

Jornal de ImunoDiagnósticos

3/2021



Anticorpos anti-Sm

Detecção de anticorpos anti-Sm

Avaliação do novo teste EliA SmD^P-S

ThermoFisher
SCIENTIFIC

**Caro leitor,**

Um dos primeiros ensaios EliA em instrumentos Phadia foi o teste EliA Sm, lançado em 2001. Naquela época já existia um ensaio ELISA no mercado, o teste Varelisa Sm. Em ambos os testes, uma proteína SmD purificada natural foi revestida no poço

de plástico. Ambos os testes tiveram uma especificidade extremamente alta, que é provavelmente a característica mais importante de um teste anti-Sm, já que o marcador é usado como um auxílio para o diagnóstico da doença de baixa prevalência lúpus eritematoso sistêmico (LES). Uma garantia para alta especificidade é o uso de antígenos recombinantes em testes de diagnóstico, uma vez que os antígenos recombinantes são da mais alta pureza⁽¹⁾. A divisão de ImunoDiagnósticos na Thermo Fisher Scientific (e suas companhias antecessoras Elias, Pharmacia Diagnostics e Phadia) sempre foi pioneira no desenvolvimento e produção de antígenos recombinantes para testes de autoanticorpos⁽²⁾. Mas, embora os antígenos recombinantes sejam perfeitos para quase todos os testes de ANA (a maioria dos antígenos para testes de ANA EliA são produzidos em células eucarióticas, usando o sistema Sf9/baculovírus), não é possível produzir uma proteína SmD recombinante com imunorreatividade suficiente. Em vez disso, desenvolvemos em 2005 um teste ELISA com um peptídeo SmD3, que mostrou uma especificidade e sensibilidade surpreendentemente altas⁽³⁾. Foram necessários mais 7 anos de desenvolvimento para transferir este teste para os instrumentos Phadia totalmente automatizados. Em 2012, tivemos o orgulho de lançar o novo teste EliA SmD^P totalmente automatizado revestido com o peptídeo SmD3. Em comparação com outros testes disponíveis comercialmente, EliA SmD^P teve uma sensibilidade e uma especificidade mais altas.⁽⁴⁾ No entanto, quando o teste entrou na rotina, particularmente os laboratórios de alto rendimento experimentaram uma diminuição do valor preditivo positivo em comparação com o teste EliA Sm anterior. Incentivados por esses clientes, voltamos ao nosso laboratório de pesquisa para desenvolver um teste ainda mais específico, usando uma forma totalmente nova de ligação do peptídeo SmD ao poço. E, de fato, fomos capazes de lançar o novo teste EliA SmD^P-S (S para “específico”) em maio de 2019. Neste Jornal, Sharon Veenbergen e Marco WJ Schreurs apresentam descobertas ao avaliar o novo teste EliA SmD^P-S. Aproveite a leitura!

Conteúdo

Anticorpos Anti-Sm 3

Detecção de anticorpos anti-Sm 5

ImmunoDiagnostics Journal is the Journal of

Thermo Fisher Scientific

This issue is published by Thermo Fisher Scientific - Phadia GmbH

Munzinger Straße 7, D-79111 Freiburg

Editor

Nina Olschowka

Referências

- Schmitt J, Papisch W. Recombinant autoantigens. *Autoimmun Rev.* 2002;1(1-2):79-88.
- Haubruck H, Mauch L, Cook NJ, Steffens U, Hunt N, Berthold H, et al. Expression of recombinant human thyroid peroxidase by the baculovirus system and its use in ELISA screening for diagnosis of autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity.* 1993;15(4):275-84.
- Mahler M, Fritzler MJ, Bluthner M. Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylation of an arginine residue as a specific target of a subpopulation of anti-Sm antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R19-29.
- Internal study with 100 SLE patients and 250 disease controls, data on file

Anticorpos anti-Sm

Nina Olschowka¹ and Edward K.L. Chan²

¹Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Germany

²Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, FL, United States

Os anticorpos para o antígeno Sm são altamente específicos para o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e estão presentes em 5 a 30% das populações de LES⁽¹⁻³⁾. Eles estão incluídos nos critérios de classificação de 2019 para LES como anticorpos específicos para LES, com pelo menos a mesma relevância que os anticorpos anti-dsDNA⁽⁴⁾.

Em meados da década de 1960, um jovem médico e pesquisador da Rockefeller University em Nova York, Eng M. Tan, MD, estava cuidando de uma jovem com lúpus eritematoso sistêmico (LES). Usando o método de difusão em ágar Ouchterlony, ele e seu mentor, Henry Kunkel, MD, demonstraram que o soro desse jovem paciente com LES apresentava bandas de precipitina com extratos de tecido solúvel que não puderam ser explicados com base no conteúdo de DNA ou nucleoproteína⁽⁵⁾. O Dr. Tan descobriu uma descoberta que revolucionaria o diagnóstico de lúpus. Outras investigações usando os anticorpos para o antígeno Sm (nomeado em homenagem ao paciente, Stephanie Smith) produziram não apenas novos marcadores diagnósticos para o lúpus, mas também novas direções de pesquisa e ideias para o campo da biologia molecular⁽⁶⁾.

O antígeno Sm pertence ao spliceossomo

Um spliceossomo é um grande complexo molecular de RNA-proteína encontrado principalmente no núcleo das células eucarióticas. Sua principal função é remover íntrons do pré-mRNA transcrito, por meio de um processo chamado splicing de mRNA. Esta é uma etapa crucial para a modificação pós-transcricional do pré-mRNA para se tornar um modelo funcional para ribossomos na síntese de proteínas⁽⁷⁾. O spliceossomo é amplamente composto por cinco grandes ribonucleo-proteínas nucleares ricas em uridina (snRNPs, pronunciadas "snurps"), denominadas U1, U2, U4-6 e U5 snRNPs^(8, 9). A Figura 1 representa a estrutura de U1-snRNP. Todos os snRNPs podem ser subdivididos em 3 componentes principais: pequenos RNAs nucleares, proteínas variáveis e um conjunto comum de proteínas centrais, as proteínas Sm. A proteína central Sm é organizada como uma estrutura de anel de sete membros (anel Sm), contendo B, B' ou N (28 kDa – 29.5 kDa) mais D1 (16 kDa), D2 (16.5 kDa), D3 (18 kDa), E (12 kDa), F (11 kDa), e G (9 kDa)⁽⁹⁻¹¹⁾. Além do anel Sm central, algumas proteínas estão especificamente associadas a certos snRNPs.

U1- snRNP, por exemplo, contém três proteínas distintas designadas 70K (68/70 kDa), A (32 kDa) e C (22 kDa), ver figura 1⁽¹⁰⁾.

Anticorpos Anti-snRNP

As categorizações mais populares para anticorpos contra snRNPs incluem anticorpos anti-Sm e anti-U1-snRNP.

Os anticorpos anti-U1-RNP são um critério diagnóstico de doença mista do tecido conectivo (DMTC). A ausência de anticorpos U1-RNP essencialmente exclui esta doença (3, 13). Os anticorpos U1-RNP são encontrados em até 32% dos pacientes com LES, na doença indiferenciada do tecido conjuntivo, na esclerose sistêmica e na síndrome de Sjögren^(3, 13).

O anticorpo anti-Sm é um marcador específico para LES, incluído nos critérios de classificação SLICC de 2012, bem como em os Critérios de Classificação EULAR/ACR de 2019 revisados para LES^(4, 12). Eles aparecem mais tarde do que outros autoanticorpos associados ao LES e, em média, 1 ano antes do início clínico do LES⁽¹¹⁾. Os anticorpos Sm têm uma especificidade diagnóstica muito alta (99%), mas uma sensibilidade baixa (5-10%) para LES em pacientes de ascendência caucasiana. A sensibilidade é muito maior em pacientes de ascendência asiática ou afro-americana (30% a mais de 40%)⁽¹³⁾. Foi relatado que o anticorpo Sm está associado à atividade da doença no diagnóstico de LES, e suas alterações podem refletir mudanças na atividade da doença em pacientes com LES de início recente. No entanto, isso geralmente não é aceito como um consenso⁽¹⁴⁾. Os dados sobre a associação entre os anticorpos e várias manifestações de LES são inconsistentes, mas a associação positiva entre anticorpos Sm e manifestações orgânicas graves (SNC, rim), vasculite cutânea e manifestações mucosas (lesões discóides, úlceras orais) e anticorpos dsDNA é relativamente bem confirmado⁽¹³⁾.

Qual é o antígeno Sm “real”?

A especificidade do anti-Sm inclui autoanticorpos que visam proteínas do núcleo comum de Sm, normalmente B / B' ou D. Anti-RNP geralmente se refere a autoanticorpos específicos anti-U1-snRNP que têm como alvo o U1-snRNP ou proteínas específicas

de U1 70K, A ou C. No entanto, há uma reatividade cruzada significativa entre as proteínas A, C e B / B', portanto, até 60% dos soros anti-U1-snRNP podem reagir com B / B'. Como os RNPs específicos de U1 são mais frequentemente direcionados por anticorpos que estão presentes em pacientes com doença mista do tecido conjuntivo, o SmD é considerado o antígeno Sm mais específico do SLE^(11, 15).

Métodos para detectar anticorpos anti-Sm

O Anti-Sm produz um padrão nuclear pontilhado nos núcleos das células HEp-2 por imunofluorescência indireta convencional (IIC)⁽¹⁰⁾. No entanto, esse padrão de coloração é praticamente indistinguível do anti-U1-RNP por esta técnica. Portanto, um ensaio confirmatório usando antígenos específicos deve seguir para identificar definitivamente este autoanticorpo^(3, 10). Embora a imunoprecipitação usando extrato celular marcado com S35-metionina seja considerada o padrão ouro, as tecnologias de ensaio mais amplamente utilizadas são baseadas em ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), imunossaios de laser endereçáveis (ALBIA), imunossaios em linha (LIA), imunossai quimioluminescente (CLIA) e imunossai de enzima fluorescente (FEIA)⁽³⁾. Juntamente com as pequenas diferenças observadas entre as diferentes tecnologias, discrepâncias adicionais estão relacionadas ao uso de diferentes fontes de antígenos⁽³⁾. Para ensaios de fase sólida, é vantajoso usar proteínas recombinantes para atingir a maior pureza e, conseqüentemente, alta especificidade. Embora os antígenos RNP recombinantes 70K, A e C tenham sido usados em ensaios de fase sólida por muitos anos, nunca foi possível produzir uma proteína SmD recombinante imunorreativa, nem em células eucarióticas, nem em células bacterianas. Em 2005, Mahler et al. mostraram que um determinado peptídeo de SmD3 representa um substrato mais sensível e confiável do que o Sm purificado para a detecção de uma subclasse de anticorpos anti-Sm⁽¹⁶⁾. Usando peptídeos imobilizados preparados com a tecnologia SPOT, os autores mostraram que a dimetilação simétrica de resíduos de arginina desempenha um papel importante no reconhecimento de epítomos de células B dos autoantígenos SmD1 e SmD3. A especificidade da ligação do anticorpo aos peptídeos SmD3 foi maior do que a dos peptídeos SmD1⁽¹⁶⁾.

Harmonização da interpretação clínica dos resultados do teste Sm

Ensaio diferentes para anticorpos Sm e U1-RNP às vezes dão resultados diferentes, dependendo do condições de teste e os autoantígenos usados. Isso deve sempre ser levado em consideração ao comparar resultados discrepantes entre os kits⁽¹⁰⁾.

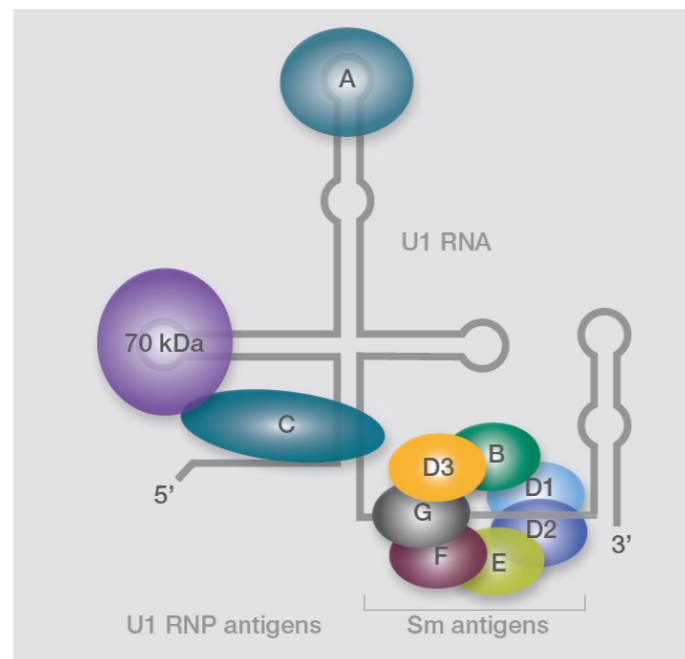


Figura 1

Padronizando os valores numéricos relatados em resultados obtidos por ensaios diferentes não é realista, dadas as diferenças na metodologia. No entanto, harmonizando a interpretação clínica dos diferentes testes de anticorpos Sm e U1-RNP podem ser alcançados (até um certo nível), fornecendo taxas de verossimilhança específicas de resultados de teste (LRs)⁽¹⁷⁾. Os imunossaios atuais para detecção de anti-Sm geralmente dependem de um único ponto de corte para dividir entre positivo e negativo. No entanto, esta abordagem ignora o valor clínico contido nos níveis de anticorpos. Estudos anteriores em diferentes testes de anticorpos mostraram que a probabilidade da doença está geralmente relacionada ao nível de anticorpos. LR's específicos para resultados de testes transmitem informações clínicas importantes inerentes aos níveis de anticorpos. Os LR's fornecem uma estimativa da significância clínica de um resultado de teste: um LR positivo de 10 indica que a chance de encontrar tais resultados é 10 vezes maior em pacientes com LES do que em controles. Assim, resultados acima do limiar de 10 LR são úteis para auxiliar no diagnóstico de LES. No entanto, para a avaliação dos LR's específicos de teste e resultado, é necessário um estudo com um grupo maior de pacientes com LES e controles da doença.

Referências

1. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol.* 1989;44:93-151.
2. Craft J. Antibodies to snRNPs in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am.* 1992;18(2):311-35.
3. Lemerle J, Renaudineau Y. Anti-Sm and Anti-U1-RNP Antibodies: An Update. *Lupus: Open Access.* 2016;1(3):1000e104.
4. Aringer M, Costenbader K, Daikh D, Brinks R, Mosca M, Ramsey-Goldman R, et al. 2019 European League Against Rheumatism/American College of Rheumatology Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 2019;71(9):1400-12.
5. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1966;96(3):464-71.
6. Henkel G. He Taught Us to Always Go Deeper <https://www.the-rheumatologist.org/article/he-taught-us-to-always-go-deeper/6/?singlepage=1>. 2011.

7. Wikipedia. Spliceosome <https://en.wikipedia.org/wiki/Spliceosome2020> [updated 9 November 2020;11-22].
8. Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7).
9. Mattioli M, Reichlin M. Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. *J Immunol.* 1971;107(5):1281-90.
10. Satoh M, Fritzler MJ, Chan EKL (2021) Anti-histone and anti-spliceosome antibodies. Chapter 28, In: *Systemic Lupus Erythematosus: Basic, Applied and Clinical Aspects*, 2nd edition, edited by Tsokos, G.C., Academic Press, p237-47. DOI: 10.1016/B978-0-12-814551-7.00028-3
11. Mahler M. Sm peptides in differentiation of autoimmune diseases. *Adv Clin Chem.* 2011;54:109-28.
12. Petri M, Orbai AM, Alarcon 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.
13. Conrad K, Schoessler W, Hiepe F, Fritzler MJ. Autoantibodies in Systemic Autoimmune Diseases. 3 ed. Conrad K, Sack U, editors. Lengerich, Berlin, Bremen, Miami, Riga, Viernheim, Wien, Zagreb: Pabst; 2015; 359 p.
14. Ahn SS, Jung SM, Yoo J, Lee S-W, Song JJ, Park Y-B. Anti-Smitz antibody is associated with disease activity in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 2019;39:1937-1944.
15. Van Venrooij WJ, Sillekens PT. Small nuclear RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 1989;7(6):635-45.
16. Mahler M, Fritzler MJ, Bluthner M. Identification of a SmD3 epitope with a single symmetrical dimethylation of an arginine residue as a specific target of a subpopulation of anti-Sm antibodies. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):R19-29.
17. Bossuyt X, Claessens J, Belmondo T, De Langhe E, Westhovens R, Poesen K, et al. Harmonization of clinical interpretation of antinuclear antibody test results by solid phase assay and by indirect immunofluorescence through likelihood ratios. *Autoimmun Rev.* 2019;18(11):102386.

Detecção de anticorpos anti-Sm

Avaliação do novo teste EliA SmD^P-S

Sharon Veenbergen and Marco W.J. Schreurs

Laboratory Medical Immunology, Department of Immunology, Erasmus MC, University Medical Center Rotterdam, The Netherlands

Objetivo

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune caracterizada por inflamação crônica de múltiplos órgãos, incluindo pele, rins, articulações e sistema nervoso. Por causa das manifestações clínicas complexas e variadas, o diagnóstico preciso e oportuno pode ser um desafio. Uma característica marcante da doença é a presença de autoanticorpos específicos para autoantígenos, principalmente de origem nuclear. A detecção desses autoanticorpos tem valor significativo no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento dos pacientes. Os autoanticorpos contra dsDNA e Smith, ou anti-Sm, são muito específicos para o diagnóstico do LES e fazem parte dos critérios de classificação do LES. Os anticorpos anti-Sm são detectáveis em 5% -10% dos pacientes caucasianos com LES e 30% -40% em pacientes africanos, afro-americanos e asiáticos.

Esses autoanticorpos reagem com proteínas associadas ao complexo U1-snRNP/Sm, que compreende um spliceossomo de mamífero responsável pelo processamento do pré-mRNA no núcleo. Este complexo RNA-proteína é responsável pela remoção de sequências intrônicas e pela formação de mRNA maduro que pode ser traduzido em proteínas. O complexo de splicing consiste em três proteínas específicas de U1 (RNP70, A, C) e sete proteínas centrais comuns chamadas proteínas Smith (Sm) (B/B', D1, D2, D3, E, F, G). Os autoanticorpos contra a proteína SmD são considerados de valor significativo no diagnóstico de LES.

Thermo Fisher Scientific (TFS) oferece um teste sorológico totalmente automatizado para medir anticorpos anti-SmD para

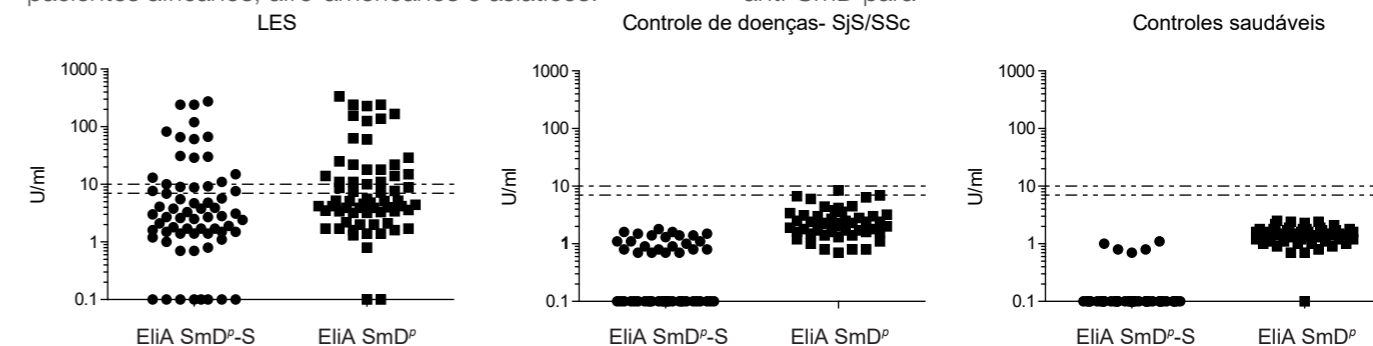


Figura 1. Desempenho diagnóstico do EliA SmD^P-S em comparação com o EliA SmD^P. O teste foi validado contra um total de 186 amostras de soro consistindo de pacientes com LES, controles de doença (síndrome de Sjögren / esclerose sistêmica) e indivíduos saudáveis. As linhas pontilhadas representam os pontos de corte de 7 e 10 U/ml.

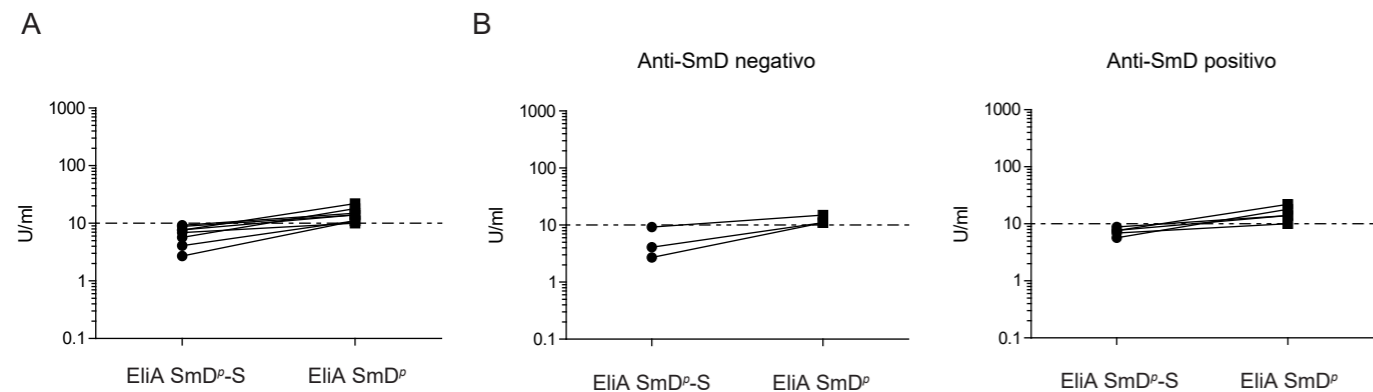


Figura 2. Resultados discrepantes na coorte de LES. (A) Discordância de resultados entre o teste EliA SmD^P-S e o teste EliA SmD^P. (B) Status anti-SmD dos resultados discrepantes. A linha pontilhada representa o ponto de corte de 10 U/ml.

auxiliar no diagnóstico de LES. Em 2012, a TFS introduziu o teste EliA SmD^P, que detecta anticorpos anti-Sm por meio do peptídeo sintético SmD3. Foi demonstrado que SmD3 representa o substrato mais sensível e específico para a detecção de anticorpos anti-Sm. Recentemente, a TFS desenvolveu o novo teste SmD^P-S, que novamente é um imunoenensaio baseado em peptídeo SmD3. De acordo com o TFS, no entanto, a ligação otimizada do peptídeo SmD3 ao poço EliA devido a um novo revestimento inovador leva a um aumento significativo na especificidade, enquanto a sensibilidade permanece a mesma. No presente estudo, avaliamos a acurácia diagnóstica desse novo teste SmD^P-S em pacientes previamente diagnosticados com LES.

Métodos

Para este estudo, 186 amostras de soro foram incluídas de indivíduos saudáveis (n = 50), pacientes previamente diagnosticados com LES (n = 65) ou pacientes com diagnóstico de síndrome de Sjögren / esclerose sistêmica (n = 50). As amostras de soro foram obtidas como parte da abrangente triagem diagnóstica de rotina em nosso Laboratório de Imunologia Médica (Erasmus MC, Holanda). Na coorte acima de pacientes com LES, o status anti-Sm foi determinado anteriormente usando um imunoblot, ELISA e / ou o teste EliA Sm. Além disso, 21 amostras de soro com um resultado de teste SmD falso positivo foram coletadas em todo o país

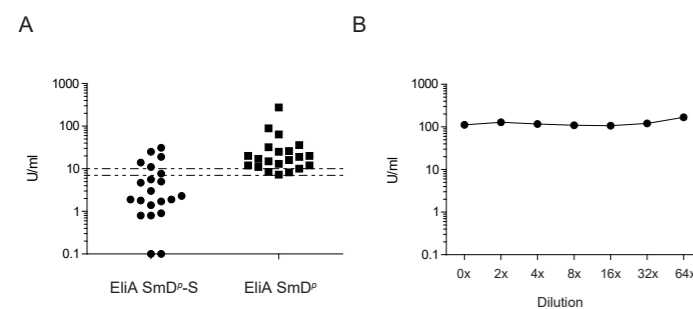


Figura 3. (A) Evaluation of false positive samples derived from non-SLE patients. (B) Linearity of the test by analyzing a SmD-positive sample and its serial dilutions at multiple concentrations.

ao longo do tempo e incluídos neste plano de validação, a fim de investigar a especificidade aprimorada do teste SmDP-S. Essas amostras foram derivadas de pacientes sem LES com resultados de teste negativos/ambíguos em 1 ou mais testes anti-Sm e um resultado de teste positivo no teste EliA SmDP. Todas as amostras acima foram medidas em paralelo usando o teste EliA SmDP-S e o teste EliA SmDP em um dispositivo Phadia250 de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliar a precisão do diagnóstico do teste, a sensibilidade e a especificidade foram calculadas em três pontos de corte diferentes. Além disso, a variação intra-ensaio (alvo ≤15%) e a variação inter-ensaio (alvo ≤20%) foram avaliadas como parte do procedimento de validação para determinar a precisão do teste. Para isso, as amostras em valores de corte (7-10 U / ml) foram medidas a cada 5 vezes em uma execução (variação intra-ensaio) ou uma vez em corridas separadas em 5 dias consecutivos (variação inter-ensaio). Finalmente, a interferência do fator reumatoide (FR) da classe IgM no teste SmDP-S foi estudada e a linearidade do teste foi avaliada pela análise de uma amostra SmD-positiva e suas diluições seriadas em múltiplas concentrações. Todos os participantes deram consentimento informado por escrito e o estudo foi aprovado pelo comitê de ética médica local.

Resultados

Comparação do SmD^P-S e SmD^P

Neste estudo, o novo EliA SmD^P-S foi avaliado e comparado com o EliA SmD^P atual. O teste foi validado contra um total de 186 amostras de soro obtidas anteriormente, consistindo de pacientes com LES, controles da doença e indivíduos saudáveis. Além disso, pacientes sem LES com um resultado falso positivo do EliA SmD^P foram incluídos para investigar a especificidade aprimorada do novo teste. O cut-off para resultados positivos, ambíguos e negativos foi baseado no intervalo de referência definido pelo TFS. Acima de 10 U/ml e abaixo de 7 U/ml foram definidos como resultados de teste positivos e negativos, respectivamente. Resultados entre 7 e 10 U/ml foram considerados ambíguos.

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade do EliA SmD^P-S e EliA SmD^P em três cut-offs diferentes.

	Cut-off 10		Cut-off 7		Cut-off 4	
	SmD ^P -S	SmD ^P	SmD ^P -S	SmD ^P	SmD ^P -S	SmD ^P
Sensibilidade	23.1%	35.4%	30.8%	43.1%	40.0%	61.5%
Especificidade	100%	100%	100%	99.0%	100%	92.0%
VPP	100%	100%	100%	96.6%	100%	83.3%
VPN	66.7%	70.4%	69.0%	72.8%	71.9%	78.6%

VPP=Valor Preditivo Positivo VPN=Valor Preditivo Negativo

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade do EliA SmD^P-S e EliA SmD^P após exclusão de falsos-positivos.

	Cut-off 10		Cut-off 7		Cut-off 4	
	SmD ^P -S	SmD ^P	SmD ^P -S	SmD ^P	SmD ^P -S	SmD ^P
Sensibilidade	24.2%	32.3%	30.6%	40.3%	38.7%	59,7%
Especificidade	100%	100%	100%	99.0%	100%	92.0%
VPP	100%	100%	100%	96.2%	100%	82.2%
VPN	68.0%	70.4%	69.9%	72.8%	72.5%	78.6%

VPP=Valor Preditivo Positivo VPN=Valor Preditivo Negativo

Tabela 3. Variação intra-ensaio e inter-ensaio do EliA SmD^P-S.

	Intra-ensaio		Inter-ensaio	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
Média	14.8	6.28	14	5.82
DP	0.45	0.33	1.41	0.66
CV (%)	3.02	5.33	10.10	11.29

DP=desvio padrão, CV=coeficiente de variação

Entre os 65 pacientes com LES, 15 pacientes eram SmD positivos e 5 pacientes apresentaram valores dentro da faixa ambígua usando o teste EliA SmD^P-S (Figura 1). Por outro lado, 23 pacientes foram positivos e 5 resultados estavam na faixa de 7-10 U/ml e relatados como duvidosos usando o teste EliA SmD^P. Em resumo, 23,1% e 35,4% de todos os pacientes tiveram resultados positivos com os testes SmD^P-S e SmD^P, respectivamente. Por sermos um centro de atendimento secundário / terciário, nossa coorte de LES é enriquecida para pacientes SmD-positivos, explicando a alta frequência em comparação com a prevalência geral de anticorpos anti-Sm em pacientes com LES. Entre os 50 controles da doença, todos os pacientes apresentaram resultados negativos com o EliA SmD^P-S, enquanto 1 paciente apresentou um resultado ambíguo com o teste EliA SmD^P. Além disso, nenhum dos indivíduos saudáveis apresentou resultado positivo em qualquer um dos testes. Com base nesses resultados, a sensibilidade e a especificidade foram determinadas em diferentes pontos de corte (Tabela 1). No geral, o novo teste EliA SmD^P-S tem uma sensibilidade menor do que o teste EliA SmD^P. No entanto, com um valor de corte inferior, um aumento na sensibilidade poderia ser obtido com o teste EliA SmD^P-S sem afetar a especificidade.

Entre os pacientes com LES (n = 65), houve 42 resultados concordantes negativos e 15 positivos concordantes. Pacientes com resultados de teste discordantes (n = 8)

foram negativos e positivos com o EliA SmDP-S e EliA SmDP, respectivamente (Figura 2A). Esta discrepância entre os dois testes SmD foi confirmada pelo laboratório Thermo Fisher Scientific em Freiburg. Para os pacientes com LES, uma avaliação diagnóstica de anti-Sm já havia ocorrido antes desta validação usando o imunoblot, ELISA e/ou o teste EliA Sm (original). Apenas 5 de 8 pacientes com resultados discrepantes pareceram ser verdadeiramente anti-Sm positivos, enquanto 3 pacientes foram relatados como anti-Sm negativo (Figura 2B). Neste estudo, confirmamos o estado anti-Sm relatado anteriormente com o QUANTA Lite Sm ELISA da INOVA (dados não apresentados). Em resumo, observou-se alto grau de concordância entre o SmD^P-S e o teste SmD^P. Enquanto o novo teste EliA SmDP-S produziu cinco resultados falsos negativos (7,7%) entre os resultados discrepantes, uma chance aumentada de produzir um resultado falso positivo (4,6%) foi observada para o teste EliA SmD^P.

O EliA SmD^P-S: um teste com alta especificidade

Essencialmente, os resultados falsos positivos obtidos com o teste EliA SmD^P irá influenciar adversamente a análise de sensibilidade descrita acima (Tabela 1). Por esse motivo, investigamos a sensibilidade do teste novamente após excluir esses três resultados falso-positivos. Um resumo dos resultados é mostrado na Tabela 2. No geral, uma sensibilidade e especificidade comparáveis podem ser alcançadas com o teste EliA SmD^P-S e o teste EliA SmD^P em um ponto de corte de 7 e 10 U/ml, respectivamente. De acordo com o TFS, a ligação otimizada do peptídeo SmD3 ao poço EliA leva a um aumento significativo na especificidade enquanto a sensibilidade permanece a mesma. Para investigar melhor a especificidade aprimorada do novo teste SmDP-S, medimos novamente as amostras de soro com um resultado de teste SmDP falso positivo que foram coletados em todo o país ao longo do tempo.

Destas amostras são falso-positivos derivados de pacientes sem LES, 15 de 21 pacientes tiveram resultados negativos, 5 foram positivos e 1 resultado do teste estava dentro da faixa equívoca usando o teste EliA SmD^P-S (Figura 3). Testes adicionais usando o ANA Profile-3 LIA (EUROIMMUN) confirmaram o status anti-Sm negativo, demonstrando que as amostras com anticorpos anti-SmD elevados podem ser consideradas como falso-positivas (dados não mostrados). Em resumo, em comparação com o EliA SmD^P, a especificidade do teste EliA SmD^P-S é consideravelmente maior em um ponto de corte de 10 U/ml (76%) e também de 7 U/ml (71%).

Com base nesta validação, pode-se concluir que a sensibilidade do novo EliA SmD^P-S é um pouco menor em comparação com o teste EliA SmD^P. No entanto, a sensibilidade do EliA SmD^P-S pode ser melhorada escolhendo um ponto de corte inferior. Em um ponto de corte de 7 U/ml, o EliA SmD^P-S exibe uma sensibilidade bastante semelhante em comparação com o EliA SmD^P com um ponto de corte de 10 U/ml. Além disso, testando amostras falso-positivas conhecidas, pudemos demonstrar que o novo EliA SmD^P-S apresenta especificidade substancialmente melhorada.

Características adicionais de desempenho

Na parte final desta validação, investigamos a variação intra-ensaio e inter-ensaio, linearidade das medições e interferência de RF de classe IgM para determinar a repetibilidade, precisão e robustez do ensaio. Primeiro, amostras em valores de corte (7-10 U/ml) foram medidos a cada 5 vezes em uma corrida ou uma vez em execuções separadas em 5 dias consecutivos, a fim de determinar os coeficientes intra-ensaio e inter-ensaio de variação, respectivamente. Conforme mostrado na Tabela 3, o O EliA SmD^P-S mostra uma variação intra e interensaio aceitável, pois os valores alvo para os coeficientes de variação intra e interensaio foram definidos como $\leq 15\%$ e $\leq 20\%$, respectivamente. Em seguida, avaliamos a interferência de RF de classe IgM diluindo uma amostra positiva de RF de IgM de alta concentração (> 200 UI/ml) com uma amostra de soro anti-SmD positivo

O teste EliA SmD^P-S não produziu um resultado falso-negativo, mostrando que o teste não é sensível à interferência de RF (dados não mostrados). Finalmente, a linearidade do EliA SmD^P-S foi determinada testando diluições em série de uma amostra de soro anti-SmD-positiva. Ao avaliar a linearidade do ensaio, é recomendado o uso de soro tipo O negativo sobre o diluente de amostra EliA para diluição da amostra. A Figura 3 mostra uma boa linearidade do ensaio em uma ampla faixa de diluições. Em resumo, o EliA SmD^P-S provou ter muito bons coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio, parecia ser insensível à interferência de RF de classe IgM e a linearidade foi claramente comprovada.

Conclusão

Coletivamente, o novo EliA SmD^P-S exibe uma especificidade mais alta do que o EliA SmD^P, o que é mais bem demonstrado testando amostras falso-positivas conhecidas. Em geral, o teste EliA SmD^P-S apresenta menor sensibilidade. No entanto, a sensibilidade pode ser melhorada escolhendo um ponto de corte inferior, sem afetar a especificidade. Nesta validação, o EliA SmD^P-S e o EliA SmD^P apresentam características de desempenho semelhantes e sensibilidade comparável em um ponto de corte de 7 e 10 U/ml, respectivamente. Conforme ilustrado por nossa população de pacientes de cuidados secundários/terciários, resultados ambíguos (7-10 U / ml) podem ser considerados positivos com o teste SmD^P-S para garantir uma melhor sensibilidade. Dependendo da população local de pacientes, no entanto, é recomendado verificar o ponto de corte ideal para o teste EliA SmD^P-S.

Reconhecimentos

Os autores agradecem a J.H.S.A.M. Kuijpers-Entrup pela contribuição técnica significativa para este estudo, e H.J. Bontkes (Amsterdam UMC, VU University Medical Center, Holanda), A.J.A. Lambeck (UMC Groningen, Holanda) e M. Schuijt (Slingeland Hospital Doetinchem, Holanda) por fornecerem amostras e suas valiosas contribuições.

Saiba mais em thermofisher.com/elia e allergyai.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C