

Determinación de anticuerpos anti-dsDNA: evaluación del desempeño de un inmunoensayo quimioluminiscente y correlación con el método de inmunofluorescencia indirecta

► María Soledad Martínez Methol^{1a*}, Fernando Daniel Ventimiglia^{2a,b,c}, Ana María Aristimuño^{3a}, Amelia Noemí de la Colina^{1a}, Liliana Elena D'Agostino^{4a}

Resumen

La determinación de anticuerpos anti-dsDNA es de utilidad para el diagnóstico y seguimiento clínico de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y es uno de los criterios de clasificación del SLICC-2012. El objetivo del estudio fue verificar el desempeño del inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) QUANTA Flash dsDNA y compararlo con el método en uso de inmunofluorescencia indirecta en *Crithidia luciliae* (CLIFT). Se analizaron con ambos métodos 195 pacientes con diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo y solicitud de anticuerpos anti-dsDNA. Se obtuvieron 38 sueros positivos, 133 negativos y 24 (12,3%) discordantes. Entre estos resultados discordantes, hubo 17 que correspondieron a pacientes con LES y se agruparon en 16 CLIA+/CLIFT- y 1 CLIA-/CLIFT+. Se verificó el desempeño para precisión siguiendo el protocolo EP15-A2 y la linealidad. Se estudió la concordancia mediante el coeficiente *Kappa* y la correlación con el coeficiente *Rho* de Spearman. Se observó mayor sensibilidad diagnóstica para CLIA. El grado de acuerdo fue moderado y se obtuvo buena correlación entre los valores cuantitativos de CLIA y los títulos de CLIFT. De acuerdo al buen desempeño encontrado y a los resultados discordantes analizados, la mejor estrategia para la implementación de CLIA sería utilizarla en combinación con CLIFT, lo que aumentaría la sensibilidad diagnóstica sin perder especificidad.

Palabras clave: Anticuerpos anti-dsDNA; Lupus eritematoso sistémico; Inmunoensayo quimioluminiscente; Inmunofluorescencia indirecta en *Crithidia luciliae*

Detection of anti-dsDNA antibodies: evaluation of performance of a chemiluminescent immunoassay and correlation to the indirect immunofluorescence assay

Abstract

The detection of anti-dsDNA antibodies is useful for diagnosis and clinical monitoring of patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and it is part of the classification criteria according to SLICC 2012. The purpose of this

¹ Bioquímica.

² Doctor en Bioquímica.

³ Bioquímica Especialista en Endocrinología.

⁴ Licenciada en Bioquímica. Especialista en Inmunología.

^a Laboratorio D'Agostino-Bruno. Calle 14 N° 280, (1900) La Plata, Argentina.

^b Cátedra de Hematología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 115 s/n, (1900) La Plata, Argentina.

^c Cátedra de Hematología, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional Arturo Jauretche, Av. Calchaquí 6200 A, (1888) Florencio Varela, Argentina.

* Autora para correspondencia.

study was to verify the performance of the chemiluminescent immunoassay (CLIA) QUANTA Flash dsDNA and to compare it with the method currently in use, i.e. the indirect immunofluorescence in *Crithidia luciliae* (CLIFT). One hundred and ninety five patients, who presented connective tissue diseases and required the study of anti-dsDNA antibodies, were analyzed. Thirty eight positive serum samples were obtained, 133 were negative and 24 (12.3%) in disagreement. Within the discordant results, there were 17 that corresponded to patients with SLE and they were grouped in 16 CLIA+/CLIFT- and 1 CLIA-/CLIFT+. The accuracy performance was assessed according to the EP15-A2 protocol and linearity. Concordance and correlation were calculated with the Kappa and Spearman's Rho coefficient, respectively. Based on the good performance observed and the discordant results analyzed, the best strategy for CLIA implementation would be to combine it with CLIFT, which would increase the diagnostic sensitivity without losing specificity.

Keywords: Anti-dsDNA autoantibodies; Systemic lupus erythematosus; Chemiluminescent immunoassay; *Crithidia luciliae* indirect immunofluorescence test

Determinação de anticorpos anti-dsDNA: avaliação do desempenho de um imunoensaio quimioluminescente e correlação com o método de imunofluorescência indireta

Resumo

A determinação dos anticorpos anti-dsDNA é de utilidade para o diagnóstico e seguimento clínico de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico (LES) e é um dos critérios de classificação do SLICC 2012. O objetivo do estudo foi verificar o desempenho do imunoensaio quimioluminescente (CLIA) QUANTA Flash dsDNA e compará-lo com o método em uso imunofluorescência indireta em *Crithidia luciliae* (CLIFT). Foram analisados com os dois métodos, 195 pacientes com diagnóstico de doenças do tecido conjuntivo e solicitude de anticorpos anti-dsDNA. Os resultados foram agrupados em 38 soros positivos, 133 negativos e 24 (12,3%) discordantes. Entre esses resultados discordantes, 17 corresponderam a pacientes com LES e se agruparam em 16 CLIA+/CLIFT- e 1 CLIA-/CLIFT+. Foi verificado o desempenho para precisão seguindo o protocolo EP15-A2 e a linearidade. Foi estudada a concordância mediante o coeficiente Kappa e correlação com o coeficiente Rho de Spearman. Observou-se maior sensibilidade diagnóstica para CLIA. O grau de acordo foi moderado e boa correlação foi observada entre os valores quantitativos de CLIA e os títulos de CLIFT. Com base no bom desempenho encontrado e nos resultados discordantes analisados, a melhor estratégia para implementar o CLIA seria utilizá-lo em combinação com o CLIFT, o que aumentaria a sensibilidade do diagnóstico sem perder a especificidade.

Palavras-chave: Anticorpos anti-dsDNA; Lupus eritematoso sistêmico; Imunoensaio quimioluminescente; Imunofluorescência indireta em *Crithidia luciliae*

Introducción

La medida de los anticuerpos anti-ADN bicatenario (anti-dsDNA por sus siglas en inglés) resulta de utilidad para el diagnóstico y seguimiento de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y es uno de los criterios inmunológicos de clasificación validados por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) y el *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) (1). Estos anticuerpos han sido detectados históricamente mediante ensayos manuales o cualitativos que fueron gradualmente reemplazados por métodos automatizados cuantitativos, de alto rendimiento y en fase sólida. Desde la descripción de las células LE por Malcolm Hargraves en 1948 (2) hasta la actualidad, los anticuerpos anti-dsDNA fueron intensamente estudiados y analizados

por numerosas tecnologías. El radioinmunoensayo de Farr (RIA), descrito en 1969 y considerado el estándar de oro por su alta especificidad, encontró sus limitaciones relacionadas con la disponibilidad del antígeno dsDNA radiomarcado y fue reemplazado por métodos no radioactivos (3). El método de inmunofluorescencia indirecta en sustrato de *Crithidia luciliae* (CLIFT), desarrollado por Lars Aarden en 1975 (4), también es recomendado por su alta especificidad clínica, razón por la cual es de elección cuando se necesita confirmar un resultado positivo obtenido por otro método (5). Una menor especificidad clínica y valor predictivo positivo de CLIFT para LES fueron reportados en dos estudios de Compagno *et al.* (6) (7). En un trabajo de Kavanaugh *et al.* se analizó con mayor extensión la sensibilidad, especificidad clínica, utilidad e interpretación adecuada de los resultados obtenidos por los métodos

de Farr, CLIFT y ELISA (8). La introducción de microscopios de fluorescencia automatizados con la capacidad de obtener imágenes digitales, demostró un alto nivel de concordancia con la lectura microscópica manual y permitió un enfoque del ensayo CLIFT más estandarizado, disminución de la variabilidad y mayor eficiencia, dos ventajas conocidas de la automatización (9). Si bien el método de CLIFT es conocido por su alta especificidad, tiene baja sensibilidad diagnóstica cuando se compara con los ensayos de ELISA y más recientemente, con los sistemas automatizados desarrollados durante esta última década, como el inmunoensayo enzimático fluorescente (FEIA), el inmunoensayo de partículas direccionable por láser (ALBIA) y los inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) (10) (11) (12). Es importante considerar que no existe hasta el momento estandarización en la determinación de los títulos de los anticuerpos anti-dsDNA. A pesar de que ciertos ensayos hayan sido calibrados con un suero estándar internacional (OMS Wo/80), los métodos con diferente configuración y provistos por distintos fabricantes, pueden mostrar resultados discordantes a partir del análisis de las mismas muestras. Esto se explica por la existencia de diferentes poblaciones de anticuerpos anti-dsDNA en el suero de los pacientes con distinta afinidad y/o aidez, sumada a las variaciones en la configuración de los ensayos en cuanto al antígeno empleado, conjugado y condiciones de reacción que influyen en el rendimiento de cada inmunoensayo (13). Es importante considerar que la presencia de los anticuerpos anti-dsDNA es utilizada como uno de los criterios diagnósticos de LES en entornos clínicos en donde este diagnóstico es probable (14). En la verificación de una nueva metodología se evidencian varios desafíos relevantes para la interpretación y el valor de la prueba, que incluyen: control y garantía de calidad, estandarización, sensibilidad y especificidad analítica, linealidad, reproducibilidad intra e interlaboratorio, sensibilidad y especificidad clínica (15).

El objetivo del presente estudio fue verificar el desempeño del ensayo de quimioluminiscencia para anti-

cuerpos anti-dsDNA de acuerdo con las especificaciones del fabricante y compararlo con el método CLIFT utilizado actualmente, además de analizar la necesidad de emplear más de un método en la investigación de estos autoanticuerpos.

Materiales y Métodos

Población de pacientes

Se seleccionó un total de 195 pacientes que asistieron consecutivamente al Laboratorio D'Agostino-Bruno de la ciudad de La Plata, Argentina, durante el período 2016-2018. Se utilizaron como criterios de inclusión, el diagnóstico presuntivo de enfermedades del tejido conectivo y la solicitud de anticuerpos anti-dsDNA. No se utilizaron criterios de exclusión. La población estudiada comprendió 164 mujeres y 31 hombres con una mediana de edad de 40 años (rango etario de 3-83 años). La identidad de los pacientes no fue revelada, los datos y resultados fueron anonimizados (Tabla I).

Muestras

Las muestras de sangre se obtuvieron por venopunción entre las 7:00 y 10:00 a.m., luego de un ayuno de 8 horas. El tiempo de coagulación fue de 30 minutos a temperatura ambiente utilizando tubos con gel acelerador. Los sueros obtenidos de este modo se centrifugaron durante 15 min a 3800 r.p.m. y se conservaron entre 2-8 °C durante un máximo de 10 días siguiendo las recomendaciones del fabricante del ensayo.

Inmunoensayos para anticuerpos anti-dsDNA

Se utilizó el inmunoensayo QUANTA Flash dsDNA (Inova *Diagnostics*, San Diego), método basado en CLIA para la determinación cuantitativa de anticuerpos IgG contra el dsDNA en suero humano, con un instrumento BIOFLASH (Biokit, Barcelona). Las partículas para-

Tabla I. Características de la población de pacientes seleccionada (n=195)

Variable		n (%)
Sexo	Femenino	164 (84,1)
	Masculino	31 (15,9)
Rango de edades (años)		3-83
Mediana		40
Diagnóstico presuntivo	LES	83 (42,6)
	Otras ETCND	112 (57,4)

ETCND: enfermedades del tejido conectivo no diferenciadas.

LES: lupus eritematoso sistémico.

magnéticas están recubiertas con un antígeno sintético de dsDNA y la reacción luminiscente es generada con un conjugado de isoluminol. Para la cuantificación de los anticuerpos se emplean estándares internos trazables al primer preparado internacional para dsDNA (código de la OMS: Wo/80). Los resultados se expresan en UI/mL a partir de las unidades relativas de luz (RLUs) obtenidas para cada muestra. El límite superior del intervalo de referencia del percentilo 95 calculado por el fabricante fue de 26,9 UI/mL y el límite del intervalo de referencia del percentilo 99 fue de 35,8 UI/mL, por lo tanto, el valor de 27 UI/mL se estableció como punto de corte (*cut-off*), 27-35 UI/mL como rango equívoco o indeterminado y las muestras con valores mayores de 35 UI/mL se consideraron positivas (12). El intervalo de medición analítica del ensayo, informado por el fabricante, es de 9,8 a 666,9 UI/mL.

Para el método en uso de CLIFT se utilizaron improntas Kallestad (Bio-Rad Laboratories Inc., California), con el hemoflagelado *Crithidia luciliae* como sustrato, que se procesaron en un sistema automatizado QUANTA Lyser™ (Inova Diagnostics, San Diego). La observación microscópica se realizó por dos observadores con un microscopio de fluorescencia Eclipse E 400 (Nikon, Tokio). *Crithidia luciliae* es un microorganismo unicelular que contiene en su estructura interna una mitocondria con dsDNA circular altamente condensado (cinetoplasto). La intensidad de la fluorescencia se evaluó de manera semicuantitativa realizando diluciones seriadas a partir de una fluorescencia positiva con un título de tamizaje 1/10 (dilución de corte). La comparación de ambas metodologías se muestra en la Tabla II.

Controles de calidad

Para QUANTA Flash dsDNA se utilizó el control comercial provisto por el fabricante siguiendo las recomendaciones de uso. Para CLIFT se utilizaron sueros controles positivos de pacientes con LES y de título conocido de la seroteca del laboratorio. La evaluación externa de calidad se realizó con el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) de la Fundación Bioquímica Argentina (FBA), en el que se obtuvieron resultados aceptables durante el período evaluado.

Análisis estadístico

Se realizó la verificación del desempeño de la precisión para el método QUANTA Flash dsDNA de acuerdo a las guías del CLSI (documento EP15-A2) (16). Se efectuó una corrida diaria con tres réplicas para cada una de las muestras ensayadas durante cinco días consecutivos y se utilizaron tres sueros de pacientes con LES de concentraciones promedio: 45,5; 146 y 479,6 UI/mL, identificados como niveles 1, 2 y 3 (N1, N2 y N3). Se calcularon la repetibilidad (precisión intracorrida) y la precisión del laboratorio (precisión intercorrida) expresadas como desviación estándar, S_r y S_l respectivamente. Se compararon con la desviación estándar para repetibilidad (σ_r) y precisión del laboratorio (σ_l) definidas por el fabricante, mediante el cálculo de los valores de verificación para los dos tipos de señalamientos de precisión indicados. El valor de verificación es un cálculo que incluye el desvío estándar del fabricante, los grados de libertad y el punto porcentual seleccionado de la distribución *Chi*

Tabla II. Comparación descriptiva de los inmunoensayos para anticuerpos anti-dsDNA utilizados.

Características	QUANTA Flash dsDNA (Inova Diagnostics)	Kallestad <i>Crithidia luciliae</i> (Bio-Rad)
Principio del ensayo	CLIA	CLIFT
Tiempo de procesamiento	30 min	90 min
Valor de corte	35 UI/mL	1/10
Interpretación de resultados	Negativo <27 UI/mL Equívoco/indeterminado: 27-35 UI/mL Positivo >35 UI/mL	Negativo: título <1/10 Positivo: título ≥1/10
Expresión de resultados	Cuantitativo	Semicuantitativo
Rango analítico reportable (RAR)	9,8-666,9 UI/mL	N/A
Antígeno utilizado	dsDNA sintético	Cinetoplasto de <i>Crithidia luciliae</i>
Fundamento del inmunoensayo	Los anticuerpos se unen al antígeno dsDNA en las partículas paramagnéticas y se detectan por quimioluminiscencia mediante un segundo anticuerpo (anti-IgG humana) conjugado con isoluminol.	Los anticuerpos se unen al cinetoplasto del hemoflagelado y se detectan por inmunofluorescencia indirecta mediante un segundo anticuerpo (anti-IgG humana) conjugado con isotiocianato de fluoresceína.

CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente; CLIFT: *test* de inmunofluorescencia indirecta en *Crithidia luciliae*; N/A no aplica.

cuadrado (χ^2) para el protocolo de 5 días con 3 réplicas. Si la desviación estándar estimada es menor o igual que el valor de verificación, se demuestra concordancia en precisión con la definida por el fabricante y la indicación se considera como condición hallada en el presente estudio. La linealidad se evaluó para tres niveles de concentración, utilizando una muestra de un paciente con diagnóstico confirmado de LES y presencia de anticuerpos anti-dsDNA por CLIFT; se diluyó dos veces, se realizaron los cálculos y la recta de regresión lineal con el *software* SPSS 11.5 (SPSS, EE.UU.). La medida de asociación entre las variables cualitativas se realizó mediante una tabla de contingencia de 2x2 y se obtuvo el coeficiente de concordancia *Kappa* de Cohen que se valoró en la escala de Landis y Koch (17). La asociación entre variables cuantitativas se estudió mediante el coeficiente de correlación *Rho* de Spearman (18).

Resultados

En la Tabla III se muestran los desvíos estándar obtenidos para S_r y S_l comparados con los informados por el fabricante, σ_r y σ_l y los correspondientes CV%, para los tres niveles de concentración ensayados en la verificación del desempeño de la precisión (N1, N2 y N3). Se observó que los mismos fueron menores que los definidos por el fabricante, a excepción de S_l y $(CV\%)_l$ para N1. En la Tabla IV se detallan los valores de S_r y S_l con los correspondientes valores de verificación para los mismos tres niveles analizados. Dado que los desvíos estándar hallados fueron menores que los valores de verificación calculados, se verificó el desempeño del método para precisión. Se observó que el método fue

lineal en el rango de 43,9 a 494,9 UI/mL, se obtuvo la recta $Y = 1,0001x - 0,0319$ y un coeficiente de regresión $R^2 = 0,997$. El análisis de concordancia mostró un índice *Kappa* de 0,58 (95%IC=0,46-0,70) que correspondió con un grado de acuerdo moderado. La concordancia general fue de 87,2% (95%IC=81,8-91,2), la concordancia positiva de 90,5% (95%IC=77,9-96,2) y concordancia negativa de 86,3% (95%IC=79,9-90,8). De los 195 sueros analizados, 38 (19,5%) resultaron positivos y 133 (68,2%) negativos por ambas metodologías. Se encontraron 24 (12,3%) muestras con resultados discordantes que fueron divididas en 2 grupos: 21 CLIFT negativo/CLIA positivo (Grupo I) y 3 CLIFT positivo/CLIA negativo (Grupo II). No se hallaron valores para CLIA en el rango definido como equívoco/indeterminado. Los resultados cualitativos se muestran en la Tabla V. Los 21 sueros del Grupo I presentaron valores comprendidos en el intervalo de medida para CLIA de 35,2 a 471,4 UI/mL. Los tres registros del Grupo II tuvieron títulos para CLIFT de 1/10, 1/20 y 1/40.

Entre los 24 (12,3%) sueros discordantes, se encontraron 17 (17/24) que correspondieron a pacientes con diagnóstico clínico confirmado de LES y los 8 (8/24) restantes que correspondieron a pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo no diferenciadas (ETCND). Los 17 sueros de pacientes con LES se agruparon de la siguiente manera: 16 en el Grupo I y 1 en el Grupo II. Para el Grupo I se observó que 12/21 sueros tuvieron resultados mayores de 70 UI/mL (10/12 LES y 2/12 ETCND), es decir que duplicaron el valor de corte de acuerdo con el criterio de clasificación SLICC-2012 para la positividad de anticuerpos anti-dsDNA. Nueve de los 21 sueros presentaron valores menores de 70 UI/mL (6/9 LES y 3/9 ETCND) (Tabla VI).

Tabla III. Repetibilidad y precisión intralaboratorio estimada comparadas con datos del fabricante, de acuerdo al procedimiento EP15-A2.

QUANTA Flash dsDNA		Repetibilidad estimada (precisión intracorrida)		Repetibilidad del fabricante		Precisión estimada intralaboratorio		Precisión intralaboratorio del fabricante	
Muestra	Media	S_r	$CV(\%)_r$	σ_r	$CV(\%)_r$	S_l	$CV(\%)_l$	σ_l	$CV(\%)_l$
N1	45,5	0,59	1,3	2,4	4,9	1,67	3,7	1,2	2,5
N2	146,0	5,01	3,4	6,5	4,7	5,72	3,9	5,5	4,0
N3	479,6	16,06	3,3	27,9	6,9	15,30	3,2	14,1	3,5

S_r y S_l : desviación estándar de la repetibilidad y del laboratorio estimada por el usuario; σ_r y σ_l : desviación estándar de la repetibilidad y del laboratorio definidos por el fabricante.

Tabla IV. Valores de verificación calculados para los tres niveles analizados, de acuerdo al procedimiento EP15-A2.

Muestra	Repetibilidad estimada (S_r)	Valor de verificación	Precisión estimada intralaboratorio (S_l)	Valor de verificación
N1	0,59	0,87	1,67	3,75
N2	5,01	7,38	5,72	17,25
N3	16,06	23,67	15,30	44,21

Tabla V. Resultados cualitativos obtenidos con ambas metodologías para el total de las muestras de pacientes analizadas (n=195).

		CLIFT		
		Negativo	Positivo	Total
CLIA	Negativo	133	3	136
	Positivo	21	38	59
	Total	154	41	195

CLIFT: test de inmunofluorescencia indirecta en *Crithidia luciliae*; CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente.

Tabla VI. Datos clínicos y de laboratorio relevantes de los pacientes con resultados discordantes entre CLIA y CLIFT.

N° de paciente	CLIFT		CLIA		Diagnóstico clínico	Otros criterios inmunológicos (SLICC-2012)			
	Título	Interpretación	UI/mL	Interpretación		ANA	Anti-Sm	Anticuerpos anti-cardiolipinas y/o anti β1-glicoproteína I (IgG y/o IgM)	Complemento
1	<1/10	Negativo	35,2	Positivo	ETCND	Negativo	Negativo	ND	Normal
2	<1/10	Negativo	38,6	Positivo	LES con compromiso hematológico	Positivo	Negativo	Negativo	Normal
3	<1/10	Negativo	40,9	Positivo	LES	Positivo	Positivo	Negativo	C4↓
4	<1/10	Negativo	41,6	Positivo	LES + artritis	Positivo	ND	ND	C3↓
5	<1/10	Negativo	44,2	Positivo	ETCND	Positivo	Negativo	ND	ND
6	<1/10	Negativo	48,6	Positivo	ETCND	Positivo	ND	ND	Normal
7	<1/10	Negativo	50,3	Positivo	LES	Positivo	Negativo	Negativo	C4↓
8	<1/10	Negativo	64,1	Positivo	LES	Positivo	Positivo	aCL IgM positivo débil	Normal
9	<1/10	Negativo	69,5	Positivo	LES	Positivo	Negativo	aCL IgG positivo débil	Normal
10	<1/10	Negativo	74,9	Positivo	LES	Positivo	Positivo	aCL IgG y α-β2GPI IgG positivo	C4↓
11	<1/10	Negativo	79,1	Positivo	LES en remisión	Positivo	ND	ND	C3↓
12	<1/10	Negativo	83,8	Positivo	LES	Positivo	Negativo	Negativo	C3↓
13	<1/10	Negativo	84,9	Positivo	ETCND	Positivo	ND	Negativo	C3, C4 y CH50↓
14	<1/10	Negativo	94,7	Positivo	LES	Positivo	Positivo	Negativo	C3, C4 y CH50↓
15	<1/10	Negativo	99,6	Positivo	LES	Positivo	Negativo	ND	C3 y C4↓
16	<1/10	Negativo	101	Positivo	LES	Positivo	Negativo	Negativo	C4↓
17	<1/10	Negativo	132,1	Positivo	LES de presentación atípica	Positivo	Negativo	aCL IgG/IgM y α-β2GPI IgG/IgM positivo fuerte	C3 y C4↓
18	<1/10	Negativo	139,3	Positivo	LES	Positivo	Positivo	Negativo	C3, C4 y CH50↓
19	<1/10	Negativo	227,6	Positivo	ETCND	Positivo	ND	ND	ND
20	<1/10	Negativo	326,3	Positivo	LES con compromiso renal	Positivo	Negativo	ND	Normal
21	<1/10	Negativo	471,4	Positivo	LES de presentación atípica	Positivo	Positivo	aCL IgG y α-β2GPI IgG positivo	C3 y C4↓
22	1/10	Positivo	<9,8	Negativo	ETCND	Positivo	Negativo	ND	Normal
23	1/20	Positivo	12,6	Negativo	ETCND	Positivo	Negativo	ND	Normal
24	1/40	Positivo	19,6	Negativo	LES	Positivo	Negativo	Negativo	C4↓

ND: no determinado; ETCND: enfermedad del tejido conectivo no diferenciada ; CLIFT: test de inmunofluorescencia indirecta en *Crithidia luciliae*; CLIA: inmunoensayo quimioluminiscente; LES: lupus eritematoso sistémico; ANA: anticuerpos antinucleares; anti-Sm: anticuerpos anti-Smith; aCL: anticuerpos anti-cardiolipinas; α-β2GPI: anticuerpos anti-β2 glicoproteína I; C3 y C4: componentes 3 y 4 de las proteínas del sistema del complemento; CH50: complemento hemolítico total o actividad total del complemento.

En el análisis de correlación de Spearman se obtuvo un valor de $Rho=0,637$ (95%IC=0,542-0,716) que indicó una asociación positiva fuerte entre los valores de CLIA y los títulos de CLIFT (Fig. 1). Los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño del método QUANTA Flash dsDNA se muestran en la Tabla VII.

Discusión y Conclusiones

El análisis de los resultados obtenidos en la verificación del desempeño del método CLIA QUANTA Flash dsDNA, indicó que los valores de S_p , S_1 y linealidad estuvieron de acuerdo con las especificaciones del fabricante, con excepción del cálculo de S_1 para el nivel 1. Sin embargo, al comparar los desvíos estándar obtenidos para los tres niveles analizados con

los valores de verificación calculados, se obtuvieron buenos resultados y se dio por válida la verificación del desempeño del método para precisión. Si bien en este estudio no se evaluó el rendimiento del inmunoensayo en cuanto a sensibilidad y especificidad diagnóstica, es interesante mencionar los datos del fabricante y contrastarlos con otros estudios. El fabricante reportó una sensibilidad diagnóstica de 49,1% (95% IC=45,2-52,9) y una especificidad diagnóstica de 87,5% (95% IC=84,2-90,2). En el mismo sentido, en el estudio de Infantino *et al.* (11) se reportaron 39,3% (95% IC=27,2-52,7) para sensibilidad y 96% (95% IC=90,1-98,9) para especificidad, mientras que Bentow *et al.* (12) informaron 77,2% (95% IC=71,3-82,1) y 89,8% (95% IC=87,1-92,0) respectivamente. Los valores detallados en esos estudios no fueron coincidentes debido, principalmente, a diferencias basadas en

Tabla VII. Resultados obtenidos para la evaluación del desempeño del método CLIA QUANTA Flash dsDNA.

Parámetro estadístico		Valor
Linealidad		$R^2=0,997$ Pendiente=1,0001 (95% IC=0,984-1,016)
Índice de concordancia Kappa de Cohen		0,58 (95% IC=0,46-0,70)
Rho de Spearman		0,637 (95% IC=0,542-0,716)
Concordancia	General	87,2% (95%IC=81,8-91,2)
	Positiva	90,5% (95%IC=77,9-96,2)
	Negativa	86,3% (95%IC=79,9-90,8)

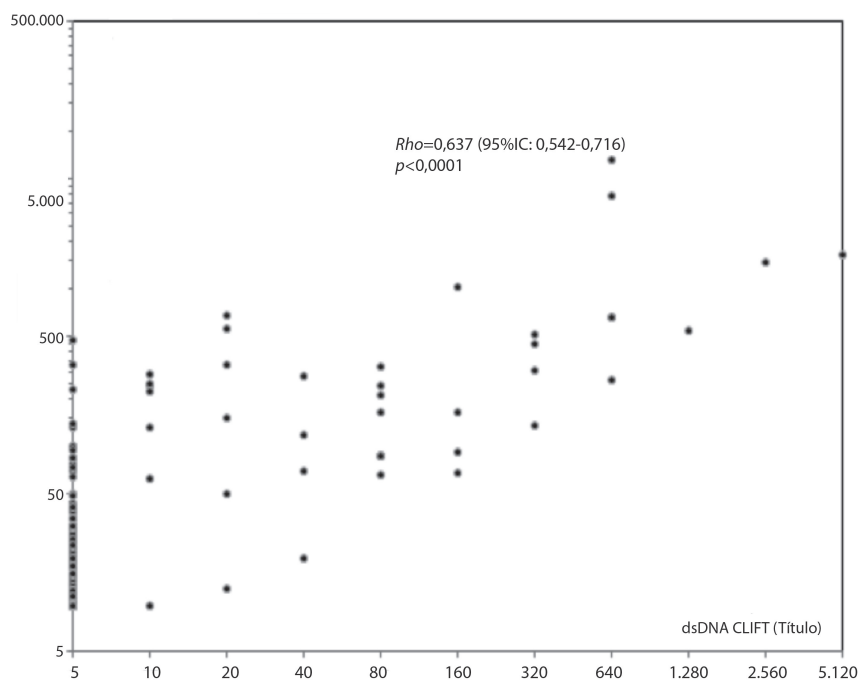


Figura 1. Correlación cuantitativa de Spearman entre CLIA QUANTA Flash dsDNA y CLIFT.

las cohortes seleccionadas de pacientes con LES. Es interesante observar la alta especificidad informada para el método de CLIA evaluado, comparable con la alta especificidad de CLIFT (10) (11). En el análisis de concordancia se obtuvo un acuerdo cualitativo moderado entre ambas metodologías. Resultados con *Kappa* más bajos fueron publicados en el estudio de Infantino *et al.* (11), al comparar el mismo método QUANTA Flash dsDNA con el ensayo CLIFT NOVA Lite dsDNA. Como fue mencionado, la posibilidad de obtener resultados discordantes entre diferentes métodos para la determinación de anticuerpos anti-dsDNA, se debe al uso de diferentes antígenos, a la configuración de los inmunoensayos y fundamentalmente a la existencia de diferentes poblaciones de anticuerpos anti-dsDNA presentes en el suero de los pacientes con LES. Por estos motivos, aunque se comparen ensayos calibrados contra el estándar internacional de referencia, se pueden obtener resultados cualitativos discordantes para la misma muestra analizada (6) (13) (19). Como se mostró en la Tabla VI, entre los 21 pacientes del Grupo I se encontraron 16/21 pacientes con diagnóstico clínico de LES y varios de ellos cumplieron también con más de un criterio inmunológico de clasificación según SLICC 2012, como fueron: positividad para ANA, Sm, anticuerpos antifosfolípidos e hipocomplementemia (pacientes numerados como 3, 8, 10, 14, 18 y 21). Es importante mencionar que para estos pacientes la mayor sensibilidad diagnóstica de CLIA respecto de CLIFT (10), es coincidente con la baja sensibilidad diagnóstica para CLIFT informada en el estudio multicéntrico de Compagno *et al.* (7). En el Grupo I se observó también que el paciente 1 fue ANA negativo, con un valor por CLIA de 35,2 UI/mL y no reunía los criterios inmunológicos de clasificación para LES. Sin embargo, es interesante resaltar la importancia de medir anticuerpos anti-dsDNA en pacientes ANA negativos, dado que existe un 6,2% de pacientes con LES de diagnóstico temprano que son negativos en la determinación de anticuerpos anticelulares en sustrato de células Hep-2 por IFI (20). La prevalencia de pacientes con LES que son ANA negativos varía entre 5 y 23% para diferentes ensayos comerciales de ANA (21). A su vez, se ha informado para una gran cohorte de pacientes con LES, que un 11,3% de los pacientes ANA negativos eran positivos por el método CLIA QUANTA Flash dsDNA utilizado (20).

Es interesante observar el caso de la paciente 24 del Grupo II (CLIA negativo/CLIFT positivo), donde los anticuerpos anti-dsDNA no fueron detectados por CLIA y sí fueron detectados por CLIFT con título 1/40. Este caso correspondió a una paciente con LES que además reunía otros criterios inmunológicos como positividad para ANA e hipocomplementemia.

Para la correlación de Spearman, el valor del estadístico *Rho* fue de 0,637 (95% IC=0,542-0,716) y se in-

terpretó como una buena asociación cuantitativa entre los valores de CLIA y los títulos de CLIFT. Sin embargo, es necesario destacar que el método de CLIA es cuantitativo y podría ser más adecuado para el seguimiento clínico de pacientes con LES, para monitorear el tratamiento y la actividad de la enfermedad, predecir recaídas o identificar riesgo de compromiso renal y nefritis (22) (23). Varios estudios han evaluado el desempeño de diferentes inmunoensayos en el monitoreo de la actividad de la enfermedad mediante puntuaciones o *scores* basados en la afectación de órganos y parámetros clínicos. En estos trabajos se encontró una correlación fuerte entre la medida de los anticuerpos anti-dsDNA por el método evaluado y la actividad de la enfermedad en cohortes bien definidas de pacientes con LES (12) (24). Uno de estos índices es el SLEDAI-2K que incluye la medida de anticuerpos anti-dsDNA entre los parámetros a evaluar.

Habiendo verificado el buen desempeño del método y considerando los datos aportados por la bibliografía respecto a mejoras en la sensibilidad diagnóstica, adecuada especificidad y buena correlación de la medida con la actividad de la enfermedad, fue parte del objetivo del presente estudio determinar la estrategia en la implementación de esta nueva metodología, es decir, si se utilizará como primera línea en la determinación de anticuerpos anti-dsDNA o de manera combinada con CLIFT. De acuerdo con todas las consideraciones previas y los resultados discordantes analizados, la mejor estrategia sería utilizar ambas metodologías, lo que aumentaría la sensibilidad diagnóstica sin perder especificidad. Sin embargo, se encontró una limitación en el costo de los reactivos por determinación, superior en 4 veces al costo del método en uso de CLIFT, lo que condujo a pensar en más de una alternativa para su implementación. Teniendo presente que la mayoría de las solicitudes de anticuerpos anti-dsDNA recibidas en el laboratorio son solicitadas por médicos reumatólogos, la utilización de CLIA como primera línea podría ser más adecuada para confirmar el diagnóstico y aumentar la sensibilidad en la detección de los cambios en el curso de la enfermedad. Finalmente, se observó la importancia de utilizar dos inmunoensayos con diferentes características y desempeño analítico aceptable para la determinación de anticuerpos anti-dsDNA, como una herramienta más robusta en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con LES (13).

Fuentes de financiación

No hubo fuentes de financiación externas para la realización del presente trabajo.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Agradecimientos

A la Dirección técnica del laboratorio D'Agostino-Bruno por contribuir con la tecnología y reactivos necesarios para la realización del estudio.

Correspondencia

Bioq. MARÍA SOLEDAD MARTÍNEZ METHOL
Laboratorio D'Agostino-Bruno
Calle 14 N° 280, (1900) LA PLATA, Argentina
Correo electrónico: smartinezmethol@dagostino-bruno.com.ar

Referencias bibliográficas

- Petri M, Orbai AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, *et al.* Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis rheum* 2012; 64 (8): 2677-86.
- Hargraves MM. Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin Proc* 1969; 44: 579-99.
- Mahler M, Fritzler MJ. Anti-dsDNA antibody testing in the clinic: Farr or ELISA? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2007; 3 (2): 72-3.
- Aarden LA, Lakmaker F, de Groot ER, Swaak AJ, Feltkamp TE. Detection of antibodies to DNA by radioimmunoassay and immunofluorescence. *Scand J Rheumatol* 1975; 4 (11): 12-9.
- 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 (4): 386-94.
- Compagno M, Rekvig OP, Bengtsson AA, Sturfelt G, Heegaard NH, Jonsen A, *et al.* Clinical phenotype associations with various types of anti-dsDNA antibodies in patients with recent onset of rheumatic symptoms. Results from a multicentre observational study. *Lupus Sci Med* 2014; 1 (1), e000007. (Fecha de acceso 1 de febrero de 2020). Disponible en: <https://doi.org/10.1136/lupus-2013-000007>.
- 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.
- 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 (5): 546-55.
- Lakos G, Gonzalez M, Flaherty D, Bentow C, Ibarra C, Stimson D, *et al.* Detection of anti-dsDNA antibodies by computer-aided automated immunofluorescence analysis. *J Immunol Methods* 2016 Jun; 433: 17-22.
- Enocsson H, Sjowall C, Wirestam L, Dahle C, Kastbom A, Ronnelid J, *et al.* Four anti-dsDNA antibody assays in relation to systemic lupus erythematosus disease specificity and activity. *J Rheumatol* 2015; 42 (5): 817-25.
- Infantino M, Meacci F, Bentow C, Martis P, Benucci M, Afeltra A, *et al.* Clinical comparison of QUANTA Flash dsDNA chemiluminescent immunoassay with four current assays for the detection of anti-dsDNA autoantibodies. *J Immunol Res* 2015; 2015: 902821.
- Bentow C, Lakos, G, Martis P, Wahl E, Garcia M, Viñas O, *et al.* International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies. *Lupus* 2016; 25 (8): 864-72.
- Mummert E, Fritzler MJ, Sjowall C, Bentow C, Mahler M. The clinical utility of anti-double-stranded DNA antibodies and the challenges of their determination. *J Immunol Methods* 2018 Aug; 459: 11-9.
- Fu SM, Dai C, Zhao Z, Gaskin F. Anti-dsDNA antibodies are one of the many autoantibodies in systemic lupus erythematosus F1000Res 2015 Oct 1; 4 (F1000 Faculty Rev): 939.
- Meroni P, Biggioggero M, Pierangeli S, Sheldon J, Zegers I, Borghi M. Standardization of autoantibody testing: a paradigm for serology in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014; 10 (1): 35-43.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Verificación del desempeño de la precisión y veracidad por el usuario. Directriz aprobada-Segunda edición. Documento CLSI EP15-A2. [ISBN 1-56238-574-7]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne (Pennsylvania), 2005.
- Landis JR, Koch GC. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33 (1):159-74.
- Alvarez Cáceres R. Correlación. En: *Estadística Aplicada a las Ciencias de la Salud*. 1ª edición. Madrid: Editorial Díaz de Santos, 2007. Cap. 18 p.575.
- Pisetsky DS. Anti-DNA antibodies--quintessential biomarkers of SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2016; 12 (2): 102-10.
- Choi MY, Clarke AE, St Pierre Y, Hanly JG, Urowitz MB, Romero-Diaz J, *et al.* Antinuclear antibody-negative systemic lupus erythematosus in an international inception cohort. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2019; 71 (7): 893-902.
- Pisetsky DS, Spencer DM, Lipsky PE, Rovin BH. Assay variation in the detection of antinuclear antibodies in the sera of patients with established SLE. *Ann Rheum Dis* 2018; 77 (6): 911-3.
- Dervieux T, O'Malley T, Conklin J, Ibarra C, Bentow C, Aure MA, *et al.* SAT0662 evaluation of anti-double stranded DNA antibodies in the monitoring of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2017; 76 (Suppl 2): 1025.
- Bentow C, Lakos G, Martis P, Garcia M, Viñas O, Espinosa G, *et al.* Quanta Flash dsDNA chemiluminescent immunoassay results show stronger association with lupus nephritis than traditional ELISA. Poster presented in: 12th Dresden Symposium on Autoantibodies; 2015 Sep 23-26; Dresden, Germany.
- Mahler M, Bentow C, O'Malley T, Ibarra C, Conklin J, Aure M, *et al.* Performance characteristics of different anti-double-stranded DNA antibody assays in the monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Immunol Res* 2017; 2017: 1720902.

Recibido: 31 de marzo de 2020

Aceptado: 12 de agosto de 2020