



REVISTA BRASILEIRA DE REUMATOLOGIA

www.reumatologia.com.br



Artigo original

Utilidade da triagem dos anticorpos anti-dsDNA por quimioluminescência, seguida de confirmação por imunofluorescência indireta

Maria Roseli Monteiro Callado^{a,*}, José Rubens Costa Lima^b,
Maria Nancy de Alencar Barroso^c, Antonio Tiago Mota Pinheiro^d,
Moisés Francisco da Cruz Neto^d, Maria Arenilda de Lima Abreu^c, Walber Pinto Vieira^{e,f}

^aFaculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^bCélula de Vigilância Epidemiológica, Secretaria Municipal de Saúde de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil

^cLaboratório de Patologia Clínica, Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil

^dUniversidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

^eServiço de Reumatologia, Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil

^fFaculdade de Medicina, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

INFORMAÇÕES

Histórico do artigo:

Recebido em 28 de maio de 2012

Aprovado em 23 de abril de 2013

Palavras-chave:

Anti-dsDNA

Doenças autoimunes

Lúpus eritematoso sistêmico

Quimioluminescência

Imunofluorescência indireta

RESUMO

Objetivo: Avaliar o desempenho de um imunoensaio quimioluminescente (CLIA) para os anticorpos anti-dsDNA, utilizando como referência o teste de imunofluorescência indireta (IFI) sobre *Crithidia luciliae*.

Métodos: O sistema de automação foi previamente aprovado com 81% de eficiência, 100% de sensibilidade e 82% de especificidade, por processo de validação intrínseca em 179 amostras consecutivas de 169 pacientes no início de 2011. A seguir, esses pacientes foram subdivididos em três grupos de acordo com os resultados da pesquisa dos anticorpos anti-dsDNA nas duas metodologias (reagentes, não reagentes e resultados discrepantes).

Resultados: Na análise dos dados: 1) 77% (129/169) dos exames haviam sido solicitados por médicos reumatologistas; 2) 57% (97/169) das amostras eram de pacientes lúpicos; 3) Os resultados de CLIA, reagentes e não reagentes, estavam bem definidos e padronizados; 4) A automação reduziu em 70% as passagens pela técnica manual com segurança e qualidade; 5) A alta prevalência de pacientes lúpicos e com nefrite entre os resultados de CLIA falso-positivos corrobora a hipótese de que o índice real de falsa positividade do CLIA seja menor que o encontrado inicialmente neste estudo.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Trabalho realizado no Serviço de Reumatologia e Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza, Fortaleza, CE, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: roselicallado@gmail.com (M.R.M. Callado).

0482-5004/\$ - see front matter. © 2013 Elsevier Editora Ltda. Todos os direitos reservados.

Usefulness of anti-dsDNA antibody screening with chemiluminescence followed by confirmation by indirect immunofluorescence

ABSTRACT

Keywords:

Anti-dsDNA
Autoimmune diseases
Systemic lupus erythematosus
Chemiluminescence
Indirect immunofluorescence

Objective: The purpose of this study was to evaluate the performance of a chemiluminescent immunoassay (CLIA) to detect anti-dsDNA antibodies, using the indirect immunofluorescence test (IIF) on *Crithidia luciliae* as a reference.

Methods: The automation system demonstrated 81% efficiency, 100% sensitivity and 82% specificity according to the intrinsic validation process performed using 179 consecutive samples from 169 patients in the beginning of 2011. These patients were subsequently divided into 3 groups according to the co-reactivity of anti-dsDNA results using the 2 methods (reactive, non-reactive and discrepant results).

Results: Upon data analysis, 77% (129/169) of the tests were requested by rheumatologists, and 57% (97/169) of the samples were from lupus patients. Both the reactive and non-reactive results of the CLIA were well defined and standardised, and automation reduced the manual labor required by 70% in a safe and high-quality manner. Furthermore, the high prevalence of patients with lupus and nephritis among the CLIA false-positive results corroborates the hypothesis that the actual index of CLIA false positivity is lower than that initially found in this study.

© 2013 Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introdução

A pesquisa dos autoanticorpos anti-DNA de dupla hélice (anti-dsDNA) é útil para o diagnóstico e seguimento do lúpus eritematoso sistêmico (LES),¹ principalmente nos pacientes com nefrite lúpica.² Ensaios automatizados vêm sendo propostos como uma alternativa mais rápida para triagem de anticorpos anti-dsDNA nos grandes laboratórios.³ Os exames pela técnica de radioimunoensaio são reconhecidos como métodos mais específicos, porém, são cada vez menos usados porque requerem o uso de material radioativo.⁴ Ensaios automatizados processam grandes volumes de amostras clínicas de maneira rápida e com menor custo que os métodos tradicionais.^{5,6}

Implantar um exame sorológico em laboratório de patologia clínica requer um processo de validação intrínseca para avaliar o desempenho do teste quando comparado a um método de referência, pelos parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficiência. Essas são características do novo teste e não da população na qual está sendo aplicado, portanto fornecem resultados consistentes, independentes da prevalência da doença.⁷ Esse novo método de processamento do exame em questão pode ser aprovado para substituição de técnicas (mudança de fornecedor de reagentes), melhorar a qualidade (adição à técnica em uso) e/ou diminuir os custos operacionais do laboratório. Essa rotina não necessita de aprovação de comitê de ética, pois a origem da amostra biológica não deve ser revelada.

A prevalência de resultados positivos do teste FAN Hep-2 na comunidade do Hospital Geral de Fortaleza (HGF) foi estudada no período de 2002 a 2006, em seis mil amostras, obtendo-se 84% de resultados negativos,⁸ justificando o interesse de realizar a triagem dos exames de autoimunidade por método automatizado que reduziria o tempo e as chan-

ces de erros humanos pelo interfaciamento do equipamento na liberação dos resultados negativos.

O objetivo deste estudo é analisar o desempenho de um imunoensaio quimioluminescente para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, utilizando como referência o teste de imunofluorescência indireta (IFI) sobre *Crithidia luciliae*. Após a aprovação de um protocolo interno do Laboratório de Patologia Clínica do HGF para validação intrínseca do sistema de automação na triagem de anticorpos antinucleares (FAN) e anti-DNA nativo (anti-dsDNA), foi elaborado um projeto para análise de prontuário da amostra clínica envolvida. Referido estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do HGF sob o número 060705/11. Os autores assinaram o termo de fiel depositário e declararam a inexistência de conflitos de interesse.

Material e métodos

Casuística

No período de fevereiro a março de 2011, as amostras sorológicas com solicitação de detecção de anticorpos anti-dsDNA encaminhadas para o laboratório do HGF foram examinadas no setor de imunofluorescência que, posteriormente, encaminhou o material para o setor de automação, registrando-se que os exames foram realizados de forma independente pelas duas equipes técnicas. Os resultados de IFI foram liberados em tempo hábil, sem prejuízo para os pacientes. A validação intrínseca do sistema de automação foi aprovada com 81% de eficiência (resultados concordantes com a IFI), 100% de sensibilidade e 82% de especificidade do método. As informações demográficas (sexo e idade), epidemiológicas e clínicas (justificativa da solicitação, diagnósticos, duração dos sintomas e resultados laboratoriais) dos pacientes (n = 169) envolvidos

neste estudo foram obtidas no banco de dados do laboratório e nos prontuários, após aprovação do CEP.

As pesquisas de anticorpos anti-dsDNA, solicitadas em consultas posteriores, nos pacientes que apresentaram resultados discrepantes nas duas metodologias, no período de validação da CLIA, foram monitoradas por um ano (março/11 a março/12), sem interferência dos autores deste estudo.

Investigação laboratorial

Ensaio de quimioluminescência (CLIA): LIAISON_dsDNA (DiaSorin, Saluggia, Itália) é um imunoenensaio de CLIA que utiliza partículas magnéticas revestidas com um oligonucleotídeo sintético de dsDNA, o qual assegura a ausência de contaminação com histonas e outras proteínas nucleares. Um anticorpo monoclonal, marcado com um derivado do isoluminol, é usado como anticorpo conjugado para detectar IgG anti-dsDNA.⁵ Todos os procedimentos do ensaio foram realizados automaticamente, em amostra primária no Sistema LIAISON®. O padrão de reatividade foi definido pelo fabricante como não reagente (< 20 UI/mL), zona cinza (20-25 UI/mL) e reagente (> 25 UI/mL).

Ensaio de imunofluorescência indireta (IFI): Os exames foram realizados por método disponível comercialmente (Euroimmun, Lubeck, Alemanha), seguindo as recomendações técnicas do fabricante. Os soros foram diluídos 1/10 em solução salina tamponada com fosfatos e incubados sobre lâminas com o substrato antigênico (*Crithidia luciliae*), onde os anticorpos anti-dsDNA presentes ligam-se ao cinetoplasto, sendo revelados por uma antigamaglobulina específica marcada com isotiocianato de fluoresceína. Em cada rotina de testes foram realizados controles internos positivos e negativos. A coloração celular foi examinada em microscópio de fluorescência, modelo Nikon YS2H, sob o aumento de 400 vezes. Os soros com resultados positivos na triagem 1/10 foram apresentados em títulos semiquantitativos.

Análise estatística

Os dados foram compilados em planilha Excel® da Microsoft. Foram realizados os testes de sensibilidade, especificidade e eficiência para validação de um teste sorológico, usando a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA por IFI como teste de referência.

Resultados

A avaliação intrínseca foi realizada com 179 amostras sorológicas analisadas pelas duas técnicas. O ensaio quimioluminescente foi positivo em 41 (23%) amostras, negativo em 132 (74%) e indeterminado (zona cinza) em seis soros (3%). Os seis soros indeterminados foram agrupados aos positivos para a avaliação de sensibilidade, especificidade e eficiência do método em relação à IFI. A comparação entre as duas metodologias revelou: 15 amostras (8,4%) positivas nas duas técnicas, 132 (73,7%) duplamente negativas, 32 (17,9%) com resultados falso-positivos e nenhum resultado falso-negativo na CLIA, revelando sensibilidade de 100%, especificidade de 82% e uma eficiência da CLIA de 81%. Após essa análise, o

laboratório implantou a triagem dos anticorpos anti-dsDNA por automação, na qual os resultados positivos passaram a ser reavaliados para confirmação em IFI. Nesse novo processo de triagem, a fase manual foi reduzida em 74% (132/179) do esforço total de bancada, limitando a necessidade para um exame manual em cada quatro testes anteriormente realizados pelo método de IFI.

A amostra clínica da avaliação intrínseca (179 amostras sorológicas) entre os métodos CLIA e IFI envolvia 169 pacientes, com oito soros duplicados e um triplicado. Os resultados de CLIA das amostras múltiplas foram negativos em sete pacientes com soros duplos, discrepante em um paciente (32 e 13,8 UI/mL) e positivo no paciente com três solicitações de pesquisa de anticorpos anti-dsDNA no período de dois meses (154,6, 46 e 37,5 UI/mL); todos esses soros foram negativos pelo método de IFI. Uma análise desses resultados será apresentada posteriormente.

As características demográficas e epidemiológicas desta casuística estão demonstradas na tabela 1. Os pacientes

Tabela 1 – Características epidemiológicas da casuística (n = 169)

Características da amostra clínica	n (%)
Sexo	
Masculino	16 (9)
Feminino	153 (91)
Faixas etárias (anos)	(n = 166) ^a
Crianças (< 11)	3 (2%)
Adolescentes (12 a 19)	20 (12%)
Adultos	
20-29	54 (33%)
30-39	43 (26%)
40-49	28 (17%)
50-59	12 (7%)
60-69	6 (4%)
Clínica solicitante do exame	
Reumatologia	123 (73%)
Clinica Médica	19 (11%)
Nefrologia	7 (4%)
Ginecologia/Obstetrícia	7 (4%)
Reumatologia pediátrica	6 (4%)
Outras clínicas ^b	7 (4%)
Diagnóstico dos pacientes	
LES	92 (54%)
Síndrome de superposição com LES	5 (3%)
Investigação de doença autoimune ^c	55 (33%)
Outras doenças autoimunes	17 (10%)
SAAF primária	4
Artrite reumatoide	3
Vasculite	2
Doença de Devic	2
Doença mista do tecido conjuntivo	1
Síndrome de Sjögren	1
Espondilite anquilosante	1
Esclerose sistêmica linear	1
Tireoidite autoimune	1
Esclerose múltipla	1

LES, lúpus eritematoso sistêmico; SAAF, síndrome do anticorpo antifosfolípide.

^aTrês pacientes não tinham prontuários e as idades não estavam referidas no laboratório.

^bEmergência, endocrinologia, neurologia e UTI).

^cOs pacientes sem prontuários (três) foram incluídos neste grupo.

foram classificados pelos diagnósticos firmados em prontuário; 1/3 da casuística (55 pacientes) foi referido como pacientes sob investigação diagnóstica, mediante suspeitas clínicas, com as solicitações dos exames justificadas pela presença de diversos sinais ou sintomas (ex: artralguas, artrites, insuficiência renal, anemia hemolítica, púrpura, Raynaud e parestesias etc.) relacionados ou presentes na doença lúpica.

Os pacientes foram subdivididos em três grupos definidos na tabela 2, de acordo com os resultados encontrados na pesquisa dos anticorpos anti-dsDNA pelas duas metodologias. Os soros do Grupo I pertenciam a 15 pacientes lúpicos (12 com diagnóstico anterior de nefrite lúpica; um com serosite; outro com LES há sete meses, apresentando provas de atividade inflamatória positivas, linfopenia e consumo das frações C3 e C4 do complemento; e o último paciente, portador de ARJ, em tratamento há dois anos, apresentou nesta reavaliação laboratorial os exames de FAN e anti-dsDNA positivos, nove meses antes de preencher os critérios para o diagnóstico de LES). Os resultados da triagem do anticorpo anti-dsDNA na técnica de CLIA nos 15 soros permaneceram no intervalo entre 240 UI/mL e 32,6 UI/mL, com média de 167 UI/mL, mediana de 198 UI/mL e moda de 240 UI/mL; e os títulos na IFI variaram de 1/640 a 1/20; onze soros apresentaram leituras maiores que 125 UI/mL na CLIA e título na IFI de 1/320 ou 1/640; os valores encontrados nos quatro soros restantes (63, 39, 36 e 32,6 UI/mL) revelaram títulos de 1/320, 1/20, 1/160 e 1/320, respectivamente.

As informações relevantes registradas nos prontuários de cada paciente do Grupo II (quadro clínico e alterações laboratoriais, com as justificativas para solicitação dos exames de anti-dsDNA) podem ser vistas na tabela 3, onde se evidencia que 87% (26/30) dos casos rotulados como falso-positivos na CLIA eram portadores de LES e 65% (17/26) desses pacientes tinham diagnóstico anterior de nefrite lúpica, com descrição de sinais e/ou sintomas de atividade da doença na evolução médica em 50% (13 casos); alterações laboratoriais isoladas, compatíveis com doença em atividade

estavam presentes em 23% (6/26) dos pacientes (casos 5, 8, 11, 19, 25 e 29).

Os resultados da pesquisa dos anticorpos anti-dsDNA pela CLIA, no Grupo II (tabela 4), ficou no intervalo de 184-20 UI/mL, com média de 59 UI/mL e mediana 45 UI/mL; quatro soros (casos 1 a 4) foram positivos com valores cinco vezes maiores do que o ponto de corte indicado pelo fabricante. Os soros classificados como zona cinza representaram 3,5% (6/169) da casuística estudada.

A situação clínica de cada paciente do Grupo II (tabela 4) foi pareada com o histórico da presença dos autoanticorpos e a evolução da detecção dos anticorpos anti-dsDNA nos soros desde o início da doença. Os resultados de FAN estavam disponíveis e eram positivos em 97% (29/30) dos pacientes. Anticorpos anti-Sm foram detectados em 38% (10/26) dos pacientes com LES deste grupo. A reatividade pregressa ao dsDNA (anti-dsDNA por IFI) ocorreu em 50% (13/26) dos pacientes com lúpus, porém, esta informação não estava disponível em dois pacientes provenientes de outros serviços (casos 25 e 26); os quatro pacientes em investigação diagnóstica estavam realizando os exames pela primeira vez (casos 1, 4, 12 e 21).

Avaliações posteriores dos anticorpos anti-dsDNA foram solicitadas em 77% (23/30) dos pacientes no prazo máximo de um ano; dentre os sete pacientes restantes, três não eram portadores de LES (casos 1, 12 e 21), três eram lúpicos em remissão clínica e laboratorial (3, 10 e 18) e o caso número 5, com remissão clínica, apresentava hematúria por ocasião da validação intrínseca.

Dois pacientes (casos 2 e 17) foram estudados por soros múltiplos; o caso 2, com tripla avaliação positiva na CLIA (154,6, 46 e 37,5 UI/mL) é portador de LES e nefrite há quatro anos e no início da doença (2007) apresentou um resultado positivo para os anticorpos anti-dsDNA por ELISA (80 U), não confirmado em IFI em três pesquisas realizadas no período de 2009 a 2010; porém, após um mês do quadro convulsivo o exame por IFI foi positivo; e o caso 17, com resultados discrepantes na CLIA (32 e 13,8 UI/mL), recebeu o diagnóstico de LES e nefrite há dois meses, permanecendo com a pesquisa para anticorpos anti-dsDNA por CLIA e IFI negativos após seis meses.

Dez pacientes tornaram-se reagentes pela IFI após um ano da primeira avaliação (casos 2, 9, 23 e 26 até três meses; caso 29 após cinco meses; casos 14 e 15 após nove meses; e os casos 7, 20 e 22 no intervalo de 12 meses).

O restante da casuística (Grupo III) era constituída por 58% (56/97) do total de pacientes com LES, 95% (52/55) do total de pacientes em investigação de doenças autoimunes e pela maioria, 94% (16/17) dos pacientes acometidos com outras doenças autoimunes. Sete amostras duplicadas na avaliação intrínseca, pertencentes a cinco pacientes com LES, um sob investigação diagnóstica e outro com doença reumatoide permaneceram neste grupo. Os resultados de CLIA no Grupo III revelaram valores no intervalo de 19 a 0,5 UI/mL (figura 1), com média de 5,5 UI/mL, mediana de 4 UI/mL e moda de 0,5 UI/mL.

A história prévia de reatividade ao dsDNA por IFI em todos os pacientes com LES envolvidos no estudo (n = 97) foi pesquisada no prontuário e/ou nos arquivos do laboratório (tabela 5), constatando-se que 48% (47/97) desta casuística

Tabela 2 – Definição de estratos para análise (n = 169)

Grupo	Definição	Estrato	n	Total
I	Amostras positivas nas duas técnicas (CLIA e IFI)	LES	15	15
II	Amostras positivas na CLIA e negativas na IFI (falsos-positivos)	LES	24	30
		Síndrome de superposição com LES	2	
		Tireoidite autoimune	1	
III	Amostras negativas nas duas técnicas (CLIA e IFI)	Investigação de doenças autoimunes	3	124
		LES	53	
		Síndrome de superposição com LES	3	
		Outras patologias autoimunes	16	
		Investigação de doenças autoimunes	52	

CLIA, imunoenensaio quimioluminescente; IFI, imunofluorescência indireta; LES, lúpus eritematoso sistêmico.

Tabela 3 – Informações relevantes dos pacientes do Grupo II (n = 30)

Pac.	Sx	Id	Justificativas para solicitação de anti-dsDNA	Tempo	Quadro atual	
					Clínico	Alterações laboratoriais
1	F	35	Artralgia a/e	1 a	Em investigação	ANA reagente
2	F	25	LES + nefrite	4 a	Atividade (convulsão)	linfopenia, ↓C', proteinúria
3	F	60	LES	15 a	Remissão	sem alterações
4	F	34	Poliartrite aditiva	2 a	Em investigação	ANA reagente
5	F	33	LES + nefrite	11 a	Remissão	hematúria ++
6	F	21	LES + nefrite	7 m	Atividade	↓C', hematúria, proteinúria
7	F	24	LES mucocutâneo	2 m	Remissão	sem alterações
8	F	57	LES	22 a	Remissão	linfopenia
9	F	28	LES + nefrite	5 a	Atividade	anemia, ↓C', proteinúria
10	F	18	LES + nefrite	2 a	Remissão ^a	sem alterações
11	F	49	LES	5 a	Remissão	PCR+, ↓C3
12	F	49	Tireoidite autoimune	3 a	Artralgia	hematúria +
13	F	33	LES + nefrite	8 a	Atividade	linfopenia, ↓C', hematúria
14	F	22	LES	10 m	Remissão	sem alterações
15	M	13	LES	2 m	Atividade	↓C'
16	F	43	LES + nefrite	5 a	Atividade	linfopenia, hematúria, proteinúria
17	F	34	LES + nefrite	2 m	Atividade	linfopenia, ↓C', VHS e PCR, hematúria, proteinúria
18	F	27	LES + DM/PM	4 a	Remissão	PCR
19	F	14	LES mucocutâneo	5 m	Remissão	↓C'
20	F	27	LES + nefrite	6 a	Atividade	↓C', proteinúria
21	F	49	Insuficiência renal a/e	1 m	Em investigação	proteinúria
22	F	22	LES + nefrite	4 a	Atividade ^a	hematúria, proteinúria
23	F	23	LES + nefrite	7 a	Atividade ^a	proteinúria
24	F	28	LES + nefrite	3 a	Atividade ^a	hematúria, proteinúria
25	F	19	LES + nefrite	5 a	Remissão	linfopenia
26	M	34	LES + nefrite	3 a	Atividade, hemodiálise	↓C', hematúria, proteinúria, creatinina
27	F	46	LES + nefrite	5 a	Atividade ^a	leucocitúria
28	F	29	LES + nefrite	18 m	Atividade, hemodiálise ^b	↓C3, proteinúria, leucocitúria
29	F	61	LES + ES	10 a	Remissão	linfopenia, ↓C',
30	F	22	LES + nefrite	3 a	Avaliação após gravidez	sem alterações

Pac, paciente; Sx, sexo; Id, idade; F, feminino; a/e, a esclarecer; a, ano; ANA, autoanticorpo antinúcleo; LES, lúpus eritematoso sistêmico; C', complemento; m, mês; PCR, proteína C-reativa; M, masculino; VHS, velocidade de hemossedimentação; DM/DP, dermatomiosite/dermatopolimiosite; ES, esclerose sistêmica.

^aEm vigência de pulsoterapia com metilprednisolona e ciclofosfamida.

^bUso de rituximabe no ano anterior.

eram reagentes, com cinco pacientes do Grupo I (positivo nas duas metodologias) realizando a pesquisa de anticorpos anti-dsDNA pela primeira vez. A atividade clínica através do *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index (SLEDAI)* não estava disponível em todos os prontuários no período da solicitação do exame o que impediu o estudo de evolução clínica (períodos de atividade ou remissão da doença) relacionada com a presença de anticorpos anti-dsDNA.

Discussão

Atualmente, as técnicas mais comumente usadas para a detecção de anticorpos anti-dsDNA são os ensaios imunoenzimáticos e a IFI, sendo esta última mais específica, detectando anticorpos de moderada e alta afinidade que se relacionam com atividade do LES.⁹ Os ensaios de ELISA, apesar de serem quantitativos, reprodutíveis e automatizados apresentam menor precisão em termos de desempenho clínico, porque detectam autoanticorpos anti-dsDNA de baixa avidade, que geralmente apresentam pouca relevância clínica

e podem estar presentes em outras doenças do tecido conjuntivo, doenças inflamatórias ou infecciosas e em indivíduos normais.¹⁰ Nos últimos anos, uma nova geração de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA foi introduzida no mercado. Estes novos reagentes caracterizam-se por uma maior purificação dos antígenos, tornando-se mais seletivos, com uma melhor capacidade de detectar anticorpos de avidade intermediária e alta.⁵ O método CLIA avaliado neste estudo está inserido neste grupo.

O desempenho do ensaio CLIA-LIAISON nesta avaliação intrínseca foi satisfatório, apresentando 100% de sensibilidade, 82% de especificidade e 81% de eficiência na comparação com a IFI. Este mesmo reagente de CLIA foi testado pelo Grupo de Estudos de Doenças Autoimunes da Sociedade Italiana de Medicina Laboratorial⁵ em uma avaliação extrínseca,⁷ com uma amostra clínica de 52 pacientes com LES, 28 doentes com outras doenças do tecido conjuntivo, 36 portadores de hepatite pelo vírus C (HCV) e 24 pacientes com outras doenças virais agudas. Os autores encontraram 84,6% de sensibilidade, 82,9% de especificidade e 83,6% de eficiência do método, resultados semelhantes aos obtidos no pre-

Tabela 4 – Presença de autoanticorpos no soro dos pacientes do Grupo II (n = 30)

Pac.	Situação clínica atual	História prévia de outros autoanticorpos	Histórico de anti-dsDNA				
			Anterior	Atual	Avaliações posteriores		
			(IFI)	CLIA (UI/mL)	CLIA (UI/mL)	IFI (título)	(intervalo)
1	Investigação	ANA	anr	183,5	anr	anr	-
2	Atividade	ANA	NR	154,6	49,0	1:80	1 m
3	Remissão	ANA	R	134,1	anr	anr	-
4	Investigação	ANA, Cardio G e M	anr	125,5	anr	NR	5 m
5	Remissão	ANA, Sm, Cardio G e M	R	111,1	anr	anr	-
6	Atividade	ANA, Sm, RNP	NR	92,5	199,9	NR	10 m
7	Remissão	ANA	NR	92,1	54,1	1:80	12 m
8	Remissão	ANA	R	85,6	19,0	anr	5 m
9	Atividade	ANA, Ro, La	NR	84,6	189,3	1:320	3 m
10	Remissão	ANA	R	68,6	anr	anr	-
11	Remissão	ANA, Sm	R	51,5	96 e 15,2	NR	2 e 6 m
12	Investigação	ANA, Ro	anr	50,9	anr	anr	-
13	Atividade	ANA, Sm	NR	49,5	38,2 e 52	NR	3 e 12 m
14	Remissão	ANA	NR	45,2	45,1	1:160	9 m
15	Atividade	ANA, Sm, Ro	NR	44,9	26,7	1:80	9 m
16	Atividade	ANA, Ro, La	R	36,1	4,75	anr	12 m
17	Atividade	ANA	NR	32,0	12,5	NR	6 m
18	Remissão	ANA	R	31,4	anr	anr	-
19	Remissão	ANA, Sm, Cardio G	anr	31,1	28,4	NR	3 m
20	Atividade	ANA, Sm, RNP	R	30,2	45,7	1:80	12 m
21	Investigação	anr	anr	28,7	anr	anr	-
22	Atividade ^a	ANA	R	26,6	33,6	1:40	12 m
23	Atividade ^a	ANA	R	26,5	34,4	1:160	1 m
24	Atividade ^a	ANA, Sm, RNP, anti-p	NR	25,4	anr	NR	2 m
25	Remissão	ad	ad	22,7	22,2	NR	10 m
26	Atividade ^a	ANA, Ro, Cardio G	ad	22,1	56,3	1:40	2 m
27	Atividade ^a	ANA, RNP	R	22,0	45,6	NR	2 m
28	Atividade	ANA, Sm, Cardio G	NR	20,9	8,33	anr	10 m
29	Remissão	ANA, Sm, RNP	R	20,6	32,5	1:40	5 m
30	Remissão	ANA	R	20,3	18,3	anr	11 m

Pac, paciente; IFI, imunofluorescência indireta; CLIA, imunoensaio quimioluminescente; ANA, autoanticorpo antinúcleo; anr, avaliação não realizada; NR, não reagente; m, mês; R, reagente; Cardio G, anticardiolipina G; Cardio M, anticardiolipina M; Sm, anti-Sm; RNP, anti-RNP; Ro, anti-SSA(Ro); La, anti-SSB(La); ad, avaliação desconhecida; anti-p, anti-p ribossomal.

^aEm vigência de pulsoterapia com metilprednisolona e ciclofosfamida; anti-p ribossomal.

sente estudo. A diferença de sensibilidade pode ser atribuída à amostra clínica examinada. O trabalho em foco permitiu analisar o desempenho do teste de automação para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, segundo a realidade vivenciada pela população local, onde a maioria (57%) dos pacientes que realizam este exame são portadores de LES. A pesquisa

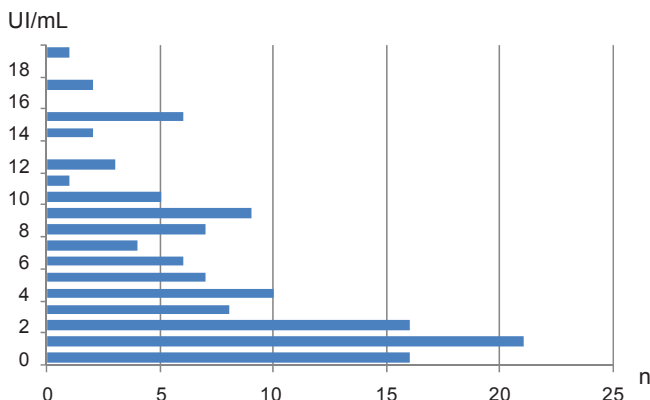


Figura 1 – Frequência dos resultados de CLIA (UI/mL) no Grupo III (n = 124).

italiana envolveu pacientes com HVC, que, eventualmente, apresentam o teste de CLIA positivo para anticorpos anti-dsDNA.⁵

O desempenho do teste CLIA para afirmar uma reação negativa foi adequado neste estudo, com as medidas de tendência central no Grupo III convergentes em valores inferiores a três vezes o valor máximo de negatividade sugerido pelo fabricante (até 19 UI/mL). A baixa frequência (3,5%) de resultados em zona cinza permitiu uma clara definição de positividade do método. A identificação dos pacientes que constituíram o Grupo III demonstra a especificidade para o

Tabela 5 – História prévia de anti-dsDNA (IFI) nos pacientes lúpicos (n = 97)

Grupo	Reagente	Não reagente	1ª vez	ad	Total
I	10	0	5	0	15
II	13	10	1	2	26
III	19	32	5	0	56
Total	42	42	11	2	97

ad, avaliação desconhecida.

anti-dsDNA utilizado no ensaio; dos 45 soros reagentes em CLIA, 91% (41/45) eram de pacientes lúpicos.

A disponibilização da amostra clínica permitiu ainda uma análise qualitativa do tipo de paciente que realiza o exame de anticorpo anti-dsDNA no hospital, identificando-se um perfil clínico e epidemiológico semelhante ao encontrado na patologia lúpica onde este autoanticorpo é prevalente.¹¹ A grande maioria dos pacientes era do sexo feminino, na faixa etária dos adultos jovens (20-39 anos), com o Serviço de Reumatologia sendo responsável por mais de 70% das solicitações dos exames. A baixa prevalência de crianças e adolescentes é justificada pelo foco do hospital no atendimento terciário de adultos.

Após a instituição da triagem por automação na pesquisa de anticorpos anti-dsDNA, as amostras positivas e com resultados em zona cinza na CLIA são testadas por IFI, usando a *Crithidia luciliae* como substrato. A implantação desta rotina gerou a otimização de tempo e de pessoal operacional de laboratório,⁶ reduzindo em mais de 70% a necessidade de técnica manual antes da liberação de resultados e diminuiu também a chance de erros de procedimentos e aleatórios que comprometem a qualidade e fidelidade dos exames liberados. A possibilidade de redução dos custos será analisada posteriormente, em outro estudo.

Ensaio internacionalmente recomendam o uso de reagentes automatizados para pesquisa de anticorpos anti-dsDNA,^{3,12-15} porém, o método de excelência na prática clínica e laboratorial para a pesquisa deste autoanticorpo permanece sendo a IFI.^{12,16}

Considerando que o painel de métodos laboratoriais para a detecção dos anticorpos anti-dsDNA é continuamente crescente, ensaios tradicionalmente utilizados na rotina de trabalho ainda estão longe de ser padronizados e amplamente aceitos. Os médicos devem estar cientes que os índices de concordância entre laboratórios, a interpretação dos resultados e a precisão do diagnóstico são dependentes da variabilidade analítica e da população de pacientes analisados.¹⁷ No presente estudo, as condições técnicas do laboratório e o encaminhamento das amostras sorológicas dos pacientes foram mantidos na rotina normal de trabalho da instituição.

Este trabalho demonstrou que a triagem dos autoanticorpos anti-dsDNA por CLIA é um método seguro (100% de sensibilidade) e rápido, que melhora a qualidade dos exames ofertados aos pacientes. Entre seus achados, observou-se também que a maioria dos resultados de CLIA rotulados como falso-positivos pertencia a pacientes lúpicos em atividade clínica e/ou laboratorial de doença, alguns dos quais vieram a se confirmar meses depois como positivos por IFI.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, Afeltra A, Galeazzi M, Gerli R, et al. Diagnostic accuracy of currently available anti-

- double-stranded DNA antibody assays. An Italian multicentre study. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(1):50-6.
2. Heidenreich U, Mayer G, Herold M, Klotz W, Al-Jazrawi SK, Lhotta K. Sensitivity and specificity of autoantibody tests in the differential diagnosis of lupus nephritis. *Lupus*. 2009;18(14):1276-80.
3. Lemarié R, Jacomet F, Goutte B, Bonnafoux C, Tridon A, Evrard B. The anti-dsDNA antibodies: validation of an original two step strategy of detection. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2011;69(1):47-53.
4. Launay D, Schmidt J, Lepers S, Mirault T, Lambert M, Kyndt X, et al. Comparison of the Farr radioimmunoassay, 3 commercial enzyme immunoassays and *Crithidia luciliae* immunofluorescence test for diagnosis and activity assessment of systemic lupus erythematosus. *Clin Chim Acta*. 2010;411(13-14):959-64.
5. Antico A, Platzgummer S, Bassetti D, Bizzaro N, Tozzoli R, Villalta D. Diagnosing systemic lupus erythematosus: new-generation immunoassays for measurement of anti-dsDNA antibodies are an effective alternative to the Farr technique and the *Crithidia luciliae* immunofluorescence test. *Lupus*. 2010;19(8):906-12.
6. Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(8):1420-2.
7. Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.
8. Callado MRM, Vieira RMRA, Araújo VMA, Callado CM, Costa Lima JR, Rodrigues JNA, et al. Prevalência dos anticorpos antinucleares (ANA) no Hospital Geral de Fortaleza no período de jan/2002 a dez/2006. *Jornal da Liga dos Reumatologistas do Norte-Nordeste (LIRNNE)*. 2007;3:118-22.
9. Kim KH, Han JY, Kim JM, Lee SW, Chung WT. Clinical significance of ELISA positive and immunofluorescence negative anti-dsDNA antibody. *Clin Chim Acta*. 2007;380:182-5.
10. Smeenk RJT. Detection of autoantibodies to dsDNA: Current insights into its relevance. *Clin Exp Rheumatol*. 2002;20:294-300.
11. Pisetsky DS. In: JH, Stone JH, Crofford LJ, White PH (eds.). *Primer on the Rheumatic Diseases*. 13.ed. Springer/Arthritis Foundation; 2008.
12. Yang JY, Oh EJ, Kim Y, Park YJ. Evaluation of Anti-dsDNA antibody tests: *Crithidia luciliae* immunofluorescence test, immunoblot, enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescence immunoassay. *Korean J Lab Med*. 2010;30(6):675-84.
13. Fiegel F, Buhl A, Jaekel HP, Werle E, Schmolke M, Ollert M, et al. Autoantibodies to double-stranded DNA--intermethod comparison between four commercial immunoassays and a research biosensor-based device. *Lupus*. 2010;19(8):957-64.
14. El-Chennawi FA, Mosaad YM, Habib HM, El-Degheidi T. Comparative study of antinuclear antibody detection by indirect immunofluorescence and enzyme immunoassay in lupus patients. *Immunol Invest*. 2009;38(8):839-50.
15. Suh-Lailam BB, Chiaro TR, Davis KW, Wilson AR, Tebo AE. Evaluation of a high avidity anti-dsDNA IgG enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011;4(8):748-54.
16. Chiaro TR, Davis KW, Wilson A, Suh-Lailam B, Tebo AE. Significant differences in the analytic concordance between anti-dsDNA IgG antibody assays for the diagnosis of systemic lupus erythematosus-Implications for inter-laboratory testing. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):1076-80.
17. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, Afeltra A, Galeazzi M, Gerli R, et al. Evaluation of current methods for the measurement of serum anti double-stranded DNA antibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1109:401-6.