

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Área de Concentração: Reumatologia

**Comparação do desempenho diagnóstico de
diferentes métodos de detecção de anticorpos anti-
ENA em pacientes com suspeita de doença difusa do
tecido conjuntivo**

Priscila Schmidt Lora

Porto Alegre

2009

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Área de Concentração: Reumatologia

**Comparação do desempenho diagnóstico de
diferentes métodos de detecção de anticorpos anti-
ENA em pacientes com suspeita de doença difusa do
tecido conjuntivo**

Priscila Schmidt Lora

Orientador: Ricardo Machado Xavier

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas

2009

1 L865C LORA, PRISCILA SCHMIDT

Comparação do desempenho diagnóstico de diferentes métodos de detecção de anticorpos anti-ENA em pacientes com suspeita de doença difusa do tecido conjuntivo / Priscila Schmidt Lora ; orient. Ricardo Machado Xavier. – 2009.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2009.

1. Doenças do tecido conjuntivo 2. Diagnóstico 3. Marcadores biológicos 4. Anticorpos antinucleares 5. Sensibilidade e especificidade I. Xavier, Ricardo Machado II. Título.

NLM: WD 375

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós ignoramos alguma coisa, por isso aprendemos sempre”.

Paulo freire

Agradecimentos

Gostaria de ter o dom da palavra para poder aqui retribuir a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização dessa etapa em minha vida. Não o tendo, me resta tentar em poucas frases dizer o que nem em infinitas palavras eu seria capaz.

Agradeço a minha família, por nunca me terem deixado eu desistir dos meus sonhos, por sua presença constante e por seu amor.

Ao Professor Ricardo Xavier por sua compreensão, paciência, atenção e por seu exemplo.

A Claudia Laurino, por ter sempre acreditado em mim, por dividir comigo seu conhecimento e por seu carinho infindável.

As colegas e amigas conquistadas nesse período. A Gabi e a Fer meu muito obrigada pela convivência e todo ensinamento a mim passado, por seu carinho e por todos momentos agradáveis que passamos juntas. A todas orientadas do Professor Xavier, Clarisse, Ana Paula, Patrícia Salim e em especial Patrícia Oliveira e Lidiane Filippin. Paty, muito obrigada por tudo, com certeza na divergência é onde mais crescemos. Lidi, não existem palavras para te agradecer, minha grande amiga e companheira para todas as horas. A Giovana, uma grande amiga.

Ao meu estagiário Bruno, por sua dedicação e por tudo que me ensinou.

Aos colegas do Serviço de Patologia Clínica. Maria Clara, Luiz e Marta pela atenção. Rosana, muito obrigada pelo carinho e palavras tranquilizantes nas horas difíceis. A todos colegas do setor de hematologia pela compreensão e pelo apoio na conclusão dessa dissertação.

Aos meus queridos amigos de colégio, Re, Matheus, Gabi, Daudt, Dê, André, Jung, Wally, Margão, Indara, Jú, Mari e Lú e as minhas queridas amigas de faculdade Juliana e Mirta torcedores constantes.

Ao meu namorado Ruter por sua presença em minha vida, por suas palavras, pela paciência, pelo carinho e por seu amor.

Sumário

RESUMO	12
ABSTRACT	15
2 INTRODUÇÃO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1 DOENÇAS DIFUSAS DO TECIDO CONJUNTIVO (DDTC).....	19
3.1.1 <i>Lúpus eritematoso sistêmico (LES)</i>	20
3.1.2 <i>Esclerose Sistêmica (ES)</i>	20
3.1.3 <i>Síndrome de Sjögren (SS)</i>	21
3.1.4 <i>Dermatomite (DM) e Polimiosite (PM)</i>	21
3.1.5 <i>Artrite Reumatóide (AR)</i>	22
3.1.6 <i>Doença Indiferenciada do Tecido Conjuntivo (DITC)</i>	22
3.2 AUTO-ANTICORPOS	22
3.2.1 <i>Fator antinuclear</i>	25
2.2.1.3 <i>Auto-anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA)</i>	26
3.3 ESTRUTURA, FUNÇÃO BIOLÓGICA E IMPORTÂNCIA CLÍNICA DOS ANTÍGENOS ENA. 27	
3.3.1 <i>Anti-Sm e Anti-RNP</i>	27
3.3.2 <i>Anti-SSA/Ro e Anti-SSB/La</i>	29
3.3.3 <i>Anti-Scl-70</i>	33
3.4 TÉCNICAS DE DETECÇÃO	35
3.4.1 <i>Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (IDD)</i>	35
3.4.2 <i>Enzimaimunoensaio (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA)</i> .	37
3.4.3 <i>Hemaglutinação Passiva (HA)</i>	40
3.4.4 <i>Western blot (WB)</i>	41
3.4.5 <i>Novos métodos</i>	42
3.4.6 <i>Desempenho Diagnóstico Comparativo entre as Técnicas</i>	43

4	JUSTIFICATIVA.....	50
5	OBJETIVOS DO ESTUDO.....	51
6	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA	52
7	ARTIGO CIENTÍFICO	60
8	CONCLUSÕES	75
9	ANEXOS.....	76

Lista de Abreviaturas

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

SPC: Serviço da Patologia Clínica

ACR: American College of Rheumatology

DDTC: doenças difusas do tecido conjuntivo

DMTC: doença mista do tecido conjuntivo

DITC: doença indiferenciada do tecido conjuntivo

DM: dermatomiosite

PM: polimiosite

AR: artrite reumatóide

ES: esclerose sistêmica

LES: lúpus eritematoso sistêmico

LID: lúpus induzido por drogas

SSp: síndrome de Sjögren primária

CREST: Calcinose, Fenômeno de Raynaud, Esôfago, Esclerodactilia, e
Telangiectasia

CD: cluster of differentiation

Ig: imunoglobulina

RNA: ácido ribonucleico

RNP: ribonucleoproteína

anti-CCP: auto-anticorpo contra peptídeo citrulinado cíclico

ENA: antígenos nucleares extraíveis

FAN: fator antinuclear

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (enzimaimunoensaio)

HA: hemaglutinação passiva

IDD: imunodifusão radial dupla

IFI: imunofluorescência indireta

LIA: linne immunoassay

WB: western blot

Figuras e Tabelas

TABELA 1: AUTO-ANTICORPOS ANTI-ENA: DOENÇAS ASSOCIADAS E PREVALÊNCIA	34
FIGURA 1 REPRESENTAÇÃO DOS AUTO-ANTÍGENOS RNP E SM	28
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DOS AUTO-ANTÍGENOS SSA/RO E SSB/LA.....	31
FIGURA 3A, 3B E 3C: DEMONSTRAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE IDD.....	36
FIGURA 4: DEMONSTRAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE ELISA.	39
FIGURA 5: DEMONSTRAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE HA.....	41
FIGURA 6: DEMONSTRAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE WB.....	42

Resumo

Nas doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) uma característica marcante é a produção de auto-anticorpos, com alta afinidade contra constituintes intracelulares e extracelulares, fazendo com que esses sejam marcadores específicos dessas doenças. No entanto, estes auto-anticorpos somente possuem significado clínico quando estão associados a outras manifestações de doença. A pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA) é usada para identificação de um grupo desses auto-anticorpos que inclui o anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm e o anti-Scl-70. Os anti-ENAs podem ser detectados por diversos métodos, como contra-imunoeletroforese (CIE), *western blot* (WB), imunodifusão radial dupla (IDD), ensaio imunoenzimático (ELISA) e hemaglutinação passiva (HA). Entretanto existe importante variabilidade nos resultados observados entre essas técnicas, pois elas divergem em sensibilidade e especificidade, e são escassos os estudos comparativos abordando o desempenho diagnóstico em DDTC. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o desempenho diagnóstico dos métodos ELISA, HA e IDD na determinação de auto-anticorpos anti-ENA em DDTC.

Em pacientes acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com solicitação de pesquisa da presença de anti-ENA encaminhada ao Serviço da Patologia Clínica (SPC/HCPA), foi determinada a presença ou ausência dos auto-anticorpos pelos métodos de HA, ELISA e IDD. Foram calculados os parâmetros: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo,

valor preditivo negativo, razão de verossimilhança positiva e negativa utilizando a presença ou ausência de DDTC como referência. O diagnóstico de uma DDTC era determinado por critérios diagnósticos específicos a partir da revisão do prontuário dos pacientes, realizada num período de 6 a 12 meses após solicitação do exame por um reumatologista cegado aos objetivos do estudo. Foram incluídas como DDTC: lúpus eritematoso sistêmico (LES), esclerose sistêmica (ES), síndrome de Sjögren primária (SSp), dermatomiosite (DM), polimiosite (PM), artrite reumatóide (AR) e doença indiferenciada do tecido conjuntivo (DITC).

Encontrou-se uma alta prevalência de DDTC na amostra (69%), o que sugere boa adequação da solicitação do exame. O diagnóstico mais comum na amostra foi de LES 78/189 (41.3%). Sensibilidade e especificidade das técnicas para a presença de DDTC foram: ELISA 50% e 78,9%; IDD 31,3% e 89,5%; HA 40,9% e 87,7%. Os valores preditivo positivos foram: HA - 88,5%; IDD - 87,2% e ELISA - 84,6%. Os valores preditivo negativos foram: ELISA - 40,5%; HA - 39,1% e IDD - 36,2%. HA teve a razão de verossimilhança positiva mais alta 3,33 e ELISA teve a razão de verossimilhança negativa mais baixa 0,76. IDD, como esperado, teve menor sensibilidade para detectar DDTC, ao contrário da ELISA (mais sensível). Baseado resultados semelhantes dos valores preditivos (positivo e negativo), nós acreditamos que, ao menos em uma moderada a alta probabilidade pré-teste, que é a recomendada para solicitar esse teste, não há diferença significativa na interpretação do resultado dentre os métodos estudados.

Palavras-chave: Doenças difusas do tecido conjuntivo, anti-ENA, sensibilidade, especificidade.

Abstract

Autoantibodies produced against cellular components are a hallmark of autoimmune connective tissue diseases (CTDs), being specific markers of these diseases. However these autoantibodies are clinically useful only when associated with other disease manifestations. Testing for autoantibodies to extractable nuclear antigens (ENAs) is used to identify a group of autoantibodies which includes anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm e o anti-Scl-70. Anti-ENA antibodies can be detected by several methods like, counterimmunoelectrophoresis (CIE), immunoblot (IB), double immunodifusion (DID), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and passive haemagglutination (HA). However there is an important variability in results observed between theses techniques, because they diverge in sensitivity and specificity, and there are few comparative studies evaluating their diagnostic performance for CTDs. The aim of the present study was to evaluate the performance of DID, ELISA and HA for anti-ENA antibodies detection in patients CDTs.

Testing for the presence of anti-ENA antibodies was performed by HA, ELISA and DID in sera from patients followed in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre with a request from the attending physician sent to the Clinical Pathology Service of HCPA (SPC/HCPA). Sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value and positive and negative likelihood ratios (LR) were calculated using the presence or absent of a CTD as reference. Presence of a CTD was determined by chart review by diagnosis

criteria, performed between 6 and 12 months after the test was ordered by a rheumatologist blinded to study objectives. As a CTD were included the following diseases: systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), dermatomyositis/polymyositis (DM/PM)(1), systemic sclerosis (SSc), rheumatoid arthritis (RA) and undifferentiated connective disease (UCTD).

We found 69% of the patients having a CTD, which points to an adequate test ordering by the attending physicians. SLE was the most common clinical condition, present in 78 of the 189 patients studied (41.3%). Sensitivity and specificity of the techniques for the presence of CTD were: ELISA 50% and 78.9%; DID 31.3% and 89.5%; HA 40.9% and 87.7%. Positive predict values were: HA – 88.5%; DID – 87.2% and ELISA – 84.6%. Negative predict values were: ELISA – 40.5%; HA – 39.1% e IDD – 36.2%. HA had the highest positive LR (3.33), while ELISA had the lowest negative LR (0.63). DID, as expected, had a low sensitivity to detect ARD, in contrast with ELISA, which was the most sensitive, but least specific. Based on the very similar predictive test values (PPV and NPV), we believe that, at least in a moderate to high pre-test probability - which is the recommended situation for ordering a diagnostic test - there are no significant differences on the interpretation of test results when using ELISA, HA and DID for ENA detection.

Key word: Connective tissue diseases, anti-ENA, sensitivity, specificity.

2 INTRODUÇÃO

As doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC) formam um grupo variado de doenças que incluem o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a esclerose sistêmica (ES), a síndrome de Sjögren (SS), a dermatomiosite (DM) e polimiosite (PM) e a artrite reumatóide (AR). Existem manifestações específicas de cada doença, mas alguns sintomas e quadros clínicos são comuns a várias patologias desse grupo (2). Nas doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC), uma importante característica é a produção de auto-anticorpos, como os auto-anticorpos contra antígenos nucleares extraíveis (ENA). Associações clínicas desses auto-anticorpos com as DDTC provêm de técnicas tradicionais, como a imunodifusão radial dupla (IDD), que vêm sendo substituídas na rotina dos laboratórios de análises clínicas por outras técnicas, como enzima-imunensaio (ELISA) e hemaglutinação passiva (HA). Entretanto, existem evidências apontando para diferenças no desempenho diagnóstico dessas novas técnicas em relação aos métodos tradicionais baseados em gel. A maior sensibilidade da técnica de ELISA tem reflexo negativo sobre algumas definições já conhecidas do papel diagnóstico de auto-anticorpos anti-ENA. Por exemplo, o anti-Sm, que é altamente específico para o LES – critério diagnóstico estabelecido pelo *American College of Rheumatology* (ACR) – parece perder valor preditivo positivo na utilização de técnicas mais sensíveis (3).

O objetivo do presente estudo foi comparar a performance de diferentes técnicas usualmente empregadas para a detecção de auto-anticorpos anti-ENA

em uma coorte de pacientes com suspeita de doenças difusas do tecido conjuntivo.

Este projeto contou com o apoio financeiro do FIPE (Fundo de Investimento a Pesquisa e Eventos do HCPA) e do CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCPA, sob o número 06-606.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doenças Difusas do Tecido Conjuntivo (DDTC)

Doenças auto-imunes resultam de ativação do sistema imune contra o próprio organismo, por uma falha ou interrupção dos mecanismos normalmente responsáveis por manter a auto-tolerância imunológica (4). Fatores genéticos e ambientais são contribuintes para o processo. Apesar de escassos os dados de prevalência de doenças auto-imunes reumáticas, em 1990 foi estimado que 2,8% da população americana sofriam de artrite ou alguma doença auto-imune reumática (5).

As doenças auto-imunes podem ser divididas em órgão-específicas, como diabetes melito tipo I, miastenia gravis e tireoidite de Hashimoto, ou podem ser classificadas como sistêmicas, onde está inserida grande parte das doenças auto-imunes reumáticas, também chamadas de doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC), como o lúpus eritematoso sistêmico (LES), a esclerose sistêmica (ES), a síndrome de Sjögren (SS), a dermatomiosite (DM) e polimiosite (PM) e a artrite reumatóide (AR) (6).

As DDTCs compreendem um grupo de doenças caracterizadas pelo envolvimento de múltiplos órgãos e evidência de auto-imunidade. A classificação das doenças reumáticas sistêmicas é uma difícil tarefa, tendo em vista que o conhecimento sobre fisiopatologia e etiologia é ainda limitado, sendo o diagnóstico feito a partir de quadros clínicos sindrômicos (7). A seguir uma breve descrição das DDTC que será o foco do presente trabalho.

3.1.1 Lúpus eritematoso sistêmico (LES)

LES é uma doença inflamatória crônica, multissistêmica, de causa desconhecida e natureza auto-imune, que pode afetar a pele, as articulações, os rins, os pulmões, o sistema nervoso central além de diversos outros órgãos e sistemas (8). É caracterizada pela presença de diversos auto-anticorpos. Dentre os 11 critérios estabelecidos pelo ACR para o diagnóstico de LES estão presentes fator anti-nuclear, auto-anticorpos anti-DNA e auto-anticorpos anti-Sm (9, 10). Tem maior prevalência no sexo feminino, podendo chegar a 10 mulheres afetadas para cada homem (11, 12). Envolvimento de fatores genéticos é demonstrado por concordância de doença entre gêmeos homozigotos (14 a 57%) (13, 14), desenvolvimento de LES em familiares de pacientes com a doença (5 a 12%) (15) e presença de fator anti-nuclear em filhos de mães com LES (16). Fatores ambientais, como vírus e radiação ultravioleta, também estão relacionados com o desenvolvimento e agravamento da doença (17-21). Acomente 40 a 150 casos para cada 100.000 habitantes (5, 11).

3.1.2 Esclerose Sistêmica (ES)

ES é um distúrbio multissistêmico do tecido conjuntivo de etiologia desconhecida caracterizado pela deposição de colágeno na pele e órgãos internos. Os aspectos chaves da doença são: auto-imunidade, inflamação e vasculopatia disseminada. Pode apresentar-se de duas maneiras principais: forma difusa, que é caracterizada por rápida e progressiva fibrose da pele, pulmões e outros órgãos internos, e a forma limitada, que é caracterizada por

manifestações vasculares e por fibrose limitada e de lenta progressão da pele e de órgãos (22). As duas formas de apresentação da doença possuem marcadores sorológicos específicos. Auto-anticorpos anti-scl-70 (ou topoisomerase I) estão associados a forma difusa enquanto auto-anticorpos anticentrômero são mais freqüentes nos pacientes acometidos pela forma limitada da doença (23). Sua prevalência é de 20 casos para cada 100.000 habitantes (5).

3.1.3 Síndrome de Sjögren (SS)

SS é uma doença auto-imune inflamatória de progressão lenta. As glândulas exócrinas dos pacientes são destruídas pela infiltração de células T auto-reativas. Pode-se diferenciar em dois tipos: primária, forma isolada, sem a presença de outra doença de tecido conjuntivo, e secundária, onde os sintomas são acompanhados de outra doença do tecido conjuntivo, como AR, LES e ES (24). Auto-anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, fator reumatóide e fator anti-nuclear estão presentes nos critérios de classificação estabelecidos para o diagnóstico de SS (25). Sua prevalência é de 33 casos para cada 1000 habitantes (24).

3.1.4 Dermatomite (DM) e Polimiosite (PM)

Essas doenças afetam cerca de 0,6-1/100.000 habitantes (26), têm como alvo o tecido muscular, com inflamação e fraqueza. DM atinge adultos e crianças, associada à erupção cutânea e acompanhada de fraqueza muscular, enquanto a PM pode ser definida como uma miopatia isolada e parece estar mais restrita à vida adulta (26).

3.1.5 Artrite Reumatóide (AR)

AR apresenta uma frequência de 10 casos para cada 1.000 habitantes (5). É uma doença auto-imune sistêmica, com inflamação crônica de articulações levando à destruição da articulação e complicações sistêmicas. Não existe um teste único para diagnosticar AR. Investigações laboratoriais iniciais incluem hemograma com contagem diferencial de leucócitos, fator reumatóide, velocidade de sedimentação globular e proteína C-reativa. Anticorpos contra peptídeos citrulinados (anti-CCP) possuem alta especificidade e valor preditivo positivo, no entanto estão presente em menos de 60% dos pacientes com AR (27).

3.1.6 Doença Indiferenciada do Tecido Conjuntivo (DITC)

O diagnóstico de DITC está atrelado ao julgamento médico de pacientes que têm quadro clínico de doença difusa do tecido conjuntivo, mas não preenchem os critérios diagnósticos pré-estabelecidos para nenhuma doença específica. Não existe um consenso para o diagnóstico desses pacientes. Uma coorte americana identificou os diagnósticos mais comuns presentes nessa patologia, dentre eles FAN positivo, síndrome de fibromialgia-símile, fenômeno de Raynaud e poliartrite sem causa (28). Existe pouca informação sobre a sua prevalência.

3.2 Auto-anticorpos

Nas DDTC uma das principais características é a produção de auto-anticorpos que reconhecem com alta afinidade antígenos próprios

intracelulares, extracelulares ou componentes funcionais da superfície celular, os quais seriam expostos ao sistema imune como, por exemplo, durante os processos de morte celular (apoptose ou necrose) (29-34).

A apresentação de auto-antígenos é parte da seleção natural dos linfócitos, que acontece no timo (linfócitos T) ou na medula óssea (linfócitos B), e tem como objetivo o desenvolvimento da autotolerância, ou seja, a ausência de reatividade dessas células contra antígenos próprios (4). Na apoptose, antígenos intracelulares são expostos e podem sofrer modificações na sua estrutura por situações diversas, como processos inflamatórios, exposição à radiação ultravioleta, oxidação de componentes celulares ou clivagem por granzimas B, não sendo mais reconhecidos como próprios, levando à quebra da autotolerância e, conseqüentemente, auto-imunidade. Os auto-antígenos citrulinados - marcadores sorológicos específicos para a artrite reumatóide - são exemplos desta teoria, gerados pela mudança conformacional provocada pela modificação do aminoácido arginina para citrulina, associado ao estresse oxidativo ou apoptose durante o processo inflamatório da doença ou por estímulos ambientais, como o tabagismo (32, 34).

O mimetismo molecular, definido por reação cruzada entre antígenos microbianos e próprios, é talvez a forma mais conhecida de explicar a relação entre infecções e o desenvolvimento de doenças auto-imunes (35). No entanto, a geração dos auto-anticorpos nas DDTTC, apesar pouco esclarecida, parece resultar de uma resposta imune antígeno-dirigida, e não apenas de mimetismo molecular (34).

Auto-anticorpos também estão presentes em indivíduos saudáveis. São normalmente imunoglobulinas IgM polirreativas que reconhecem bactérias, vírus, fungos e auto-antígenos. Conhecidos também como auto-anticorpos naturais, são produzidos normalmente por linfócitos B CD5+. Por possuírem capacidade de se ligar a diversos microorganismos, acabam por ter um importante papel na homeostase do sistema imune e na seleção do repertório de linfócitos B circulantes (34).

Em um estudo de caso-controle multicêntrico entre pacientes com AR, SSprimária, ES, LES e indivíduos saudáveis, Tan *et al.* demonstraram a presença de Fator anti-nuclear (FAN) em 13,3% dos controles (título de 1:80) (33). No Brasil, um estudo feito em doadores de banco de sangue 22,6% (113/500) apresentavam FAN positivo sendo 20,4% com título de 1:80 (36). Auto-anticorpos anti-ENA também já foram encontrados em 10% de uma amostra de doadores de sangue (37).

Abruckle *et al.* avaliaram a presença de auto-anticorpos em soros de controles sadios e pacientes com LES obtidos antes desses terem desenvolvido a doença. Dos pacientes com LES, 78% tinham FAN positivo com títulos de 1:120 ou superiores, 55% anti-SSA/Ro, 47% anti-SSB/La, 34% anti-Sm e 32% anti-RNP com média de 3,4 anos antes do estabelecimento do diagnóstico. Anti-SSA/Ro e anti-SSB/La precederam o diagnóstico da doença antes de anti-Sm e anti-RNP. Dentre os pacientes controles, somente 3,8% apresentaram algum auto-anticorpo (38).

Em um estudo feito na população de 120 pacientes lúpicos do Rio Grande do Sul, Brenol JC identificou a seguinte frequência de positividade dos auto-anticorpos: FAN - 117 (97,5%); anti-DNA - 54 (45%); anti-Sm - 29 (24,2%); anti-RNP - 41 (34,2%); anti-SSA/Ro - 41 (34,2%) e anti-SSB/La - 31 (25,8%) (39).

A afinidade de auto-anticorpos em determinadas doenças auto-imunes permite que eles sejam utilizados como biomarcadores específicos e sensíveis dessas doenças.

3.2.1 Fator antinuclear

A pesquisa do Fator Antinuclear (FAN), cujo nome historicamente refere-se ao fato dos primeiros auto-antígenos observados serem direcionados contra estruturas nucleares e nucleolares (30), teve sua origem no fenômeno da célula LE (lúpus eritematoso) (40). Em 1957, Holborow *et al.* (41) desenvolveram a técnica de imunofluorescência indireta (IFI), cujo princípio é a ligação dos anticorpos a epitopos das células, sendo a detecção feita por um anticorpo secundário marcado com substâncias fluorescentes e a análise em microscópio de fluorescência. Posteriormente, Beck (42), usando cortes histológicos de fígado de rato, demonstrou os padrões de imunofluorescência como homogêneo, pontilhado e nucleolar nos núcleos dessas células quando incubadas com soros de pacientes com uma variedade de doenças reumáticas.

A ausência de uma nomenclatura definida para a descrição dos laudos acarretou problemas na utilização clínica e laboratorial do teste, pelas dificuldades no controle de qualidade e na padronização dos resultados.

Embora alguns padrões fossem similares, recebiam denominações diferentes. Em 2000 houve a iniciativa da formação do primeiro Consenso Brasileiro para Padronização dos Laudos de FAN em células HEp-2. Especialistas brasileiros em FAN reuniram-se e definiram consensualmente a denominação e caracterização para os distintos padrões: nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e aparelho mitótico (42). Foram feitas recomendações sobre os critérios para a leitura de uma lâmina, titulações e o sistema óptico utilizado, bem como foi proposta uma padronização para a redação dos laudos.

Em 2003 houve um segundo consenso (43), onde se validaram os algoritmos de decisão para leitura dos padrões do FAN na IFI vistos na primeira edição do Consenso Brasileiro, adicionando ainda um novo algoritmo relacionado com os padrões mistos. Tentou-se estabelecer as possíveis associações de cada padrão com uma doença específica ou manifestação clínica.

Por sua alta sensibilidade, a técnica de FAN por IFI tem como papel primordial o rastreamento de auto-anticorpos no soro do paciente, direcionado contra antígenos presentes no núcleo, nucléolo e citoplasma (30, 44-47). Para posterior identificação desses auto-antígenos, se faz necessários outros testes, como o estudo de auto-antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA).

2.2.1.3 Auto-anticorpos anti-antígenos nucleares extraíveis (anti-ENA)

Os auto-antígenos nucleares melhores caracterizados são os antígenos nucleares extraíveis (ENA). O nome do grupo originou-se nos métodos

originais onde os antígenos solúveis em água eram extraídos do núcleo das células do timo de coelho ou de tecidos de baço humano (43).

Os ENA são compostos por um grupo heterogêneo de complexos moleculares formados por ribonucleoproteínas e proteínas não ligadas a histonas, com diferentes funções sobre o metabolismo celular (29, 30, 44-48).

A pesquisa de ENA é usada para identificação de um grupo de auto-anticorpos específicos que inclui o anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm, anti-Scl-70 e anti-Jo-1. A detecção dos auto-anticorpos anti-ENA tem prestado importante contribuição em diferentes aspectos, como marcadores diagnósticos, indicadores de prognóstico e no monitoramento da atividade das doenças auto-imunes (6, 29, 30, 49, 50). No entanto, estes auto-anticorpos somente possuem significado clínico quando estão associados à presença de outras manifestações de doença (29).

3.3 Estrutura, função biológica e importância clínica dos antígenos ENA.

3.3.1 Anti-Sm e Anti-RNP

Lerner e Steitz em 1979 (51) demonstraram que os auto-anticorpos anti-Sm e anti-RNP eram capazes de imunoprecipitar pequenas moléculas de RNA nuclear (*small nuclear ribonuclein particles* – snRNPs), componentes nucleares responsáveis pelo *splicing* - retirada de íntrons do RNA pré-mensageiro para produzir o RNA mensageiro (mRNA) durante o processo de transcrição.

O auto-antígeno Sm é composto por três proteínas B/B' (28/29KDa), D (16 KDa) e E (13KDa), e o auto-antígeno RNP também por três proteínas A

(33KDa), D (22KDa) e 70KDa (Tan 1989; von Muhlen and Tan 1995) ambos associados a snRNPs (figura 1). A parte antigênica da molécula é protéica, bioquimicamente podem estar associados a uma mesma molécula de snRNP, mas os auto-anticorpos produzidos têm especificidades diferentes. O padrão de IFI de FAN associado a esses auto-antígenos é nuclear pontilhado grosso (52).

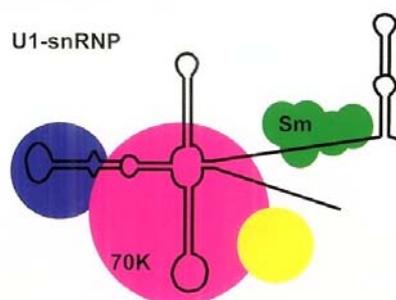


Figura 1 Representação dos auto-antígenos RNP e Sm, ambos associados a snRNPs (53).

O sistema antígeno-anticorpo Sm foi caracterizado em pacientes com LES (54), enquanto o sistema RNP foi caracterizado em pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC) e LES (46) (tabela 1). O auto-antígeno Sm foi um dos primeiros auto-antígenos não ligados a histonas identificados. Tan e Kunkel (54), através da utilização de técnicas de imunodifusão radial dupla (IDD) e imunoeletroforese, identificaram uma frequência de 75% de anti-Sm em soros de pacientes com LES. Anti-Sm apresenta em torno de 99% de especificidade para LES (50).

Em uma população de pacientes com LES acompanhados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brenol identificou uma frequência de 24,2% de positivities de anti-Sm e 34,2% de positividade de anti-RNP (39).

Embora anti-Sm seja um bom marcador sorológico para LES, não há evidência da relação entre a presença dos auto-anticorpos anti-Sm e anti-RNP com a gravidade da doença. Nyman *et al.* (55) demonstram haver uma correlação entre níveis de anti-RNP/Sm e a atividade da doença nos pacientes com LES identificados pela técnica de *western blot*. Estes achados não foram confirmados por ter Borg *et al.* 1991 (56) que utilizaram a técnica de ELISA com antígenos recombinantes. Estudos anteriores utilizando hemaglutinação passiva (HA) e imunodifusão radial dupla (IDD) também não encontraram variações nos níveis séricos de anti-Sm/RNP em diferentes estágios da doença nos pacientes com LES (50).

Em uma coorte de pacientes com DMTC, de Rooij *et al.*, 1990 (57) analisaram a flutuação dos níveis de auto-anticorpos anti-RNP nestes pacientes através da utilização um kit de ELISA com proteína recombinante de 70KDa e não encontraram correlação entre níveis de anticorpos e gravidade da doença.

3.3.2 Anti-SSA/Ro e Anti-SSB/La

SSA/Ro e SSB/La fazem parte de um complexo formado por três proteínas associadas a quatro RNAs de função desconhecida chamadas YRNAs (hY1, hY2, hY3 e hY5), sendo uma proteína relativa a SSB/La de 48KDa, e duas proteínas relativas a SSA/Ro de 60KDa (Ro60) e de 52KDa (Ro52) (55) (figura 2). Sua localização intracelular é controversa, podendo estar presente no núcleo ou no citoplasma. Os auto-anticorpos anti-SSA/Ro e anti-

SSB/La apresentam o padrão de IFI nuclear pontilhado fino no teste de FAN (43).

A proteína SSB/La se associa transitoriamente a RNA polimerase III, ligando-se aos precursores de RNA, com função de estabilizar essas moléculas e facilitar a digestão exonuclear, garantindo a tradução de proteínas (63-65).

O auto-antígeno SSB/La foi o primeiro auto-antígeno a ser descrito em pacientes com LES e SS (tabela 1). O nome La tem origem no primeiro paciente em que o auto-anticorpo foi descoberto e SSB é uma referência à SS, onde tem alta prevalência. A proteína La se associa transitoriamente à RNA polimerase III, ligando-se aos precursores de RNA, com função de estabilizar essas moléculas e facilitar a digestão exonuclear, garantindo a tradução de proteínas (58-60).

A fração SSA/Ro é complexada com o auto-antígeno SSB/La em uma fosfoproteína nuclear que se liga transitoriamente a RNAs, incluindo YRNAs (66)

O auto-antígeno SSA/Ro tem demonstrado ter função na sobrevivência da célula após radiação ultravioleta. Camundongos com deficiência da proteína Ro60 desenvolvem uma síndrome semelhante ao lúpus, com auto-anticorpos contra cromatina e ribossomos, glomerulonefrite e fotossensibilidade. Por esses achados, acredita-se que uma função de prevenção da auto-imunidade esteja atribuída à essa proteína (61).

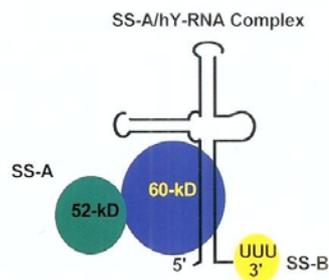


Figura 2: Representação dos auto-antígenos SSA/Ro e SSB/La, ambos associados às snRNPs (53).

Auto-anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La foram inicialmente encontrados em alta frequência em pacientes com SS e LES e em baixa frequência em pacientes com outras doenças reumáticas sistêmicas (tabela 1) (44). No estudo de Arbulke *et al.*, citado anteriormente, os auto-anticorpos anti-SSA/Ro foram os que estavam expressos por mais tempo antes das primeiras manifestações do LES, estado presente em até 10 anos antes do desenvolvimento da doença em 47% desses pacientes (38). Brenol, identificou em 34,2% dos 120 pacientes lúpicos do HCPA estudados a presença de anti-SSA/Ro e em 25,8% a presença de anti-SSB/La (39).

As maiores associações clínicas relacionadas ao auto-anticorpo dirigido contra SSA/Ro são lúpus cutâneo e o lúpus neonatal - condição clínica em que recém-nascidos apresentam manifestações como bloqueio cardíaco congênito, fotossensibilidade, citopenias e inflamação hepática devido a auto-anticorpos anti-SSA/Ro ou anti-SSB/La que atravessam a placenta (44, 50). Por exemplo, em uma coorte histórica, Jaeggi *et al.* avaliou retrospectivamente 37 bloqueio cardíaco congênito, desses 92% (33/37) tinham auto-anticorpos anti-SSA/Ro

positivo, mas somente 5 mães tinham histórico prévio de diagnóstico de doença auto-imune (62).

Por LIA pode-se observar a presença de anticorpos isoladamente contra as porções Ro52 e Ro60 (tabela 1). Entretanto, não existe consenso sobre a importância clínica da distinção de duas porções antigênicas. Em estudo realizado por Langguth *et al.* em 2007 (63) foi avaliada a prevalência isolada do auto-anticorpo anti-Ro52 em uma população de 1438 soros encaminhados para identificação de auto-anticorpos anti-ENA. Os autores encontram somente 0,5% dos pacientes com este auto-anticorpo e questionaram os métodos desenvolvidos para testar a presença isolada de auto-anticorpos anti-SSA/Ro contra porção 52KDa.

Peene *et al.* numa coorte de pacientes com DDTC identificou que a presença de anti-Ro60 com ou sem anti-Ro52 relata uma forte probabilidade de diagnóstico de LES, e anti-Ro60 juntamente com anti-Ro52 indica fortemente a presença de SS (64).

Alguns autores relatam que mesmo utilizando células HEp-2 como substrato para o teste FAN, o que confere alta sensibilidade para detecção de auto-antígenos ENA, é possível encontrar pacientes com auto-anticorpos anti-SSA/Ro e um teste FAN negativo (65, 66). Em um trabalho prévio desenvolvido por nosso grupo, de 90 pacientes com anti-ENA positivo, (correspondente ao período de dois anos de pacientes encaminhados ao Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre com solicitação de anti-ENA),

61 (67,7%) eram anti-SSA/Ro positivos e todos também foram positivos para o teste FAN (67).

3.3.3 Anti-Scl-70

Auto-anticorpos dirigidos contra o auto-antígeno Scl-70 (ou Topoisomerase I) foram identificados por Douvas *et al.* em 1979 como marcadores específicos de ES. O auto-antígeno Scl-70 inicialmente foi descrito como sendo uma proteína não ligada a histona de peso molecular de 70 KDa. Hoje, após o uso de proteínas inibidoras de proteólise, estima-se que seu peso seja em torno de 100 a 1005 KDa. O padrão de imunofluorescência do FAN que corresponde a presença desse auto-anticorpo é nucleolar e nucleolar pontilhado fino (52, 68). A função dessa enzima é na modificação das formas topológicas do DNA, facilitando a transcrição gênica (69).

Inicialmente, através do uso da técnica de IDD estes auto-anticorpos foram identificados em 20% dos pacientes com ES (64). Em seguida foi demonstrado serem bons marcadores de forma difusa da doença (prevalência de 75%) (63) (tabela 1). Sua presença tem sido associada com pior prognóstico e maior incidência de complicações pulmonares.

Tabela 1: Auto-anticorpos anti-ENA: doenças associadas e prevalência

Doença Associada	IDD	Prevalência (%)			CIE	Referências
		WB	ELISA	HA		
Anti-Sm						
LES	7 – 75	30-35	10 -50	15-32	10-35	(49, 54, 70-85)
LID				0	10	(80, 86)
DM/PM					0	(75, 85)
AR	0		0-23	0-0,5	0-47	(71, 77, 78, 80, 81, 86, 87)
ES			21-25	0	0	(71, 75, 77, 80, 87)
SS			12			(78)
DMTC	0		8-26		0	(77, 79, 88)
DDTC		36	16			(89)
Anti-RNP						
DMTC	71-100	80-85	95-100	100	90-100	(49, 57, 79, 83, 88-91)
LES	10-30	30-40	20-60	3-26	18	(49, 54, 70-73, 80-83, 90-92)
AR	0		7	10%	0-76	(71, 75, 83, 86, 87)
SS			10	4	6	(75, 79, 83)
CREST				9		(75)
DM/PM			9		2	(71, 75)
DDTC		32,8	31,2			(89)
Anit-SSB/La						
SS		90-95	75-85		70-80	(49)
LES	15	30-35	20-30		10-15	(49, 54, 64, 70-73, 90)
LC	6-24					(64)
AR	0	14	22			(64, 71)
DMTC					100	(90)
DDTC		26	29			(89)
Anti-SSA/Ro						
SS	90-97	70-85	90-97			(49)
LES	33-61,4	10-15	30-60		25-30	(49, 54, 64, 70-73, 90)
LC	6					(64)
AR	2	4	28			(64, 71)
DMTC					100	(90)
DDTC		58	49			(89)
Anti-Scl-70						
ESp		30-48	30-45			(49, 93)
ESd	20	41	43			(94)
CREST	13					(50)
LES	0	11-27,5	20-32			(49, 93, 95)
SS			2,7			(96)
DDTC	0	8-44	26			(89)

Legenda: LES: lúpus eritematoso sistêmico, LID: lúpus induzido por drogas, LC: lúpus cutâneo SS: síndrome de Sjögrens, AR: artrite reumatóide, ESp: esclerose sistêmica forma progressiva, ESd: esclerose sistêmica forma difusa, CREST: Calcinose, Fenômeno de Raynaud, Esôfago, Esclerodactili, e Telangiectasia, DDTC: doença difusa do tecido conjuntivo, DM: dermatomiosite, PM: polimiosite. Anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La: auto-anticorpos ENA. IDD: imunodifusão radial dupla, WB: *western blot*, ELISA: enzimaímunoensaio, HA: hemaglutinação passiva, CIE: contra-imunoeletroforese.

3.4 Técnicas de Detecção

Os auto-anticorpos anti-ENA podem ser detectados por diversos métodos, como contra-imunoelectroforese (CIE), *western blot* (WB), imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (IDD), enzimaímmunoensaios (ELISA) e hemaglutinação passiva (HA) (3, 49). Entretanto, pesquisas têm sugerido que o uso de diferentes métodos levaria a variação nos estudos de desempenho diagnóstico, pois essas técnicas divergem em sensibilidade e especificidade (97). Dentre as técnicas mais frequentemente empregadas atualmente estão IDD, ELISA, HA.

3.4.1 Imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (IDD)

A imunodifusão radial dupla de Ouchterlony (IDD) foi o primeiro método a ser empregado na rotina laboratorial e a partir de seu uso foram realizados os estudos iniciais de sensibilidade e especificidade dos auto-anticorpos anti-ENA para as DDTC (43, 48).

O método foi descrito por Ouchterlony em 1947 (98) e permite a comparação de vários sistemas antigênicos. Nesta técnica o antígeno e o anticorpo migram juntos em um gel de agarose até formarem uma linha de precipitação que indica a positividade para o determinado anticorpo (figura 1). A formação da linha de precipitação depende de diversos parâmetros, mas de forma geral pode-se dizer que é dada pela difusão natural das moléculas sobre um gel de agarose. Essa movimentação é lenta, podendo levar de 24h a 72h, o que acaba sendo uma desvantagem da técnica, (3). Para a visualização e interpretação correta das linhas de precipitação resultantes da reação

antígeno-anticorpo é necessário um técnico com experiência. Linhas inespecíficas (que cruzam nas extremidades) não representam reação específica e não podem ser consideradas como resultado positivo.

Nesta técnica, para que um paciente apresente auto-anticorpos detectáveis, é necessário que estes estejam presentes em alta concentração, o que não é necessário no ELISA, por exemplo, que apresenta um sistema de amplificação do sinal emitido pela formação do imunocomplexo. Isso faz com que a IDD seja considerada como uma técnica de alta especificidade, no entanto com baixa sensibilidade (99). Mesmo que a IDD tenha sido uma técnica amplamente utilizada no passado, seu uso continuado no futuro é improvável tendo em vista as dificuldades técnicas, tempo prolongado, impossibilidade de automação e a dificuldade para visualização das linhas de precipitação (100).

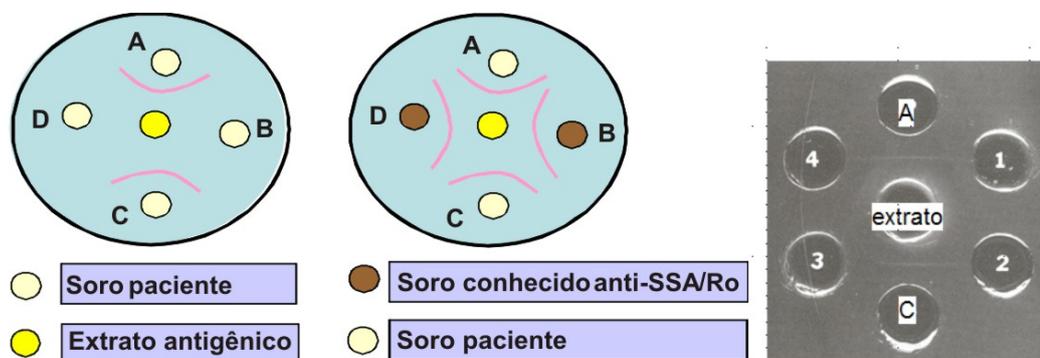


Figura 3a, 3b e 3c: Demonstração de uma reação de IDD. Pacientes A e C apresentam linhas de precipitação, ou seja, resultado do teste positivo para a presença de anticorpos.

3.4.2 Enzimaimunoensaio (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA)

ELISA é um método imunoenzimático desenvolvido para determinação tanto de anticorpos quanto de antígenos (figura 2). Para a realização do teste é necessária a purificação de antígenos ou de anticorpos, dependendo do que se deseja pesquisar. O mais comum é a utilização de ELISA para a pesquisa de anticorpos, neste caso uma fonte antigênica pura se faz necessária (101).

Antígenos ou anticorpos são fixados em uma fase sólida que pode ser constituída por vários constituintes dentre eles o poliestireno que é o mais comum. Conforme explicado abaixo na figura 4, a detecção dos antígenos ou anticorpos presentes na amostra é dada pela formação de cor resultante da degradação do substrato enzimático. Assim, na técnica de ELISA ocorre uma amplificação do sinal gerado pela ligação antígeno-anticorpo e isso permite com que o teste detecte concentrações extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos (102).

Como consequência dessa amplificação de sinal, a origem dos antígenos utilizados na preparação dos kits comerciais de ELISA tem papel importante na sensibilidade e especificidade diagnóstica e clínica. Caso a fonte antigênica seja impura, poderá ocorrer detecção de uma ligação antígeno-anticorpo inespecífica, levando a uma baixa especificidade técnica e isso pode classificar o paciente como reagente a um determinado antígeno ou anticorpo levando a uma tomada de decisão errônea. Kapogiannis *et al.* (103) relataram diferenças na prevalência de resultados positivos quando utilizados dois kits de

ELISA para detecção de auto-anticorpos anti-ENA (anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-nRNP/Sm) que diferiam na origem antigênica (humana e bovina) em uma população de pacientes com DDTc. Os autores concluíram que a fonte antigênica humana era superior à bovina por apresentar maior prevalência de resultados positivos e melhor sensibilidade clínica.

Entre os fatores que podem interferir no método, a escolha do substrato antigênico é uma das mais importantes. É necessário sempre se optar pelo antígeno mais puro possível, ou seja, aquele que vai gerar a menor quantidade de reações antígeno-anticorpo inespecíficas. Baseado nessa desvantagem, se deve ter cuidado com o grande número de resultados falso-positivos (104).

A técnica de ELISA conquistou papel importante para a detecção de anti-ENAs nos laboratórios clínicos. Segundo Locke e Unsworth (3, 105), mais de 50% dos laboratórios registrados na *UK National External Quality Assessment Schemes* relatam utilizar ELISA para essa análise (3).

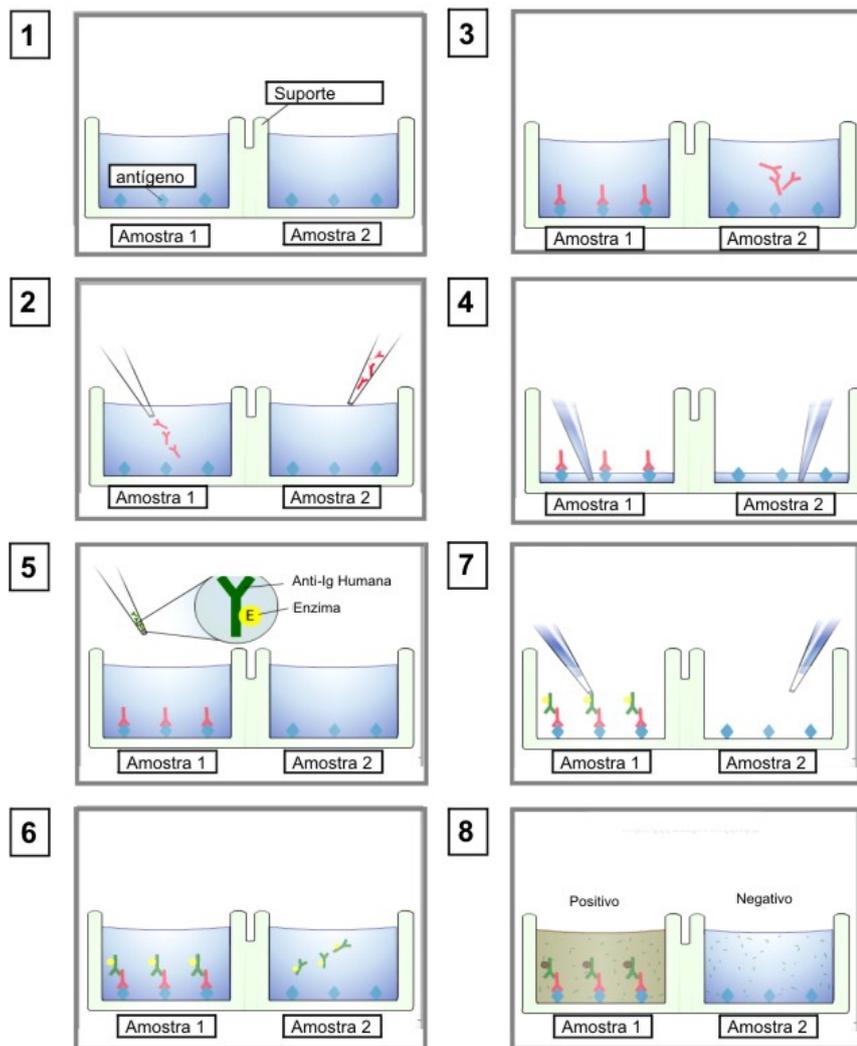


Figura 4: Demonstração de uma reação de ELISA. O teste é feito sobre uma placa que possui poços onde estão fixados os antígenos que possuem identidade imunológica com os anticorpos que se desejam pesquisar (1). O primeiro passo é incubar essa placa com o soro do paciente (2,3). Em seguida é feita a lavagem, para que somente permaneçam no poço os anticorpos que se ligaram aos antígenos fixados na placa (4). Uma segunda incubação é feita com um anti-anticorpo humano que é ligado a uma enzima capaz de degradar um substrato e gerar cor (5). Esse anticorpo secundário vai se ligar ao anticorpo do paciente, caso ele esteja presente (6). Novamente é feita uma lavagem (7). Por fim, se adicionada ao sistema um substrato enzimático complementar à enzima que está ligada ao anticorpo secundário, se esse estiver presente irá degradar o substrato gerando cor (8). Isso significa que houve a ligação do anticorpo secundário ao anticorpo do paciente e também que houve a ligação do anticorpo do paciente ao antígeno fixado à placa. Esse teste é quantitativo, uma vez que a coloração é proporcional à quantidade de anticorpo presente (33).

3.4.3 Hemaglutinação Passiva (HA)

Hemaglutinação Passiva (HA) é classificado como um método de aglutinação, caracterizados pela formação de agregados visíveis como resultado da interação de anticorpos específicos e antígenos fixados a partículas insolúveis. Na HA, são utilizadas normalmente hemácias de carneiro do tipo O, sensibilizadas por adsorção.

Apesar da superfície da hemácia facilitar a adsorção de antígenos, o uso desse suporte para o teste imunológico pode acarretar em interferências como a presença de anticorpos heterófilos, que são anticorpos e auto-anticorpos naturais polireativos contra uma gama diversa de antígenos e componentes químicos e em geral demonstram baixa afinidade e fraca ligação (106). Ou também, reação inespecífica a outros componentes presentes naturalmente na superfície dessas células. Tratamentos químicos para retirada de possíveis interferentes são uma ferramenta utilizada para aumentar a especificidade analítica do teste, bem como o uso de fontes antigênicas puras (102).

HA é um método sensível para detecção de auto-anticorpos anti-ENA, não envolve procedimentos complexos, tampouco equipamentos de alto custo (figura 5). Esse método já foi mais usado nas rotinas laboratoriais, mas vem sendo substituído pelo ELISA. Poucos estudos comparativos de métodos para detecção de anti-ENA abordaram a hemaglutinação passiva (3, 107).

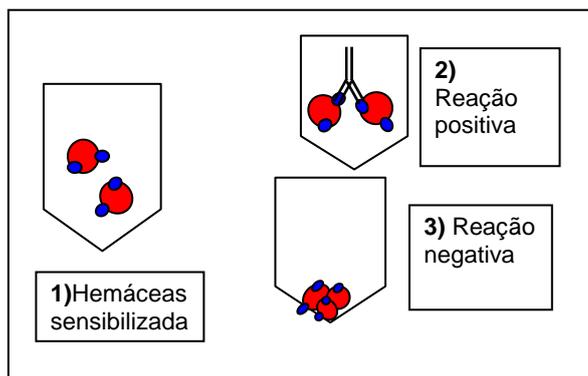


Figura 5: Demonstração de uma reação de HA. Hemáceas fixadas com antígenos são incubadas com soro do paciente em um placa com fundo côncavo (1). Na presença de anticorpos no soro as hemáceas ficam suspensas pela presença de imunocomplexos (2) e na ausência as hemáceas aglutinam no fundo do poço, gerando o “botão de hemáceas” (3).

3.4.4 Western blot (WB)

O *western blot* (WB) fornece informação a respeito do peso molecular relativo do antígeno estudado. Esta técnica é baseada na separação eletroforética de proteínas. Após a eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida, ocorre a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose que vai servir de suporte para reação imunológica (figura 6). Um dos principais problemas é a degradação protéica do extrato celular, que pode interferir na interpretação do teste. (50, 108, 109)

O uso do WB para detecção de antígenos nucleares extraíveis foi essencial para caracterização bioquímica destes antígenos e para determinação da especificidade dos anticorpos dirigidos contra eles (50). Algumas empresas têm produzido kits comerciais de WB para detecção de auto-anticorpos anti-ENA. Este método tem apresentado a desvantagem de ter

uma sensibilidade baixa. Uma possível explicação para essa questão seria a limitação apresentação conformacional linear dos epítomos na membrana de nitrocelulose, o que torna esse método pouco viável para a rotina laboratorial na reumatologia (43).

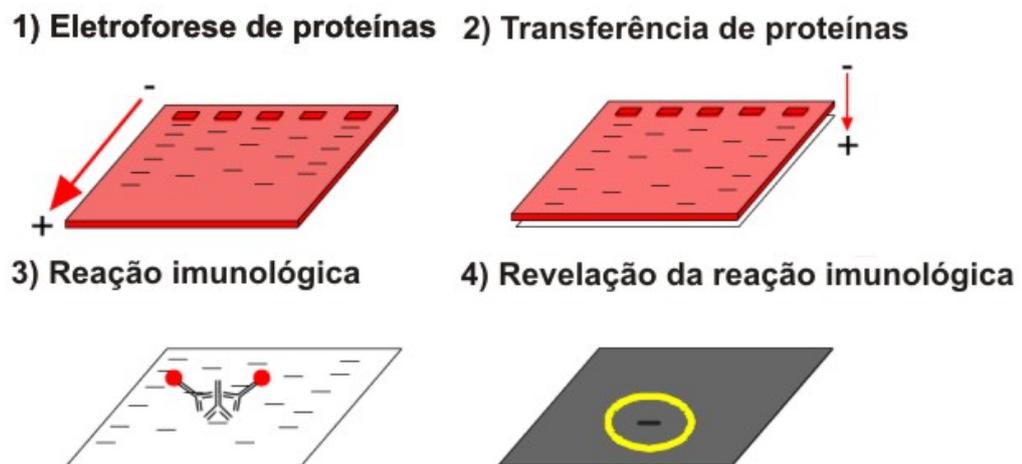


Figura 6: Demonstração de uma reação de WB. Um extrato de proteínas (contendo os antígenos-alvos que se deseja detectar) é separado por eletroforese em um gel de poliacrilamida (1). As proteínas contidas no gel são transferidas para um suporte, por exemplo uma membrana de nitrocelulose (2). Sobre o suporte contendo as proteínas de interesse se faz a reação imunológica (3) que pode ser revelada de inúmera maneira, um exemplo é a degradação do sinal quimioluminescente em um filme virgem de raios-X (4).

3.4.5 Novos métodos

A possibilidade de se analisar a expressão de diversas proteínas ao mesmo tempo é uma das maiores vantagens dos novos métodos utilizadas na identificação dos auto-anticorpos nas DDTC (*multiplexed technologies*).

Estes ensaios têm sido divididos em duas categorias, os que utilizam superfície planar como sistema de *western blot* linear (LIA), que tem apresentado um nível de acurácia diagnóstica igual ou superior aos métodos de imunodeteção convencionais, e ensaios não planares, incluindo os ensaios que utilizam micropartículas reconhecidas por nefelometria, fluorimetria ou citometria. Atualmente algumas marcas disponibilizam no mercado essas tecnologias, vantagens no uso são o pouco volume de amostra necessário para realização do teste, o curto tempo no procedimento e a alta sensibilidade. No entanto, são ainda minorias na rotina laboratorial reumatológica e necessitam de padronização, especialmente para se determinar o valor diagnóstico da sua presença nas DDTc (110).

3.4.6 Desempenho Diagnóstico Comparativo entre as Técnicas

Diversos estudos compararam o desempenho diagnóstico entre as técnicas de detecção de anticorpos anti-ENA.

Menyam *et al.* (111), em um estudo numa população de 53 pacientes acometidos com DDTc, compararam a detecção dos auto-anticorpos anti-Sm e anti-RNP entre dois kits comerciais de ELISA e a HA. Anti-Sm teve uma prevalência de 16,9% em uma marca de ELISA e 13,2% em outra marca, que foi idêntica à prevalência de anti-Sm por HA (13,2%). Anti-RNP estava presente em 10 dos 53 soros quando pesquisados por HA (18,8%), mas pelos kits de ELISA apresentaram mais pacientes positivos (22,6% e 24,5%). Além desses auto-anticorpos o trabalho também avaliou a detecção de anti-SSA/Ro e anti-SSB/La através dos métodos de IDD e os dois kits de ELISA dos mesmos

fabricantes. As prevalências se mantiveram semelhantes, anti-SSA/Ro 37,7% (IDD) contra 35,8% e 32% (ELISA) e anti-SSB/La 15,0% (IDD) contra 16,9% e 13,2% (ELISA). Nesse estudo foi concluído haver um alto grau de concordância entre a utilização de HA, IDD e ELISA para detecção de anti-Sm, anti-RNP, anti-SSA/Ro e anti-SSB/La. Não foram relatados dados clínicos dos pacientes, impossibilitando o cálculo de sensibilidade e especificidade diagnóstica dessas técnicas para detecção de DDTC.

Bruder *et al.* (112) objetivaram padronizar a técnica de CIE para a detecção de anti-ENA através da comparação entre as técnicas de CIE, ELISA e IFI. Nesse estudo foram avaliados 40 pacientes com diagnóstico de DDTC e 10 pacientes normais (controles). CIE se mostrou mais sensível que ELISA. Esse estudo avaliou um pequeno número de pacientes e uma técnica pouco utilizada por laboratórios de rotina (CIE).

Manoussakis *et al.* (113) avaliaram cinco métodos distintos para identificação de anti-SSA/Ro em 93 pacientes com DDTC diagnosticada (28 pacientes com SS, 26 com LES e 39 com AR) além de 25 indivíduos saudáveis. As técnicas utilizadas foram CIE, ELISA, dois métodos de WB e precipitação de RNA. Nenhum indivíduo do grupo controle apresentou anti-SSA/Ro por nenhuma das técnicas estudadas. Precipitação de RNA foi o método mais sensível dentre os estudados, apresentando uma frequência de positividade de: 61% para SS; 65% (17/26) para LES; 49% (19/39) para AR. ELISA estava presente em 14/28 pacientes com SS (50%), 12/26 pacientes com LES (46%) e 14/39 pacientes com AR (36%).

Orton *et al.* (114) analisaram o comportamento de três kits de ELISA e dois kits de imunodifusão dupla para a detecção de anti-ENA. No estudo foram relatadas: alta sensibilidade e alta especificidade para detecção dos auto-anticorpos houve uma concordância alta (superior a 90%) entre os métodos analisados. No entanto a condição clínica dos pacientes não foi levada em consideração para esta análise. Além disso, as comparações foram feitas utilizando o método de IDD como referência e ainda assim na discussão os autores relatam não haver um método ideal para detecção de anti-ENA.

Peene *et al.* (64) comparam os métodos de LIA e IDD para detecção de auto-anticorpos anti-SSA/Ro (utilizando os dois auto-antígenos como substrato, Ro52 e Ro60) e anti-SSB/La em 181 pacientes com diversas DDTC, como LES, SSprimária, ES, AR e DM. Aparentemente, IDD teve maior valor diagnóstico que LIA.

Fei *et al.* (89) em um estudo multicêntrico entre cinco laboratórios italianos demonstraram diversidade da prevalência de auto-anticorpos anti-ENA pelo uso de um kit comercial de WB e quatro de ELISA. Foram analisados 25 soros de pacientes com diagnósticos de DDTC (8 LES, 1 lúpus discóide, 11 SS, 2 PM, 1 DM, 2 DMTC). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência dos auto-anticorpos ENA quando utilizados kits de ELISA. Entretanto a variação interlaboratorial com a utilização de WB foi alta (concordância de 73%), o que levou os autores a concluir que para realização dessa técnica é necessária maior experiência na interpretação dos resultados. Uma limitação do WB é a apresentação dos antígenos que fica limitada na forma linear, ao contrário de IDD e ELISA, que apresentam os

antígenos na sua estrutura conformacional e linear (49). Os autores salientam a falta de padronização na identificação de auto-anticorpos anti-ENA e reforçam que o valor diagnóstico de um teste sorológico pode sofrer alterações não só por diferentes métodos utilizados, mas também pelo local onde o teste é realizado.

Singh *et al.* (75) avaliaram a presença de auto-anticorpos anti-ENA, por IDD e CIE, em pacientes com DDTTC e indivíduos normais. As frequências de auto-anticorpos anti-ENA encontradas foram 40% para os pacientes com LES (n = 191); 36,4% para os pacientes com DMTC (n = 44); 27,8% para os pacientes com SS (n = 18); 10,6% para os pacientes com ES (n = 66) e 2,7% para os pacientes com AR (n=78).

Delpech *et al.* (76) através de uma comparação entre diferentes métodos (CIE, ELISA e WB) avaliaram a presença de auto-anticorpos anti-Sm, anti-RNP e anti-SSB/La em 64 pacientes com LES. Por ELISA, as frequências dos auto-anticorpos encontradas foram 25% (anti-Sm), 36% (anti-RNP) e 15% (anti-SSB/La). Não foram identificados pacientes positivos para WB ou CIE com um resultado de ELISA negativo, mas houve pacientes com WB negativo e ELISA positivo, comprovando a maior sensibilidade da técnica de ELISA já previamente descrita na literatura. Nesse trabalho o autor avaliou somente pacientes com LES e não avaliou a presença do auto-anticorpo anti-SSA/Ro.

Pourmand *et al.* (66) investigaram a presença de anti-SSA/Ro por WB e ELISA em uma população de 64 soros previamente negativos para o teste FAN (66). No teste de WB, 65% eram positivos para a porção do antígeno anti-

SSA/Ro correspondente à proteína de 52KDa (Ro 52), 28% para a porção correspondente à proteína de 60KDa (Ro 60) e 15% eram positivos para as duas porções. Todos positivos para WB foram positivos também por ELISA.. Dos 64 pacientes envolvidos no estudo, 12 preenchiam os critérios necessários para o diagnóstico de LES e oito desses apresentavam anti-Ro52.

Langguth *et al.* (63) avaliaram a anti-Ro52 por CIE, ELISA e LIA. Dos 1438 soros submetidos para realização de anti-ENA, a presença de anti-Ro52 sem anti-Ro60 foi relatada em 12 pacientes. Os quadros clínicos desses 12 pacientes eram SS (2), LES (1), PM (1), Hepatite C (2), transplante hepático (1), AR (2), Neuropatia (1), ES (1), Hepatite crônica (1). Os autores concluem que a determinação isolada de anti-Ro52 não trouxe benefício clínico significativo.

Maddison *et al.* (71) comparam os métodos de WB, IDD e ELISA para identificação de auto-anticorpos anti-ENA em um estudo de caso-controle entre uma população de pacientes com DDTC e pacientes controles saudáveis. Os autores relataram uma maior sensibilidade de técnica de ELISA, mas baixa especificidade.

A diversidade das técnicas utilizadas atualmente pelos laboratórios para detecção de auto-anticorpos anti-ENA é fator que complica enormemente a interpretação clínica dos resultados liberados, mesmo para o especialista. Como podemos observar na revisão dos estudos comparativos entre os métodos, existe significativa variabilidade no desempenho diagnóstico entre as técnicas e até mesmo entre os locais de realização da mesma técnica.

Um claro exemplo é a determinação do auto-anticorpo anti-Sm em pacientes com suspeita de LES. Quando realizado pelo método de IDD seu resultado era de grande valor ao clínico, sendo considerado um dos critérios estabelecidos pelo ACR para o diagnóstico de LES. No entanto com a utilização de métodos mais sensíveis como ELISA, pode-se encontrar um maior número de falsos-positivos, confundindo a definição da doença (49).

De maneira geral, os relatos apontam uma maior sensibilidade para os métodos de ELISA e HA, e maior especificidade para a IDD e WB. Entretanto, destacamos que os estudos empregaram, na maioria das vezes números de pacientes relativamente pequenos, com desenho de série de casos ou estudos de casos e controles, os quais não são considerados os mais apropriados para avaliação do desempenho diagnóstico na prática clínica, pois avaliam populações de pacientes com presença de doença bem definida (115). Esses estudos são úteis em fases mais iniciais de desenvolvimento dos testes, mas devem ser sucedidos por estudos de coorte avaliando pacientes onde haja suspeita clínica da doença, sem que o diagnóstico esteja estabelecido (116). Somente dessa forma pode-se ter uma idéia mais clara do real desempenho diagnóstico do teste na prática clínica. Na nossa revisão da literatura, notamos um número muito escasso de estudos avaliando o desempenho das diversas técnicas de detecção de anticorpos anti-ENA em uma população com suspeita de DDTc, o que limita seriamente a interpretação dos resultados desses testes.

Refletindo essa escassez de dados empíricos, são muito limitadas as recomendações dirigidas aos clínicos sobre como interpretar esses testes. O

consenso Europeu para detecção de auto-anticorpos intracelulares sugere o uso de duas técnicas para detecção de auto-anticorpos anti-ENA, sendo inicialmente feito um método de alta sensibilidade, seguido por um segundo de alta especificidade (3, 49, 117). Ainda que uma estratégia tecnicamente plausível, o custo elevado dessa rotina provavelmente inviabilizaria a idéia na maioria dos locais, além de ter uma relação custo-benefício bastante questionável.

Em uma série de artigos apresentando diretrizes do Colégio Americano de Reumatologia para uso clínico de diversos anticorpos anti-ENA, incluindo recomendações para uso de anti-RNP e anti-Sm no LES (118), nenhum apresentou recomendações específicas para o clínico de como deve interpretar os resultados de cada um dos métodos. Em outro artigo de recomendações sobre interpretação de auto-anticorpos anti-ENA publicado pela Sociedade Italiana de estudos de doenças auto-imunes fica sugerido para determinação de auto-anticorpos anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP e anti-Sm o uso dos métodos CIE, ELISA, LIA ou IDD. E os autores ressaltam que a estratégia para escolha do método depende da situação clínica, custo do teste, tempo para obtenção do resultado e expertise dos técnicos envolvidos na análise. (119).

4 JUSTIFICATIVA

Há clara necessidade de melhor avaliação do valor clínico do resultado dos testes anti-ENAs realizados pelos distintos métodos empregados atualmente nos laboratórios de análises clínicas. Conforme discutido acima, existem variações na determinação laboratorial dos auto-anticorpos anti-ENA que podem gerar idéias conflitantes para o clínico na decisão diagnóstica. Muitos trabalhos realizados de comparação de métodos não levaram em consideração o valor preditivo das técnicas. Essa avaliação requer o desenvolvimento de estudos que avaliem o desempenho desses testes em grupos de pacientes onde haja razoável suspeita clínica de doença, no caso em questão, de doenças difusas do tecido conjuntivo.

5 OBJETIVOS DO ESTUDO

1. Comparar a sensibilidade e a especificidade de três métodos distintos (IDD, ELISA, HA) de imunodeteccção de auto-anticorpos anti-ENA para o diagnóstico de doenças difusas do tecido conjuntivo;

2. Avaliar o desempenho diagnóstico (valores preditivos positivo e negativo e razões de verossimilhança positiva e negativa) desses métodos em uma população de pacientes com suspeita clínica de doença difusa do tecido conjuntivo.

6 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol*. 1995 Apr;22(4):668-74.
2. Mosca M, Tani C, Bombardieri S. Undifferentiated connective tissue diseases (UCTD): a new frontier for rheumatology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007 Dec;21(6):1011-23.
3. Lock RJ, Unsworth DJ. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol*. 2001 Mar;54(3):187-90.
4. Abul K, Abbas AHL. *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004.
5. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum*. 1998 May;41(5):778-99.
6. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet*. 2004 May 8;363(9420):1544-6.
7. Lee SJ KA. 4. Autoimmunity, vasculitis, and autoantibodies. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 117(2 Suppl Mini-Primer):S445-50.
8. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2008 Feb 28;358(9):929-39.
9. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1997 Sep;40(9):1725.
10. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1982 Nov;25(11):1271-7.
11. Chakravarty EF, Bush TM, Manzi S, Clarke AE, Ward MM. Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis Rheum*. 2007 Jun;56(6):2092-4.
12. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 1999 Sep;11(5):352-6.
13. Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Weksler ME, Fotino M, et al. Proceedings: Twin studies in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum*. 1975 May-Jun;18(3):285.
14. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1992 Mar;35(3):311-8.
15. Murashima A, Fukazawa T, Hirashima M, Takasaki Y, Oonishi M, Nijjima S, et al. Long term prognosis of children born to lupus patients. *Ann Rheum Dis*. 2004 Jan;63(1):50-3.
16. Tsao BP, Cantor RM, Kalunian KC, Chen CJ, Badsha H, Singh R, et al. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*. 1997 Feb 15;99(4):725-31.

17. Blomberg J, Nived O, Pipkorn R, Bengtsson A, Erlinge D, Sturfelt G. Increased antiretroviral antibody reactivity in sera from a defined population of patients with systemic lupus erythematosus. Correlation with autoantibodies and clinical manifestations. *Arthritis Rheum.* 1994 Jan;37(1):57-66.
18. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994 Apr 1;179(4):1317-30.
19. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Risk factors for development of systemic lupus erythematosus: allergies, infections, and family history. *J Clin Epidemiol.* 2002 Oct;55(10):982-9.
20. Elkon K. Autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1995 Sep;7(5):384-8.
21. Lehmann P, Holzle E, Kind P, Goerz G, Plewig G. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol.* 1990 Feb;22(2 Pt 1):181-7.
22. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest.* 2007 Mar;117(3):557-67.
23. Andrade LL, PG. Auto-Anticorpos na Esclerose Sistêmica (ES). *Rev Bras Reumatol.* 2004;44(3):215-23.
24. Fox RI. Sjogren's syndrome. *Lancet.* 2005 Jul 23-29;366(9482):321-31.
25. Vitali C, BS, MH, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum.* 1993;36:340-7.
26. Dalakas MC, Hohlfield R. Polymyositis and dermatomyositis. *Lancet.* 2003 Sep 20;362(9388):971-82.
27. Majithia V, Geraci SA. Rheumatoid arthritis: diagnosis and management. *Am J Med.* 2007 Nov;120(11):936-9.
28. Alarcón G. Unclassified or Undifferentiated Connective Tissue Diseases. In: Wilkins LW, editor. *Clinical primer of rheumatology.* Philadelphia; 2003. p. 393.
29. Tan EM. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell.* 1991 Nov 29;67(5):841-2.
30. Tan EM. Molecular biology of nuclear autoantigens. *Adv Nephrol Necker Hosp.* 1993;22:213-36.
31. Tampoia M, BV, Fontana A, Zucano A, Morrone LF, Pansini NA. Application of a combined protocol for rational request and utilization of antibody assays improves clinical diagnostic efficacy in autoimmune rheumatic disease. *Arch Pathol Lab Med.* 2007;131(1):112-6.
32. Graham KL, Utz PJ. Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2005 Sep;17(5):513-7.
33. Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1601-11.
34. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008 Sep;4(9):491-8.

35. Christen U, von Herrath MG. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(14-15):1113-20.
36. Fernandez S.A., Lobo A.Z., Oliveira Z.N., Fukumori L.M., AM P.r., E.A. R. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2003;58:315-9.
37. Struckmann J, Worning P, Manthorpe R, Bendixen G. Detection of antibody against extractable nuclear antigen by an enzyme-linked immuno-sorbent assay. Results from patients with rheumatic and internal medical diseases. *Allergy*. 1985 Aug;40(6):442-6.
38. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*. 2003 Oct 16;349(16):1526-33.
39. Brenol J. Frequencia dos auto-anticorpos antinucleares e suas associações com manifestações clínico-laboratoriais, numa população de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1994.
40. Hargraves MM. Discovery of the LE cell and its morphology. *Mayo Clin Proc*. 1969 Sep;44(9):579-99.
41. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J*. 1957 Sep 28;2(5047):732-4.
42. Beck JS. Variations in the morphological patterns of "autoimmune" nuclear fluorescence. *Lancet*. 1961 Jun 3;1:1203-5.
43. Cook L. New methods for detection of anti-nuclear antibodies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1998 Sep;88(3):211-20.
44. Fritzler MJ, Salazar M. Diversity and origin of rheumatologic autoantibodies. *Clin Microbiol Rev*. 1991 Jul;4(3):256-69.
45. Tan EM. Interactions between autoimmunity and molecular and cell biology. Bridges between clinical and basic sciences. *J Clin Invest*. 1989 Jul;84(1):1-6.
46. Tan EM. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol*. 1989;44:93-151.
47. Tan EM. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Apr 5;815:1-14.
48. Tan EM, Fritzler MJ, McDougal JS, McDuffie FC, Nakamura RM, Reichlin M, et al. Reference sera for antinuclear antibodies. I. Antibodies to native DNA, Sm, nuclear RNP, and SS-B/La. *Arthritis Rheum*. 1982 Aug;25(8):1003-5.
49. Phan TG, Wong RC, Adelstein S. Autoantibodies to extractable nuclear antigens: making detection and interpretation more meaningful. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Jan;9(1):1-7.
50. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum*. 1995 Apr;24(5):323-58.
51. Lerner MR, Steitz JA. Antibodies to small nuclear RNAs complexed with proteins are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Nov;76(11):5495-9.

52. Dellavance Alessandra, G. Júnior Alexandre, Cintra Alice F.U., Ximenes Antônio C., Nuccitelli Barbara, H. TB. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2. *Rev Bras Reumatol.* 2003;43(3).
53. Bradwell AR SR, Johnson GD. Atlas of HEp-2 patterns. Birmingham: KNP Group Ltd; 1995.
54. Tan EM, Kunkel HG. Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1966 Mar;96(3):464-71.
55. Nyman U, Lundberg I, Hedfors E, Wahren M, Pettersson I. IgG and IgM anti-snRNP reactivity in sequentially obtained serum samples from patients with connective tissue diseases. *Ann Rheum Dis.* 1992 Dec;51(12):1307-12.
56. ter Borg EJ, Horst G, Limburg PC, van Venrooij WJ, Kallenberg CG. Changes in levels of antibodies against the 70 kDa and a polypeptides of the U1RNP complex in relation to exacerbations of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1991 Mar;18(3):363-7.
57. de Rooij DJ, Habets WJ, van de Putte LB, Hoet MH, Verbeek AL, van Venrooij WJ. Use of recombinant RNP peptides 70K and A in an ELISA for measurement of antibodies in mixed connective tissue disease: a longitudinal follow up of 18 patients. *Ann Rheum Dis.* 1990 Jun;49(6):391-5.
58. Mathews MB, Francoeur AM. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol.* 1984 Jun;4(6):1134-40.
59. Reddy R, Henning D, Tan E, Busch H. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). *J Biol Chem.* 1983 Jul 10;258(13):8352-6.
60. Wolin SL, Cedervall T. The La protein. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:375-403.
61. Wolin SL, Reinisch KM. The Ro 60 kDa autoantigen comes into focus: interpreting epitope mapping experiments on the basis of structure. *Autoimmun Rev.* 2006 Jul;5(6):367-72.
62. Jaeggi ET, Fouron JC, Silverman ED, Ryan G, Smallhorn J, Hornberger LK. Transplacental fetal treatment improves the outcome of prenatally diagnosed complete atrioventricular block without structural heart disease. *Circulation.* 2004 Sep 21;110(12):1542-8.
63. Langguth DM, Morris S, Clifford L, Wilson RJ, Neil J, Hogan PG, et al. Specific testing for "isolated" anti-52 kDa SSA/Ro antibodies during standard anti-extractable nuclear antigen testing is of limited clinical value. *J Clin Pathol.* 2007 Jun;60(6):670-3.
64. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: the range of associated diseases differs according to the detailed serotype. *Ann Rheum Dis.* 2002 Dec;61(12):1090-4.
65. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem.* 2002 Dec;48(12):2171-6.
66. Pourmand N, Blomberg S, Ronnblom L, Karlsson-Parra A, Pettersson I, Wahren-Herlenius M. Ro 52kD autoantibodies are detected in a subset of ANA-negative sera. *Scand J Rheumatol.* 2000;29(2):116-23.
67. Lora PS LC, Freitas AE, Brenol JTC, Montecielo O, Xavier RM. Padrões de Imunofluorescência do Fator Antinuclear (FAN) em Células HEp-2 de Soros Reagentes para Anti-SSA/Ro. *rev bras reumatol.* 2007;47(1):4-9.

68. Dellavance Alessandra, G. Júnior Alexandre, Cintra Alice F.U., Ximenes Antônio C., Nuccitelli Barbara, von MCA. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. *J Bras Patol Med Lab.* 2002;38(3).
69. van Venrooij WJ, Maini RN. *Manual of Biological Markers of Diseases.* 1 ed. London: Kluwer Academic Publishers; 1993.
70. Field M, Williams DG, Charles P, Maini RN. Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using purified peptide antigens. *Ann Rheum Dis.* 1988 Oct;47(10):820-5.
71. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennand DM, Hough D. Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol.* 1985 Nov;62(2):337-45.
72. Yee CS, Hussein H, Skan J, Bowman S, Situnayake D, Gordon C. Association of damage with autoantibody profile, age, race, sex and disease duration in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2003 Feb;42(2):276-9.
73. Sanchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH. Utility of anti-Sm, anti-RNP, anti-Ro/SS-A, and anti-La/SS-B (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1996 Jun;39(6):1055-61.
74. Lopez-Longo FJ, Monteagudo I, Gonzalez CM, Moreno AC, Rodriguez Mahou M, Grau R, et al. Anti-BB'-Sm antibodies, anticardiolipin antibodies, and thrombosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1998 Sep;25(9):1743-9.
75. Singh RR, Malaviya AN, Kailash S, Varghese T, Singh H, Sundaram KR. Antibodies to extractable nuclear antigens in connective tissue disorders in India: prevalence and clinical correlations. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1989 Dec;7(2):107-12.
76. Delpech A, Gilbert D, Daliphard S, Le Loet X, Godin M, Tron F. Antibodies to Sm, RNP and SSB detected by solid-phase ELISAs using recombinant antigens: a comparison study with counter immunoelectrophoresis and immunoblotting. *J Clin Lab Anal.* 1993;7(4):197-202.
77. Froelich CJ, Wallman J, Skosey JL, Teodorescu M. Clinical value of an integrated ELISA system for the detection of 6 autoantibodies (ssDNA, dsDNA, Sm, RNP/Sm, SSA, and SSB). *J Rheumatol.* 1990 Feb;17(2):192-200.
78. Gripenberg M, Teppo AM, Friman C. Antibodies to Sm and SS-A demonstrated by enzyme immunoassay. Correlation to clinical manifestations and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* 1991;11(4-5):209-13.
79. Jaekel HP, Klopsch T, Benkenstein B, Grobe N, Baldauf A, Schoessler W, et al. Reactivities to the Sm autoantigenic complex and the synthetic SmD1-aa83-119 peptide in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *J Autoimmun.* 2001 Dec;17(4):347-54.
80. Hamburger M, Hodes S, Barland P. The incidence and clinical significance of antibodies to extractable nuclear antigens. *Am J Med Sci.* 1977 Jan-Feb;273(1):21-8.
81. McCain GA, Bell DA, Chodirker WB, Komar RR. Antibody to extractable nuclear antigen in the rheumatic diseases. *J Rheumatol.* 1978 Winter;5(4):399-406.
82. Nakamura RM, Peebles CL, Tan EM. Microhemagglutination test for detection of antibodies to nuclear Sm and ribonucleoprotein antigens in systemic lupus erythematosus and related diseases. *Am J Clin Pathol.* 1978 Nov;70(5):800-7.

83. Notman DD, Kurata N, Tan EM. Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Intern Med.* 1975 Oct;83(4):464-9.
84. Yamamoto AM, Amoura Z, Johannet C, Jeronimo AL, Campos H, Koutouzov S, et al. Quantitative radioligand assays using de novo-synthesized recombinant autoantigens in connective tissue diseases: new tools to approach the pathogenic significance of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2000 Mar;43(3):689-98.
85. Chan EY, Mok TM, Lawton JW, Ko OK, Ho L, Lau CS. Comparison of counter immunoelectrophoresis with immunoblotting for detection of anti-extractable nuclear antigen antibodies in systemic lupus erythematosus. *Asian Pac J Allergy Immunol.* 1999 Dec;17(4):275-9.
86. Munves EF, Schur PH. Antibodies to Sm and RNP. Prognosticators of disease involvement. *Arthritis Rheum.* 1983 Jul;26(7):848-53.
87. Sulcebe G, Morcka K. Diagnostic and prognostic significance of different antinuclear antibodies in more than 1000 consecutive Albanian patients with rheumatic diseases. *Clin Exp Rheumatol.* 1992 May-Jun;10(3):255-61.
88. Molden DP, Suzuki H, Nakamura RM. Assays for Sm and RNP antibodies: pitfalls and technical considerations. *Diagn Immunol.* 1985;3(1):24-8.
89. Cordiali Fei P, D'Agosto G, Ameglio F, Valesini G, Alessandri C, Farsi A, et al. Determination of antibodies to extractable nuclear antigens by commercial kits: a multicenter study. *Int J Clin Lab Res.* 1998;28(1):29-33.
90. Bresnihan B, Bunn C, Snaith ML, Hughes GR. Antiribonucleoprotein antibodies in connective tissue diseases: estimation by counterimmunoelectrophoresis. *Br Med J.* 1977 Mar 5;1(6061):610-1.
91. Ihn H, Yamane K, Yazawa N, Kubo M, Fujimoto M, Sato S, et al. Distribution and antigen specificity of anti-U1RNP antibodies in patients with systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol.* 1999 Aug;117(2):383-7.
92. Kumar V, Beutner EH, Dabski K, Steger R, Koelle M. A standardized method of detecting antibodies to extractable nuclear antigens (RNP and Sm) by gel precipitation. *J Clin Lab Immunol.* 1984 Nov;15(3):163-6.
93. Aeschlimann A, Meyer O, Bourgeois P, Haim T, Belmatoug N, Palazzo E, et al. Anti-Scl-70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann Rheum Dis.* 1989 Dec;48(12):992-7.
94. Ho KT, Reveille JD. The clinical relevance of autoantibodies in scleroderma. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(2):80-93.
95. Gussin HA, Ignat GP, Varga J, Teodorescu M. Anti-topoisomerase I (anti-Scl-70) antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2001 Feb;44(2):376-83.
96. Gilburd B, Abu-Shakra M, Shoenfeld Y, Giordano A, Bocci EB, delle Monache F, et al. Autoantibodies profile in the sera of patients with Sjogren's syndrome: the ANA evaluation--a homogeneous, multiplexed system. *Clin Dev Immunol.* 2004 Mar;11(1):53-6.
97. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. American College of Pathologists. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jan;124(1):71-81.

98. Uchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy*. 1958;Vol. 5:1-78.
99. Mutasim DF, Adams BB. A practical guide for serologic evaluation of autoimmune connective tissue diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Feb;42(2 Pt 1):159-74; quiz 74-6.
100. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Tozzoli R, Manoni F, et al. Sensitivity and specificity of immunological methods for the detection of anti-topoisomerase I (Scl70) autoantibodies: results of a multicenter study. The Italian Society of Laboratory Medicine Study Group on the Diagnosis of Autoimmune diseases. *Clin Chem*. 2000 Oct;46(10):1681-5.
101. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8.
102. Ferreira A.W., S.L.M. Á. Diagnóstico laboratorial. Avaliação de métodos de diagnóstico das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação clínico-laboratorial. . Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1996.
103. Kapogiannis B, Gussin HA, Teodorescu MR, Teodorescu M. Differences in clinical sensitivity of ELISA tests for autoantibodies with human and bovine extractable nuclear antigens. *Lupus*. 2000;9(5):343-52.
104. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol*. 2000 Jun;53(6):424-32.
105. Ulvestad E. Modelling autoimmune rheumatic disease: a likelihood rationale. *Scand J Immunol*. 2003 Jul;58(1):106-11.
106. Tate J, Ward G. Interferences in immunoassay. *Clin Biochem Rev*. 2004 May;25(2):105-20.
107. Siracusano A, Agelli M, Ioppolo S, Quintieri F, Bombardieri S. Detection of anti-extractable nuclear antigens in connective tissue diseases: comparison between passive hemagglutination, counterimmunoelectrophoresis and double immunodiffusion. *Ric Clin Lab*. 1985 Jan-Mar;15(1):33-8.
108. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984 Sep 4;72(2):313-40.
109. Rose NR ME, Fols JD, Lane HC, Nakura RM. *Manual of Clinical Immunology*. 5a. ed. Washington: ASM PRESS; 1997.
110. Tozzoli R. Recent advances in diagnostic technologies and their impact in autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2007 Jun;6(6):334-40.
111. Merryman P, Louie P. Comparison of assay systems for detecting antibodies to nuclear ribonucleoproteins. *J Clin Pathol*. 1991 Aug;44(8):685-9.
112. Bruder RCS PI, Silva MIC, Defaveri J. A importância da contra-imunoeletroforese na detecção de antígenos nucleares extraíveis para o diagnóstico de doenças reumáticas sistêmicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2004;40(1):15-9.
113. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Guialis A, Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *Br J Rheumatol*. 1993 Jun;32(6):449-55.

114. Orton SM, Peace-Brewer A, Schmitz JL, Freeman K, Miller WC, Folds JD. Practical evaluation of methods for detection and specificity of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Mar;11(2):297-301.
115. Bizzaro N, Tozzoli R, Shoenfeld Y. Are we at a stage to predict autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Rheum.* 2007 Jun;56(6):1736-44.
116. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy.* *Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):1-6.
117. Charles PJ, van Venrooij WJ, Maini RN. The Consensus Workshops for the Detection of Autoantibodies to Intracellular Antigens in Rheumatic Diseases: 1989-1992. *Clin Exp Rheumatol.* 1992 Sep-Oct;10(5):507-11.
118. Benito-Garcia E, Schur PH, Lahita R. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: anti-Sm and anti-RNP antibody tests. *Arthritis Rheum.* 2004 Dec 15;51(6):1030-44.
119. 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 Feb;117(2):316-24.

7 ARTIGO CIENTÍFICO

Clinical diagnostic performance of different methods for the detection of antibodies to extractable nuclear antigens in connective tissue diseases: a cohort study.

Priscila Schmidt Lora¹, Claudia Cilene Fernandes Correa Laurino², Bruno Becker³, João Carlos Tavares Brenol⁴, Ricardo Machado Xavier⁵.

1 Postgraduate student: Medical Sciences; Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

2 PhD Pediatrics, Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3 Graduate study, Pharmacy school, UFRGS.

4 MD, MSc, Division of Rheumatology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

5 PhD, Assistant Professor of the Internal Medicine Department, UFRGS.

Correspondence to:

Ricardo Machado Xavier, PhD, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,

Serviço de Reumatologia, Rua Ramiro Barcellos, 2350, sala 645

Zip code 90035-003 - Porto Alegre, Brasil.

Fone: 55-51-21018340

Fax: 55-51-33313834

Abstract

OBJECTIVE: To compare the performance characteristics of various techniques commonly used to detect anti-ENA (extractable nuclear antigens) antibodies in the sera of patients suspected to have connective tissue diseases (CTD). **METHODS:** We prospectively investigated 189 consecutive patients with orders for anti-ENA from the attending physician in a university hospital. Presence of anti-ENA antibodies was determined by three methods: Ouchterlony's double immunodiffusion (DID) (in-house method), commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (ORGENTEC Diagnostika, GmbH) and passive haemagglutination (HA) (Virgo® Hemagen Diagnostics, EUA). Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and likelihood ratios (LR) were calculated using as the reference standard the clinical diagnosis of CTDs (systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), dermatomyositis/polymyositis (DM/PM), systemic sclerosis (SSc), rheumatoid arthritis (RA) and undifferentiated connective disease (UCTD), defined according to standard diagnostic criteria. **RESULTS:** 69.3% (131/189) of the patients had a CTD, and 62 (32.8%) had diagnosis of SLE. Anti-ENA was positive in at least one of the methods in 78 (41.3%) patients. Sensitivity and specificity, respectively, according to the technique were: ELISA 50.0% and 78.9%; DID 31.3% and 89.5%; and HA 40.9% and 87.7%. Positive predictive values were 88.5% for HA, 87.2% for DID and 84.6% for ELISA, and negative predictive values were 40.5% for ELISA, 39.1% for HA and 36.2% for DID. HA had the highest positive LR (3.33), and ELISA the

lowest negative LR (0.63). **CONCLUSION:** DID, as reported, had the lowest sensitivity to detect ARD, in contrast with ELISA, which was the most sensitive, but least specific. However, based on the very similar predictive test values (PPV and NPV), we believe that, at least in a moderate to high pre-test probability, there are no significant differences on the interpretation of test results when using ELISA, HA and DID for ENA detection.

Key words: Anti-extractable nuclear antigen antibodies, Sensitivity, Specificity, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Passive Haemagglutination, Double Immunodifusion.

Introduction

Autoantibodies are a hallmark in autoimmune connective tissue diseases (CTDs) such as rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus erythematosus (SLE), Sjögren's syndrome (SS), systemic sclerosis (SSc), polymyositis and dermatomyositis (PM/DM) and are used to define diagnosis, prognosis and as markers for diseases activity (1-3), furthermore has been demonstrated that many autoantibodies can be detected in the serum of asymptomatic individuals who later develop an autoimmune disease (4).

The clinical usefulness of the results depends on the quality of the laboratory tests. Several different methods are used to detect autoantibodies with varying specificity and sensitivity. An ideal diagnostic test has both high sensitivity and specificity; that is, it identifies all patients with the disease (high sensitivity) and is not positive in those who do not have the disease (high diagnostic specificity).

Double immunodiffusion (DID) was the technique used when anti-ENA antibodies were first identified in CDTs. DID, a highly specificity method, but due to analytical limitations it is need a high concentration of antibodies in the patient serum to get a positive result. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and passive haemagglutination (HA) are methods more frequently used now in clinical laboratories. These techniques can detect very low concentrations of antibodies and therefore are very sensitive (5-7).

Over the last decade, new methods of performing immunology tests have been introduced into laboratory practice, principally to facilitate the processing of large numbers of samples. This rapid change has compounded the problems that result when requesting clinicians are unaware of the performance characteristics of the laboratory tests. Testing for autoantibodies to extractable nuclear antigens (ENAs) is a good example.

The aim of the study was to evaluate the performance of DID, ELISA and HA for anti-ENA antibodies detection in patients suspected to have CDTs.

Patients and Methods

Patients

Between January 2004 and March 2006, 206 sera were sent to the Serviço de Patologia Clínica of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (SPC/HCPA) for anti-ENA antibodies testing. The present study was conducted among 189 sera (17 sera excluded: 12 were from patients without any clinical information in the chart and 5 in which there was not enough serum for all tests). All samples were tested for the presence of anti-ENA by DID, ELISA and passive HA. Presence of CTDs was defined by chart review, performed between 6 and 12 months after the test was ordered, according to standard diagnostic criteria, as follows: systemic lupus erythematosus (SLE) (8), Sjögren's syndrome (SS) (9), dermatomyositis/polymyositis (DM/PM) (10), systemic sclerosis (SSc) (11), and rheumatoid arthritis (RA) (12); Undifferentiated Connective Diseases (UCTD) (13).

Statistical analysis was performed in SPSS® v.12. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV) and likelihood ratio (LR) was calculated using the presence or absent of CTDs as reference.

Methods

All tests were performed by trained lab technicians who were blinded to all clinical information, and followed standard procedures for internal and external quality control, who were.

ENA by Outchertlony double immunodiffusion (DID): (in house method).

All sera were screened for the presence of ENA antibodies against calf thymus extractable nuclear antigens by DID in 0.4% agarose gels (14). The antigen (calf thymus extract) was placed in the centre well and the serum patient in adjacent wells. The samples with precipitin lines were further studied for identification of specific antibodies, using reference anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP and anti-Sm sera to compare the precipitin lines .

ENA by ELISA: (ORGENTEC Diagnostika, GmbH). All sera were screened with ENA Profile kit with microwells coated with highly purified antigens SS-A/Ro, SS-B/La, Sm and RNP/Sm and anti-human IgG horseradish peroxidase conjugated as second antibody. Positive samples were further studied for identification of specific antibodies with SS-A/Ro, SS-B/La, Sm and RNP/Sm kits.

ENA by HA: (Virgo® Hemagen Diagnostics, EUA). All sera were screened with ENA Profile kit with sensitized red cells to antigens SS-A/Ro, SS-

B/La, Sm and RNP. Positive samples (that result agglutination patterns) further studied for identification of specific antibodies with SS-A/Ro, SS-B/La, Sm and RNP kits.

Results

A total of 189 patients were studied, most were women (176/189 – 93.1%), mean age of 44 (SD 17) years. Predominance of SLE 69.3% of the patients had a CTD (131/189) and 32.8% (62/189) of these had diagnosis for SLE. Clinical data are show in table I.

Seventy-eight patients (41.3%) were positive for anti-ENA in at least one of the techniques. Among ENA specificities, anti-SSA/Ro was the most frequent (27.0%, by ELISA) (table II). The specificity and sensitivity of the three methods to detect anti-ENA antibodies were different, being ELISA the most sensitive (50.0%) and DID the most specificit (89.5%). However, there was no great variation in PPV, PPN, LR+ and LR- (table III).

Discussion

Our study was designed following the new guidelines for studies of diagnostic methods (15), which recommends studies with patients selected by presenting symptoms and reporting the index test results in comparison with diagnoses as reference standard. Most studies on the diagnostic accuracy of autoantibodies anti-ENA have been carried out by testing samples from selected patients with well defined clinical diseases and healthy controls (16-18), situations where the results do not reflect real clinical practice and that tend

to overestimate the test performance. By looking at sensitivity and specificity of different methods of anti-ENA detection in patients suspected of having a CTD and in whom the final diagnosis was prospectively defined, the current study provides the information that is most clinically relevant for estimating the probability of the disease given the anti-ENA status.

The single criterion used in this study for “clinically suspected CTD” was the presence of a request for anti-ENA by the attending physician. Although very imprecise, the observed high prevalences of a positive test result (41.3%) and of the posterior diagnosis of a CTD (69.3%) indicate that this criterion was adequate to select highly suspicious situations in clinical practice in our university hospital. The clinical diagnosis was established by chart review performed by an experienced rheumatologist, who could also occasionally contact the attending physician to clarify some information. Based on the usual time schedules for return office visits in our institution, we believe that the follow-up time of 6 to 12 months since the anti-ENA request was sufficient for the attending physicians complete the investigation in most cases. In some patients in whom the definite diagnosis of a CTD could not be established based in current classification criteria, but who had characteristics of a systemic autoimmune disorder, the diagnosis of UCTD was made.

Our results showed the ELISA as the most sensitive and DID as the most specific methods of anti-ENA testing in patients suspected of a CTD, as expected considering several published case-control studies (19, 20). Results of sensitivity and specificity are not enough to calculate the probability of diseases for a given patient, since these indices do not consider the pre-test probabilities.

Likelihood ratios provide more information in terms of how the posttest probability is impacted by the test result (21). The observed values (LR+: 2.37 - 3.33, and LR-: 0.76 – 0.67) can be considered as small in comparison with the performance of other diagnostic tests, but still potentially relevant to demonstrate clinical utility (21). Moreover, despite the different performances in terms of sensitivity and specificity, all three studied anti-ENA methods presented similar positive and negative predictive values, indicating that they have comparable diagnostic utility in clinical practice. Since these indices are dependent on the disease prevalence, which was high in our studied sample (69.3%) and is probably not representative of other non-academic clinical settings, we recalculated them with lower pre-test probabilities (40% and 10%), and still observed results that were relatively close for all three methods.

In conclusion, in a population of patients with suspected CTD the anti-ENA test had limited diagnostic impact (low LRs) and, although there are some differences in sensitivity and specificity between the studied methods, we do not believe that the choice of ELISA, HA or DID can significantly change the clinical interpretation of the results since there was little difference in their predictive values.

Tables

Table I: Demographic and Clinical data (n = 189)

Age (years)	44±17
Women	176 (93.1%)
Presence of CTD	132 (69.3%)

CTD diagnosis

SLE	62 (32.8)
SSc	21 (11.1%)
RA	19 (10.1%)
UCTD	20 (5.8%)
pSS	8 (4.2%)
DM	2 (1.1%)

Subtitle

Data are shown as mean ± standard deviation and n (%).

CTD: connective tissue diseases; SLE = Systemic Lupus Erythematosus; RA = Rheumatoid Arthritis; SSc = Systemic Sclerosis; UCTD = Undifferentiated Connective Diseases; pSS = primer Sjögren's Syndrome; DM = Dermatomyositis/Polymyositis.

Table II: Prevalence of autoantibodies according to methodologies

	ELISA (n = 189)	HA (n = 188)	DID (n = 188)
Screening*	78 (41.3%)	61 (32.3%)	47 (25.0%)
Anti-SSA/Ro	51 (27.0%)	46 (24.3%)	37 (19.9%)
Anti-SSB/La	49 (25.9%)	16 (8.5%)	5 (2.7%)
Anti-RNP	-	24 (12.7%)	14 (7.5%)
Anti-Sm	20 (10.6%)	16 (8.5%)	3 (1.6%)
Anti-RNP/Sm	22 (11.6%)	-	-

Subtitle

Data are shown as n/n total (%).

* screening refers to the initial test made all sample to find if there was any ENA antibodies present in the patient serum, these procedure is done in the three methods (as described above). anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm: ENA autoantibodies

Table III: Accuracy of anti-ENA screening in detecting a CTD by different techniques

	ELISA	HA	DID
Sensitivity ^(#)	50.0 (41.5 – 58.5)	40.9 (32.5 – 49.2)	31.3 (23.3 – 39.2)
Specificity ^(#)	78.9 (68.4 – 89.5)	87.7 (79.1 – 96.2)	89.5 (81.5 – 97.4)
PPV ^(#)	84.6 (76.6 – 92.6)	88.5 (80.5 – 96.5)	87.2 (77.7 – 96.8)
NPV ^(#)	40.5 (31.4 – 49.7)	39.1 (30.6 – 47.5)	36.2 (28.2 – 44.1)
LR+	2.37 (1.39 – 4.0)	3.33 (1.62 – 6.87)	2.97 (1.3 – 6.6)
LR ⁻	0.63 (0.50 – 0.78)	0.67 (0.56 – 0.8)	0.76 (0.66 – 0.88)

Subtitle

^(#)Data are shown as % (IC 95%). PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, LR: likelihood ratio. ELISA: enzyme-linked immunoassay, HA: passive haemagglutination, DID: double immunodifusion.

References

1. Damoiseaux JG, Tervaert JW. From ANA to ENA: how to proceed? *Autoimmun Rev.* 2006 Jan;5(1):10-7.
2. Pisetsky DS. Autoimmunity: the nuclear arsenal of autoimmunity. *Immunol Cell Biol.* 2007 Jul;85(5):344-5.
3. Tan EM. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. *Ann N Y Acad Sci.* 1997 Apr 5;815:1-14.
4. Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003 Oct 16;349(16):1526-33.
5. Lock RJ, Unsworth DJ. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol.* 2001 Mar;54(3):187-90.
6. Phan TG, Wong RC, Adelstein S. Autoantibodies to extractable nuclear antigens: making detection and interpretation more meaningful. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002 Jan;9(1):1-7.
7. van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J Immunol Methods.* 1991 Jul 5;140(2):181-9.
8. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997 Sep;40(9):1725.
9. Vitali C BS MH, et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome: results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum.* 1993;36:340-7.
10. Tanimoto K, Nakano K, Kano S, Mori S, Ueki H, Nishitani H, et al. Classification criteria for polymyositis and dermatomyositis. *J Rheumatol.* 1995 Apr;22(4):668-74.
11. Nadashkevich O, Davis P, Fritzler MJ. A proposal of criteria for the classification of systemic sclerosis. *Med Sci Monit.* 2004 Nov;10(11):CR615-21.
12. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update. *Arthritis Rheum.* 2002 Feb;46(2):328-46.
13. Amigues JM CA, Abbal M, Mazieres B. Comparative study of 4 diagnosis sets for mixed connective tissue diseases in patients with anti-rnp antibodies. *J Rheumatol.* 1998;25:2055-62.
14. Ouchterlony O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy.* 1958;Vol. 5:1-78.
15. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. Clin Chem.* 2003 Jan;49(1):1-6.
16. Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Guialis A, Moutsopoulos HM. Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in autoimmune diseases: comparison of five methods. *Br J Rheumatol.* 1993 Jun;32(6):449-55.
17. Parodi A DM, Barbieri L, Rebora A. Counterimmunoelectrophoresis, ELISA and immunoblotting detection of anti-Ro/SSA antibodies in subacute cutaneous lupus erythematosus. A comparative study. *British Journal of Dermatology.* 1998;138:114-7.

18. Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Diagnostic associations in a large and consecutively identified population positive for anti-SSA and/or anti-SSB: the range of associated diseases differs according to the detailed serotype. *Ann Rheum Dis.* 2002 Dec;61(12):1090-4.
19. Delpech A, Gilbert D, Daliphard S, Le Loet X, Godin M, Tron F. Antibodies to Sm, RNP and SSB detected by solid-phase ELISAs using recombinant antigens: a comparison study with counter immunoelectrophoresis and immunoblotting. *J Clin Lab Anal.* 1993;7(4):197-202.
20. Maddison PJ, Skinner RP, Vlachoyiannopoulos P, Brennand DM, Hough D. Antibodies to nRNP, Sm, Ro(SSA) and La(SSB) detected by ELISA: their specificity and inter-relations in connective tissue disease sera. *Clin Exp Immunol.* 1985 Nov;62(2):337-45.
21. Guidelines for immunologic laboratory testing in the rheumatic diseases: an introduction. *Arthritis Rheum.* 2002 Aug;47(4):429-33.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os métodos utilizados neste estudo e os resultados obtidos no mesmo, podem ser enunciadas as seguintes conclusões:

- 1) Os parâmetros de sensibilidade e especificidade para auto-anticorpos anti-ENA encontrados em nossa população variaram entre os métodos ELISA, HA e IDD. Sendo ELISA o método mais sensível e IDD o método mais específico.
- 2) O desempenho diagnóstico quando avaliado por valores preditivos (positivo e negativo) e razões de verossimilhança (positiva e negativa) não teve variação clinicamente significativa entre os métodos.
- 3) Os valores de razão de verossimilhança de anti-ENA por ELISA, HA e IDD encontrados são classificados pela literatura como pequenos mas capazes de causar diferenças clínicas (RV positiva 2-5 e RV negativa 0,5-0,2).

9 ANEXOS

TABELA 2: FREQUÊNCIA DOS AUTO-ANTICORPOS NAS DDTC E EM PACIENTES SEM DDTC.....	77
TABELA 3: ACURÁCIA DE ANTI-SSA/RO PARA DETECÇÃO DE DDTC	78
TABELA 4: ACURÁCIA DE ANTI-SSB/LA PARA DETECÇÃO DE DDTC.....	78
TABELA 5: ACURÁCIA DE SM PARA DETECÇÃO DE DDTC	79
TABELA 6: ACURÁCIA DE RNP/SM PARA DETECÇÃO DE DDTC.....	79
TABELA 7: ACURÁCIA DE RNP PARA DETECÇÃO DE DDTC.....	80

Tabela 2: Frequência dos auto-anticorpos nas DDTC e em pacientes sem DDTC.

Auto-anticorpos/Técnicas	DDTC												Sem DDTC	
	ES (n=21)		SS (n=8)		DITC (n=20)		LES (n=62)		AR (n=19)		DM (n=2)		(n=57)	
	n	%	N	%	N	%			n	%	n	%	n	%
ELISA														
anti-ENA (rastreamento)	7	11,1	4	50,0	5	25	44	71,0	5	26,3	1	50,0	12	21,1
anti-SSA/Ro	2	0,9	4	50,0	4	20	31	50,0	3	15,8	1	50,0	6	10,5
anti-SSAB/La	5	5,7	2	25,0	3	15	29	46,8	3	15,8	1	50,0	7	12,3
anti-RNPSm	0	0,0	1	12,5	1	5	19	30,6	0	0,0	0	0,0	1	1,8
anti-Sm	0	0,0	0	0,0	1	5	19	30,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
anti-Scl70	5	5,7	0	0,0	0	0	2	3,2	2	10,5	0	0,0	0	0,0
anti-Jo1	0	0,0	0	0,0	0	0	1	1,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
IDD														
anti-ENA (rastreamento)	0	0,0	4	50,0	2	10	31	50,0	4	21,1	0	0,0	6	10,5
anti-SSA/Ro	0	0,0	4	50,0	1	5	25	40,3	3	15,8	0	0,0	4	7,1
anti-SSAB/La	0	0,0	0	0,0	0	0	4	6,5	1	5,3	0	0,0	0	0,0
anti-RNP	0	0,0	1	12,5	1	5	11	17,7	0	0,0	0	0,0	1	1,8
anti-Sm	0	0,0	0	0,0	0	0	3	4,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0
anti-Scl70	0	0,0	0	0,0	0	0	0	0,0	1	5,3	0	0,0	0	0,0
anti-Jo1	0	0,0	0	0,0	0	0	1	1,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
HA														
anti-ENA (rastreamento)	0	0,0	4	50,0	6	30	41	66,1	4	21,1	0	0,0	7	12,3
anti-SSA/Ro	0	0,0	4	50,0	5	25	31	50,0	3	15,8	0	0,0	4	7,0
anti-SSAB/La	0	0,0	1	12,5	2	10	11	17,7	1	5,3	0	0,0	1	1,8
anti-RNP	0	0,0	1	12,5	2	10	20	32,3	0	0,0	0	0,0	1	1,8
anti-Sm	0	0,0	0	0,0	1	5	14	22,6	0	0,0	0	0,0	1	1,8
anti-Scl70	0	0,0	0	0,0	1	5	2	3,2	1	5,3	0	0,0	0	0,0

Lgenda DDTC: Doença Difusa do Tecido Conjuntivo; ES: esclerose sistêmica; SS: síndrome de Sjogren; DITC: doença indiferenciada do tecido conjuntivo; LES: lúpus eritematoso sistêmico; AR: artrite reumatóide; DM: dermatomiosite; ELISA: enzaimunoensaio, HA: hemaglutinação passiva, IDD: imunodifusão dupla; anti-ENA, anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP, anti-Sm, anti-RNPSm, anti-Scl-70 e anti-Jo1: auto-anticorpos.

Tabela 3: Acurácia de anti-SSA/Ro para detecção de DDTC

	ELISA	HA	IDD
Sensibilidade ^(#)	34,1 (26,0 – 42,1)	31,2 (23,9 – 39,8)	25,4 (17,9 – 32,9)
Especificidade ^(#)	89,4 (81,5 – 97,4)	92,9 (86,3 – 99,6)	92,9 (86,1 – 99)
VPP ^(#)	88,2 (79,4 – 97,1)	91,3 (83,1 – 99,4)	89,2 (79,2 – 99,2)
VPN ^(#)	36,9 (28,9 – 45,0)	37,0 (29,1 – 44,9)	34,9 (27,2 – 42,5)
RV+	3,23 (1,46 – 7,15)	4,53 (1,70 – 12,04)	3,55 (1,32 – 9,55)
RV ⁻	0,73 (0,63 – 0,85)	0,73 (0,63 – 0,84)	0,80 (0,71 – 0,90)

Legenda

^(#)Dados demonstrados em % (IC 95%). VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança. ELISA: enzimaímunoensaio, HA: hemaglutinação passiva, IDD: imunodifusão radial dupla.

Tabela 4: Acurácia de anti-SSB/La para detecção de DDTC

	ELISA	HA	IDD
Sensibilidade ^(#)	31,8 (23,9 – 39,8)	11,4 (5,9 – 16,8)	3,8 (0,5 – 7,1)
Especificidade ^(#)	87,7 (79,2 – 96,2)	98,2 (94,8 – 100)	100 (100 – 100)
VPP ^(#)	85,7 (75,9 – 95,5)	93,7 (81,9 – 100)	87,2 (77,7 – 96,8)
VPN ^(#)	35,7 (27,8 – 43,6)	32,4 (25,4 – 39,3)	30,9 (24,2 – 37,6)
RV+	2,59 (1,23 – 5,41)	6,5 (0,87 – 47,9)	Infinito
RV ⁻	0,77 (0,66 – 0,90)	0,90 (0,84 – 0,96)	0,96 (0,92 – 0,99)

Legenda

^(#)Dados demonstrados em % (IC 95%). VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança. ELISA: enzimaímunoensaio, HA: hemaglutinação passiva, IDD: imunodifusão radial dupla.

Tabela 5: Acurácia de Sm para detecção de DDTc

	ELISA	HA	IDD
Sensibilidade ^(#)	15,1 (9,0 – 21,3)	11,4 (5,9 – 16,7)	2,3 (0 – 4,8)
Especificidade ^(#)	100 (100 – 100)	98,2 (94,8 – 100)	100 (100 – 100)
VPP ^(#)	85,7 (75,9 – 95,5)	93,7 (81,8 – 100)	100 (100 – 100)
VPN ^(#)	35,7 (27,8 – 43,6)	32,3 (25,3 – 39,3)	30,6 (23,9 – 37,2)
RV+	Infinito	6,47 (0,87 – 47,8)	Infinito
RV ⁻	0,84 (0,78 – 0,91)	0,90 (0,84 – 0,96)	0,97 (0,95 – 1,00)

Legenda

^(#)Dados demonstrados em % (IC 95%). VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança. ELISA: enzimaímunoensaio, HA: hemaglutinação passiva, IDD: imunodifusão radial dupla.

Tabela 6: Acurácia de RNP/Sm para detecção de DDTc

	ELISA
Sensibilidade ^(#)	15,9 (9,7 – 22,1)
Especificidade ^(#)	98,2 (94,8 – 100)
VPP ^(#)	95,4 (86,7 – 100)
VPN ^(#)	33,5 (26,4 – 40,7)
RV+	9,06 (1,24 – 65,8)
RV ⁻	0,85 (0,78 – 0,92)

Legenda

^(#)Dados demonstrados em % (IC 95%). VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança. ELISA: enzimaímunoensaio.

Tabela 7: Acurácia de RNP para detecção de DDTC

	HA	IDD
Sensibilidade ^(#)	17,4 (10,9 – 23,4)	10 (4,8 – 15,5)
Especificidade ^(#)	98,2 (94,8 – 100)	98,2 (94,7 – 100)
VPP ^(#)	95,8 (87,8 – 100)	92,8 (79,3 – 100)
VPN ^(#)	33,9 (26,7 – 41,2)	31,9 (25 – 38,9)
RV+	9,93 (1,37 – 71,8)	5,6 (0,75 – 41,7)
RV ⁻	0,84 (0,77 – 0,91)	0,91 (0,85 – 0,98)

Legenda

^(#)Dados demonstrados em % (IC 95%). VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, RV: razão de verossimilhança. HA: hemaglutinação passiva, IDD: imunodifusão radial dupla.