cualitativa | Marcador Especifico de LES (método CLIA) | 3,3 a 693,5 | ≥ 20 (Positivo) | CU |
| | | | Marcador Especifico de LES (método ELISA) | 1 a > 80 | ≥ 20 (Positivo) | U/mL |
| | | Semicuantitativa/ Cualitativa | Marcador Sensible de Ac. Anti ENA (método IFI, ANA-HEp 2)* | 1/80 a 1/5120 | ≥ 1/80 (Positivo) | Título |
| Edad | años de vida de los participantes del estudio. | Cuantitativa/Continúa | - | 18 o más | - | años |
| Sexo | género de los participantes del estudio. | Cualitativa | - | Masculino/Femenino | - | - |

(*Característicamente observado como un Patrón Moteado, aunque si se presentara un patrón Homogéneo podría quedar solapado bajo el microscopio de inmunofluorescencia.)

5. Procedimiento y técnicas:

- a.** Para la determinación de la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) así como el punto de corte óptimo o “cut off” de la prueba de CLIA para Anti-Sm se descongelaron y procesaron por método de ELISA los 40 sueros de pacientes con LES/Sm+ y de la población control.

- b.** Para la comparación del límite de detección entre los métodos CLIA y ELISA con respecto al resultado positivo de tamizaje de la IFI (ANA-HEp-2) (NOVA Lite, HEp-2 Select), se determinaron los valores de Ac. Anti-Sm por método de CLIA y ELISA del material de referencia, en estado puro y diluido al medio sucesivamente, comparándolos con la fluorescencia de punto de corte por el método de IFI (ANA-HEp-2) entendiéndose este como el título máximo al que se observa un resultado positivo, por encima del cual se deja de evidenciar fluorescencia con el característico patrón moteado grueso que se observa frente a una reactividad de Ac. Anti-Sm. Se procedió a realizar diluciones sucesivas al medio hasta su negativización frente a un resultado positivo por método de CLIA y ELISA.

El procesamiento de muestras por el método CLIA fue realizado en un equipo de inmunoensayo automatizado de la marca Bio-Flash® (Inova Diagnostics Inc.). Con respecto al procedimiento del método de ELISA se utilizaron, un lavador de placa (Pw40) y un lector o espectrofotómetro

(PR4100) de la marca BIORAD. La lectura de las láminas de IFI (ANA HEp-2) se realizó en un microscopio de Inmunofluorescencia, Axioscope 5 (ZEISS). Las muestras fueron procesadas junto con los controles positivos y negativos de cada kit, y luego de realizar la calibración correspondiente en el caso del método de CLIA. Los procedimientos técnicos de cada método fueron realizados según recomendaciones de los fabricantes de reactivos, siendo descritos con detalle en la sección: definición operacional de la variable Ac. Anti-Sm.

6. Consideraciones éticas:

- El presente estudio fue aprobado por los comités de Ética de la AEPSM y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las muestras remanentes de suero de los pacientes se utilizaron con el único fin de llevar a cabo la comparación de los métodos analíticos y no se realizó otra determinación analítica diferente a la solicitada por el médico tratante. El estudio es de gran interés y beneficio para la AEPSM, en particular para los pacientes y médicos de la policlínica de Autoinmunidad y conlleva una mejora en la calidad del resultado. El estudio implica riesgos mínimos o nulos para los participantes, por las características de diseño (comparación de métodos analíticos dentro de un laboratorio, sin ninguna intervención en los pacientes). Se preservó el anonimato de los datos de identificación de los pacientes y se veló por el cumplimiento de los criterios de respeto, beneficencia/no maleficencia y justicia de acuerdo con las normas de ética en la investigación humana. Solo se utilizaron datos demográficos como

sexo, edad y condición diagnóstica con el fin del análisis de los resultados, sin exponer ninguna otra información que los identifique. Para ello se codificaron los datos durante su recolección y luego se trabajó con números arábigos pareados a la muestras (1 al 40).

- Finalizado el estudio y una vez que el jurado evaluador lo apruebe, se descartarán los remanentes de sueros y no serán utilizados para otras investigaciones. Se coordinará una instancia de devolución de los resultados a los médicos de la policlínica de enfermedades autoinmunes de la AEPSM.

7. Análisis estadístico:

Se calculó la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN del método de ELISA y CLIA tomando como “método de referencia” para la determinación de los Ac. Anti Sm al método de ELISA, elegido como tal por ser la técnica habitual y más utilizada para su determinación hasta el advenimiento del método CLIA y por no existir una técnica de referencia para Ac. Anti-Sm hasta el momento.

Además se calculó el coeficiente kappa de Cohen para analizar el grado de acuerdo entre el método de CLIA y el ELISA y se realizó el análisis de Chi ² de Pearson para observar la asociación estadística entre los resultados de ambos métodos así como el cálculo del coeficiente de determinación (R²).

Se determinó el “Cut off” óptimo en términos de sensibilidad y especificidad del método de CLIA para Anti-Sm mediante el análisis de la curva “receiving operating characteristic” ROC (15)(16).

El procesamiento de datos se realizó con el programa Excel de la aplicación Office (Microsoft) y el programa SPSS (IBM).

V. RESULTADOS:

Se recibieron en el sector de inmunología del laboratorio de la AEPSM 1227 sueros de pacientes con solicitud de Ac. Anti-Sm por método de CLIA, de los cuales 39 (3,2%) arrojaron resultados positivos, 1187 (96,7%) negativos, y 1 (0,1%) muestra no fue procesada por tener cantidad insuficiente. De las 1227 muestras se seleccionaron 20 de pacientes con LES/Sm+ y 20 de población control (con EAS y sin EAS). El promedio de edad de los 40 pacientes fue de 48,9 años con una proporción mujer: hombre de 12:1.

En la tabla 3 y 4 se muestran y describen los resultados de los Ac. Anti-Sm por CLIA, ELISA e IFI.

Tabla 3. Ac. Anti-Sm (CLIA/ELISA) y ANA en población control vs. población con LES/Sm+.

| nº | Controles s/EAS | | Dato Clínico | ANA |
|----|-----------------|--------------|--------------|------------------|
| | CLIA (CU) | ELISA (U/mL) | | |
| 1 | <3,3 | 2,3 | Control | Negativo |
| 2 | <3,3 | 3,4 | Control | Negativo |
| 3 | <3,3 | 3,5 | Control | Negativo |
| 4 | <3,3 | 1,6 | Control | Negativo |
| 5 | <3,3 | 2,4 | Control | Negativo |
| 6 | <3,3 | 10,1 | Control | Negativo |
| 7 | <3,3 | 3,1 | Control | Negativo |
| 8 | 10 | 4,3 | Control | Negativo |
| 9 | 102 | 5,8 | Control | Negativo |
| 10 | 41 | 8,5 | Control | Negativo |
| nº | Controles c/EAS | | Dato Clínico | ANA |
| 11 | <3,3 | 3,1 | | |
| 12 | <3,3 | 1,6 | ED | Negativo |
| 13 | <3,3 | 5,6 | PM | Homogéneo 1/640 |
| 14 | <3,3 | 3,1 | SJOGREN | Moteado 1/160 |
| 15 | <3,3 | 5,9 | SJOGREN | Moteado 1/320 |
| 16 | 34,8 | 12,1 | EPID | Moteado 1/80 |
| 17 | <3,3 | 3,5 | PAR | Moteado 1/640 |
| 18 | <3,3 | 2,8 | SJOGREN | Moteado 1/2560 |
| 19 | 41 | 8,5 | VA SCULITIS | Negativo |
| 20 | 27 | 9,2 | ARTIRITIS | Negativo |
| nº | Casos | | Dato Clínico | ANA |
| 21 | 32,0 | 37,8 | | |
| 22 | 609,0 | 100,6 | LES | Moteado 1/160 |
| 23 | 63,0 | 67,9 | LES | Moteado 1/2560 |
| 24 | 42,0 | 33,8 | LES | Homogéneo 1/2560 |
| 25 | >693,5 | 125,6 | LES | Moteado 1/5120 |
| 26 | 115,6 | 63,7 | LES | Moteado 1/2560 |
| 27 | >693,5 | 120,9 | LES | Moteado 1/2560 |
| 28 | >693,5 | 130,1 | LES | Moteado 1/2560 |
| 29 | 74,0 | 60 | LES | Moteado 1/2560 |
| 30 | 483,0 | 96,1 | LES | Moteado 1/640 |
| 31 | >693,5 | 121,8 | LES | Moteado 1/2560 |
| 32 | >693,5 | 146,1 | LES | Homogéneo 1/5120 |
| 33 | 18,0 | 47,3 | LES | Homogéneo 1/160 |
| 34 | >693,5 | 169,4 | LES | Homogéneo 1/5120 |
| 35 | 313,0 | 125,6 | LES | Homogéneo 1/2560 |
| 36 | 599,0 | 108,1 | LES | Moteado 1/5120 |
| 37 | 76,0 | 46,5 | LES | Homogéneo 1/640 |
| 38 | 57,0 | 5,1 | LES | Homogéneo 1/640 |
| 39 | 59,0 | 24,7 | LES | Moteado 1/320 |
| 40 | 28,0 | 70 | LES | Moteado 1/80 |

Tabla 4. Estadísticos descriptivos de la población de estudio por CLIA y ELISA.

| Controles (Sanos y EAS) | CLIA (CU) | ELISA U/mL) |
|----------------------------|---------------|--------------|
| Media (X) | 15,1 | 5,0 |
| Desv. Estandar (S) | 24,5 | 3,1 |
| Error Estandar (ES) | 5,5 | 0,7 |
| Int. de Confianza 95% (IC) | 4,4 a 25,8 | 3,6 a 6,4 |
| Casos (LES) | | |
| Media (X) | 336,5 | 85,1 |
| Desv. Estandar (S) | 301,0 | 45,4 |
| Error Estandar (ES) | 67,3 | 10,1 |
| Int. de Confianza 95% (IC) | 204,6 a 468,4 | 65,2 a 105,0 |

Para el método de CLIA se obtuvo una sensibilidad del 95%, especificidad del 75%, VPP del 79% y VPN del 94%, mientras que el ELISA presentó una sensibilidad de 95%, especificidad del 100%, VPP del 100% y VPN del 95%.

La tabla de contingencia, los resultados del análisis de χ^2 y del coeficiente kappa de Cohen hallados se muestran en las tablas 5, 6, y 7.

Al realizar el análisis de regresión lineal se encontró un coeficiente R² de 0,83 con un valor de p: $1,92 \times 10^{-16}$ (ANOVA). El valor de la pendiente (b) fue 4.73 (p: $1,92 \times 10^{-16}$). En el gráfico 1 se muestra la curva de regresión ajustada del CLIA en base a los resultados del método de ELISA.

En el gráfico 2 se muestra la curva ROC de los métodos CLIA y ELISA con los valores "cut off" del CLIA que muestran los más altos valores de Especificidad con respecto a los de Sensibilidad (41.5 CU con 85% y 95%, y 108.8 CU con 55% y 100% de Sensibilidad y Especificidad respectivamente).

Tabla 5. Contingencia de resultados de Ac. Anti Sm (CLIA vs. ELISA)

| | | ELISA | | Total | |
|-------|-------------------|-------------------|----------|-------|------|
| | | NEGATIVO | POSITIVO | | |
| CLIA | NEGATIVO | Recuento | 15 | 1 | 16 |
| | | Recuento esperado | 8,4 | 7,6 | 16,0 |
| | POSITIVO | Recuento | 6 | 18 | 24 |
| | | Recuento esperado | 12,6 | 11,4 | 24,0 |
| Total | Recuento | 21 | 19 | 40 | |
| | Recuento esperado | 21,0 | 19,0 | 40,0 | |

Tabla 6. Asociación entre resultados del método de CLIA y el ELISA.

| | Valor | gl | Significación asintótica (bilateral) |
|--|---------------------|----|--|
| Chi-cuadrado de Pearson | 18,195 ^a | 1 | <,001 |
| Corrección de continuidad ^b | 15,543 | 1 | <,001 |
| Razón de verosimilitud | 20,878 | 1 | <,001 |
| N de casos válidos | 40 | | |

a. 0 casillas (0,0%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 7,60.

b. Sólo se ha calculado para una tabla 2x2

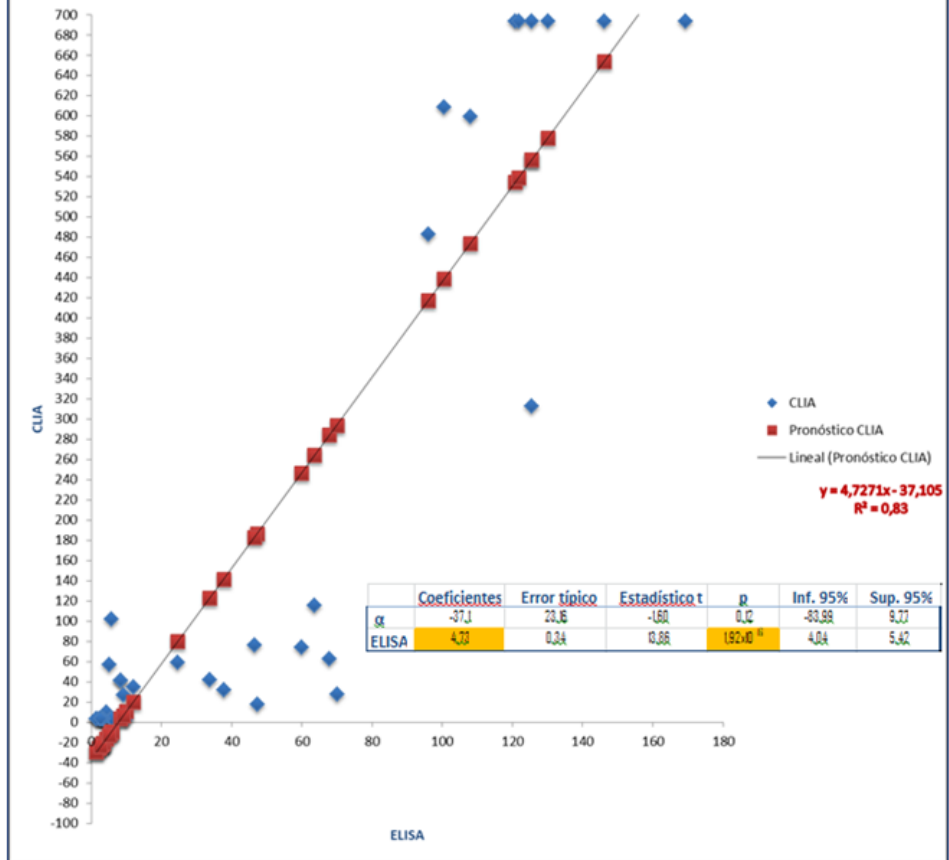
Tabla 7. Grado de acuerdo entre el método CLIA y el ELISA.

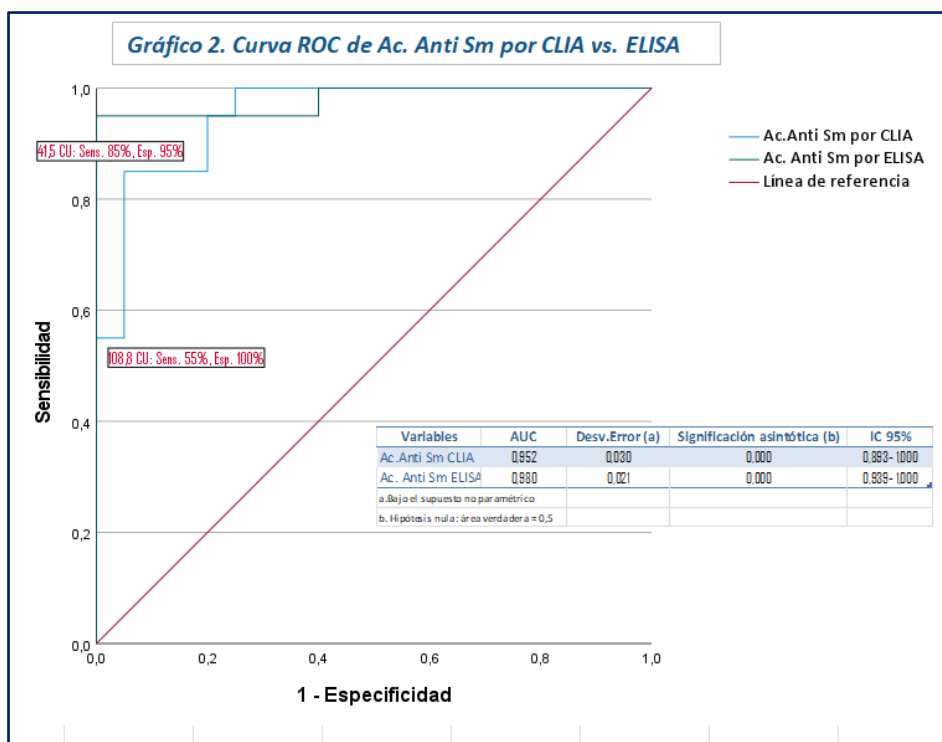
| | • Valor | Error estándar asintótico ^a | T aproximada ^b | Significación aproximada |
|-------------------------|---------|---|---------------------------|-----------------------------|
| Medida de acuerdo Kappa | ,653 | ,115 | 4,266 | <,001 |
| N de casos válidos | 40 | | | |

a. No se presupone la hipótesis nula. *IC del 95%: 0,428 - 0,878

b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.

Gráfico 1. Curva de regresión ajustada: CLIA vs. ELISA





En la tabla 8 se muestran los resultados de la titulación del material de referencia de Ac. Anti-Sm una vez procesados por los métodos de CLIA, ELISA e IFI. El título "cut off" del material de referencia por método de CLIA fue de 1/1024 (25,9 CU), por IFI de 1/4096, y por ELISA de 1/512 (36.2 U/mL).

Tabla 8. Punto de corte de los métodos de CLIA, ELISA e IFI frente a diluciones sucesivas del Standard de referencia del Ac. Anti Sm .

| Std.Anti-Sm (título) | CLIA (CU) | ELISA (U/mL) | IFI (+/-) |
|----------------------|-------------|--------------|---------------|
| Puro | >693,5 | 172,6 | + |
| 1/2 | >693,5 | 158,9 | + |
| 1/4 | >693,5 | 188,9 | + |
| 1/8 | >693,5 | 184,1 | + |
| 1/16 | >693,5 | 154,3 | + |
| 1/32 | >693,5 | 156,6 | + |
| 1/64 | 577 | 130,6 | + |
| 1/128 | 292,6 | 101,6 | + |
| 1/256 | 147,1 | 66,9 | + |
| 1/512 | 69,1 | 36,2 | + |
| 1/1024 | 25,9 | 14,1 | + |
| 1/2048 | 12,2 | 4,6 | + |
| 1/4096 | 4,6 | 2,1 | DÉBIL+ |
| 1/8192 | <3,3 | <1,0 | - |

Limitaciones:

Se realizó un ajuste del **n** muestral (n: 40) cuya potencia del estudio es de 0.84 conservando un valor aceptable preservando la importancia del mismo (GPower software) (17).

VI. DISCUSIÓN

Como hemos visto varias guías y consensos nacionales como internacionales recomiendan iniciar el estudio de las EAS con ANA HEp-2, y luego, si el resultado es positivo, realizar técnicas de segunda intención para identificar el Ac involucrado. No obstante, algunos autores como Munive et al. destacan la alta sensibilidad del método CLIA y concluyen que es una alternativa atractiva para utilizarlo como método de tamizaje de las EAS, aunque recomiendan que ante un resultado positivo debería confirmarse mediante la realización de ANA-HEp-2 por IFI(11).

En el año 2015 Mahler y Bentow publican un artículo de revisión sobre la tecnología de CLIA para su uso en la detección de Ac. anti ENA y concluyen que en general hay un buen grado de acuerdo entre CLIA y otras metodologías para la mayoría de los Ac. que integran los ENA, a pesar de que en algunos Ac. observaron un acuerdo pobre. Dichos autores justifican estos resultados a la falta de estandarización de la metodología, siendo esta difícil de alcanzar debido a diferencias en la química de inmovilización, concentración antigénica, matriz de la fase sólida, dilución de la muestra empleada, Ac. secundario de detección y condiciones de lavado(14).

A su vez, en un estudio realizado en el año 2016 por Madrid et al., que compara el método CLIA (Zenit RA) con el ELISA (INOVA Diagnostics) para cada uno de los ENA, encuentran un excelente grado de acuerdo (coeficiente kappa de Cohen) para Ac. Anti-SSA/Ro, bueno para Ac. Anti-SSB/La y Ac. Anti-SCL-70, moderado para Ac. Anti-RNP, y malo para

Ac. Anti-Sm y JO-1, aunque elevando el "cut off" del método CLIA mejoran la especificidad y el grado de acuerdo para los Ac. Anti-Sm y JO-1(18).

VII. CONCLUSIONES:

La sensibilidad encontrada del método de CLIA fue igual al método del ELISA, aunque la especificidad encontrada (75%), fue menor al ELISA cuya especificidad hallada fue del 100%. Esta característica es importante resaltarla ya que a la hora de realizar un diagnóstico de una enfermedad autoinmune como el LES es de relevancia que la prueba sea muy específica, aunque se pierda un poco de sensibilidad. Para lograr esto, si analizamos la curva ROC encontramos que el valor "cut off" para el método CLIA con el valor más alto de especificidad diagnóstica (95%), sin una gran pérdida de sensibilidad (85%), fue 41.5 CU, mientras que el valor de 108.8 CU si bien posee un 100% de Especificidad, la sensibilidad cae a un 55%. Por lo que del análisis de la curva se deduce que el valor "cut off" más adecuado para el método CLIA en nuestra población es 41.5 CU y no 20.0 CU como recomienda el fabricante.

Con respecto al análisis de asociación entre los métodos de CLIA (QUANTA Flash-INOVA Diagnostics) y ELISA (Quanta Lite-INOVA Diagnostics) encontramos que existe asociación estadísticamente significativa (χ^2 de 18.2, $p < 0.01$), mientras que el grado de acuerdo hallado fue sustancialmente bueno entre ambos métodos (65%, $p < 0.01$) (coeficiente kappa de Cohen).

Cuando analizamos los diferentes "cut off" de los métodos de CLIA, ELISA e IFI al hacer las diluciones sucesivas del material de referencia observamos que la IFI es el método más sensible con un valor de 1/4096, 2 títulos por encima del método CLIA (1/1024) y 3 títulos por encima del

ELISA (1/512), evidenciando que un valor positivo por CLIA con ANA HEp-2 negativo nos alertaría de la presencia de un falso positivo del método CLIA.

La tecnología de CLIA llegó para quedarse en los laboratorios, tanto clínicos como de investigación, sustituyendo al clásico ELISA. Por ser un método totalmente automatizado se encuentra adaptado a plataformas de análisis que realizan la lectura de los tubos de sangre etiquetados con código de barras, optimizando los tiempos de procesamiento y minimizando los errores preanalíticos.

VIII. RECOMENDACIONES

Creemos que el CLIA puede ser utilizado como alternativa en el laboratorio para la búsqueda de Ac. Anti-Sm ajustando el punto de corte del método, siendo para nuestra población de estudio un valor de 41.5 CU es importante estar en alerta frente a un resultado positivo por CLIA con un resultado de ANA-HEp-2 por IFI negativo dado que la probabilidad de un falso resultado positivo del método CLIA es alta en estos casos, por lo que se recomienda la utilización de ambas técnicas en paralelo o en forma escalonada en el laboratorio clínico para la instancia diagnóstica en los pacientes con sospecha clínica de LES.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Autoimmunity*. 2005;38(1):47–54.
2. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, et al. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? *Front Immunol*. 2018;9(MAR):1–20.
3. Javier Zepeda C. Anticuerpos anti-nucleares: Una familia diversa. *Rev méd hondur*. 2002;189–93.
4. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(1):17–23.
5. Carballo OG, Ingénito FB, Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. Primer consenso argentino para la estandarización de la determinación de anticuerpos anti-nucleares por inmunofluorescencia indirecta-HEp-2. *Acta Bioquim Clin Latinoam*. 2012;46(1):3–13.
6. Rodríguez N, Montenegro C, Buzzi C, Cairoli E, Coelho Andrade LE, Danza Á, et al. 1er Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares Departamento de Laboratorio Clínico, Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital de Clínicas Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Pasteur. *Rev Medica Del Uruguay*. 2019;35(4):302–15.

7. Chan EKL, Damoiseaux J, De Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, et al. Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus*. 2016;25(8):797–804.
8. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol*. 2002;117(2):316–24.
9. Tonutti E, Bizzaro N, Morozzi G, Radice A, Cinquanta L, Villalta D, et al. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. *Autoimmun Highlights*. 2016;7(1).
10. Aringer M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. *Semin Arthritis Rheum*. 2019;49(3):S14–7.
11. Munive R, Domínguez JIS, Solís RG, Eugenia M, Botello S. Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares. *Rev Latinoam Patol Clínica y Med Lab*. 2010;57(2):100–4.
12. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmun Highlights*. 2017;8(1).
13. Oh J, Park Y, Lee KA, Kim HS. Detection of anti-extractable nuclear antigens in patients with systemic rheumatic disease via fluorescence

- enzyme immunoassay and its clinical utility. *Yonsei Med J.* 2020;61(1):73–8.
14. Mahler M, Bentow C, Serra J, Fritzler MJ. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2016;38(1):14–20.
 15. López I, Pita. Curvas ROC. *Cad Aten Primaria* [Internet]. 1998;5(4):229–35. Available from: http://www.fisterra.com/mbe/investiga/curvas_roc/curvas_roc.asp
 16. Whiting PF, Sterne JAC, Westwood ME, Bachmann LM, Harbord R, Egger M, et al. Graphical presentation of diagnostic information. *BMC Med Res Methodol.* 2008;8(May 2014).
 17. Faul F, Buchner A, Erdfelder E, Mayr S. A short tutorial of GPower. *Tutor Quant Methods Psychol.* 2007;3(2):51–9.
 18. Madrid EM, González-Rodríguez C, Ávila-García MDG, Arrobas-Velilla T, Fernández-Riejos P. Zenit RA evaluation, a solid-phase chemiluminescence immunoassay for detection of anti-cellular antibodies. *Bioanalysis.* 2017;9(5):435–45.