RMU REVISTA MÉDICA DEL URUGUAY

SMU SINDICATO MÉDICO DEL URUGUAY

Artículo original

Comparación de un método de quimioluminiscencia versus ELISA para la búsqueda de anticuerpos anti-Sm, en apoyo al diagnóstico del lupus eritematoso sistémico

Natalia Rodríguez-Sisniega[1,2], Victor Neyra-Chagua[3,4]*

[1]Laboratorio de Inmunología (LID-108), Departamento de Ciencias Celulares y Moleculares, Facultad de Ciencias e Ingeniería, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

[2]Laboratorio de Inmunología Especializada, Asociación Española Primera de Socorros Mutuos. Br. Artigas 1525, Montevideo, Uruguay

[3]Laboratorio de Histocompatibilidad y Biología Molecular, Unidad de Trasplante Renal, Hospital Cayetano Heredia, Lima, Perú

[4]Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

Recepción: 17-09-2025

Aceptación: 30-03-2026

***Correspondencia:** Victor Neyra-Chagua. victor.neyra@upch.pe

Resumen

Introducción: Los anticuerpos (Ac.) anti-Sm son altamente específicos para el diagnóstico del lupus eritematoso sistémico (LES), aunque su frecuencia es baja. Ante la sospecha de una enfermedad autoinmune sistémica, diversas guías recomiendan un protocolo escalonado de estudio que, en la práctica clínica, no siempre se cumple. El laboratorio de la Asociación Española (Montevideo, Uruguay) comenzó a utilizar el método de quimioluminiscencia (CLIA), observando en ocasiones reactividades anti-Sm no esperadas.

Objetivos: Los objetivos fueron determinar el *cut-off* óptimo del método CLIA y comparar su desempeño diagnóstico con el ELISA para la detección de Ac. Anti-Sm**.**

Materiales y métodos: Se comparó el "cut-off" del CLIA con respecto al ELISA y a la inmunofluorescencia indirecta (IFI, ANA HEp-2) utilizando un material de referencia. Se determinaron los Ac. anti-Sm mediante CLIA y ELISA en 40 sueros de pacientes. Se calcularon la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) y el *cut-off* óptimo del CLIA mediante curva ROC. Además, se calcularon el chi cuadrado, el coeficiente kappa de Cohen y el R2 entre CLIA y ELISA.

Resultados: Los *cut-off* hallados fueron: IFI 1/4096, CLIA 1/1024 y ELISA 1/512. La sensibilidad del CLIA y del ELISA fue del 95% en ambos casos, mientras que la especificidad fue del 93% y del 100% respectivamente. El VPP del CLIA y del ELISA fue del 76% y 100%, respectivamente, y el VPN fue del 93% y del 95%, respectivamente. El *cut-off* óptimo del CLIA fue 41,5 CU (sensibilidad del 85% y especificidad del 95%), el chi cuadrado fue de 18,2 ($p < 0,01$), el coeficiente kappa fue de 0,65 ($p < 0,01$) y el coeficiente de R2 fue de 0,83 (p= 1,92 x 10^-16).

Conclusiones: El CLIA puede utilizarse como una alternativa al ELISA para la búsqueda de Ac. anti-Sm, siempre que se ajuste el *cut off* del método a la población de cada laboratorio, utilizando la IFI, ANA HEp-2 en paralelo o en forma escalonada.

Palabras clave: Inmunoensayo de quimioluminiscencia. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima. ANA por inmunofluorescencia indirecta sobre sustrato celular HEp-2. Anticuerpos anti-Sm. Lupus eritematoso sistémico.

© 2026 Los autores. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia **Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0)**. Publicado con index en nombre de Sindicato Médico del Uruguay.

Introducción

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

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

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

Con respecto a los criterios de clasificación del LES, en el año 2019 la Liga Europea contra el Reumatismo (EULAR) y el Colegio Americano de Reumatología (ACR) aunaron esfuerzos con el fin de mejorar la sensibilidad y especificidad de los criterios de clasificación ya existentes (ACR 1982, revisados en 1997, y las Clínicas de Colaboración Internacional del LES [SLICC] 2012) e incluyeron el resultado positivo de los ANA-HEp-2 con un título ≥ 1/80 como criterio de entrada para la clasificación del LES[10].

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

Existen varios métodos para la determinación de ENA de uso habitual en los laboratorios clínicos (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima [ELISA], inmunoensayo de quimioluminiscencia [CLIA], inmunoblot, etc.) que difieren en términos de desempeño diagnóstico, valores de referencia y sustrato antigénico utilizado, entre otras características, siendo el ELISA el método más utilizado, no existiendo hasta el momento un método de referencia[1,11-13].

En el año 2020, el laboratorio de Inmunología de la Asociación Española Primero de Socorros Mutuos (AEPSM) (institución privada de atención médica) de la ciudad de Montevideo (Uruguay) comenzó a utilizar el método de CLIA para la determinación de Ac. anti-ENA, en sustitución del ELISA clásico.

La tecnología de CLIA en los ensayos inmunológicos, entre otras características, incorpora como fase sólida perlas paramagnéticas empleadas como estrategia de separación de los inmunocomplejos formados en la reacción, con alta capacidad de unión de los Ac., lo que aumenta la sensibilidad analítica con respecto al ELISA convencional[14]. Más aún, hay autores que reportan una alta especificidad del método CLIA en comparación con la IFI para la búsqueda de ANA-HEp-2[12].

Desde el advenimiento del método CLIA en el laboratorio de la AEPSM, se han evidenciado casos aislados de pacientes con resultados positivos discordantes y "no esperados" de Ac. anti-Sm, definiendo como tales aquellos resultados con ANA-HEp-2 negativos[4,11].

El objetivo general de este estudio fue determinar el desempeño diagnóstico y el *cut-off* óptimo del método de CLIA para la búsqueda de Ac. IgG anti-Sm.

Metodología

Diseño del estudio

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

Población y muestras de estudio

Para el presente trabajo se utilizaron muestras remanentes de suero de 40 pacientes (**Tabla 1**), de los cuales 20 presentaban diagnóstico de LES según los criterios de ACR/EULAR 2019 y antecedentes de Ac. anti-Sm positivos por el método de quimioluminiscencia (LES/Sm+), y 20 fueron seleccionados como controles sin LES (10 presentaban otra EAS y 10 no presentaban EAS), que fueron derivados oportunamente por el médico tratante para la extracción de sangre y su procesamiento en el laboratorio de inmunología de la AEPSM, con la solicitud de Ac. anti-ENA por método de CLIA. Una vez que fueron procesados por este método, los remanentes de descarte de los sueros fueron conservados en un congelador a -20°C hasta el momento de su procesamiento por el método de ELISA. El 80% de estas muestras remanentes ya habían sido conservadas en un congelador a -20°C para otro fin (controles internos de calidad de la rutina del laboratorio) (**Figura 1**). El muestreo de la población con LES/Sm+ fue de tipo no probabilístico consecutivo, mientras que el de la población control fue probabilístico aleatorio. El período de recolección de las muestras fue desde enero de 2020 a julio de 2022.

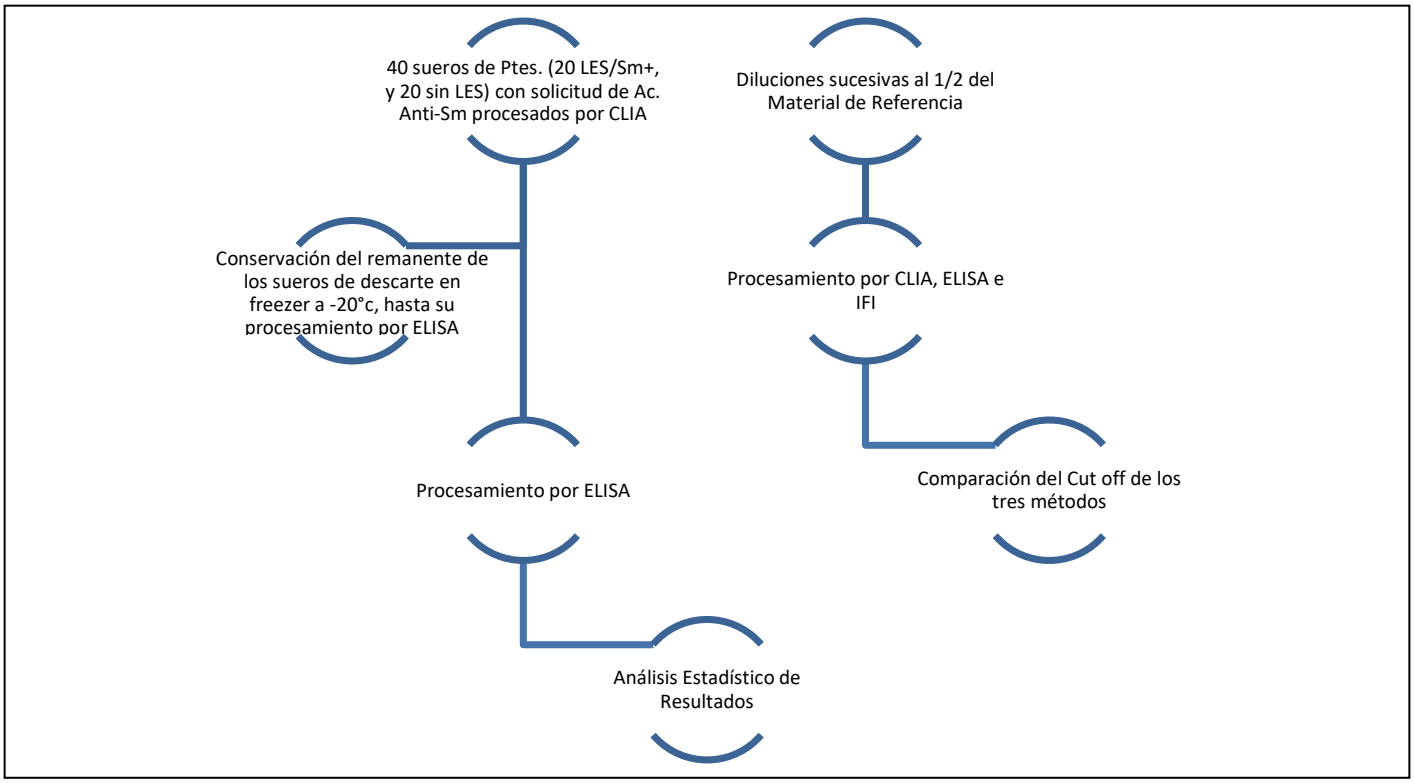


Figura 1. Flujograma de trabajo de la población de estudio y del material de referencia.

Tabla 1. Datos clínicos, sexo y edad de la población control y de la población con LES/Ac. anti Sm + (n:40).

N.º Codificación	Sexo	Edad (años)	Dato Clínico	N.º Codificación	Sexo	Edad (años)	Dato clínico
1	F	78	Control	21	F	67	LES
2	F	36	Control	22	F	34	LES
3	F	47	Control	23	F	52	LES
4	F	63	Control	24	F	58	LES
5	F	65	Control	25	F	37	LES
6	F	58	Control	26	F	39	LES
7	F	66	Control	27	F	29	LES
8	F	52	Control	28	F	58	LES
9	F	46	Control	29	F	29	LES
10	M	71	Control	30	F	43	LES
11	F	71	EMTC	31	F	29	LES
12	M	57	ED	32	F	29	LES
13	F	64	PM	33	F	62	LES
14	F	63	SJOGREN	34	F	29	LES
15	F	72	SJOGREN	35	F	21	LES
16	F	34	EPID	36	F	47	LES
17	F	53	PAR	37	F	37	LES
18	F	62	SJOGREN	38	F	24	LES
19	M	71	VASCULITIS	39	F	18	LES
20	F	48	ARTRITIS	40	F	36	LES

Materiales y métodos

Para la determinación de los Ac. anti-Sm por los métodos de CLIA, ELISA y ANA-HEp-2 por IFI; se utilizaron reactivos de la marca comercial QUANTA Flash®, QUANTA Lite® y NOVA Lite®, HEp-2 Select, respectivamente, del laboratorio INOVA Diagnostics, San Diego, California, Estados Unidos.

Con el fin de realizar la comparación de los *cut-off* entre los métodos de CLIA, ELISA e IFI (ANA-HEp-2), se adquirió un material de referencia de Ac. anti-Sm provisto por el *Autoantibody Standardization Committee*, Florida, Estados Unidos, CAT#: IS2076: anti-Sm (*nuclear large/coarse speckled pattern* AC-5).

Procedimiento y técnicas

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

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

La búsqueda de Ac. anti-Sm se realizó por diferentes métodos de inmunoensayo que se basan en revelar la presencia de Ac. IgG anti-Sm en el suero del paciente mediante un conjugado formado por un Ac. dirigido a las IgG humanas, unido a distintas sustancias según el método utilizado (enzimas en el método de ELISA, sustancia quimioluminiscente en el método de CLIA y sustancia fluorescente en el método de IFI). El antígeno (Ag) Sm se encuentra fijo en una fase sólida (Ag. recombinante humano en el fondo del pocillo de ELISA, Ag. purificado nativo unido a la superficie de micropartículas paramagnéticas en el método de CLIA, Ag. en su estado nativo en un sustrato celular proveniente de una línea de carcinoma laríngeo humano, HEp-2, fijado a una lámina en el método de IFI).

La reacción se evidencia mediante la adición de un sustrato cromógeno de la enzima en el ELISA, generando un color; mediante la aplicación de una sustancia iniciadora de la reacción o *trigger* generando emisión de luz de la sustancia quimioluminiscente en el método de CLIA; o mediante la emisión de fluorescencia bajo un microscopio de fluorescencia en el método de IFI. La luz generada en el método de CLIA se extrapola a una curva de calibración y los resultados son expresados en unidades de quimioluminiscencia (CU). En el ELISA, se lee la densidad óptica (OD) del color generado luego de detener la reacción con un ácido fuerte, mediante un espectrofotómetro, calculando el resultado por regla de tres con la OD de un control cut-off con concentración conocida de Ac. anti-Sm expresado en unidades por mililitro (U/ml). En la IFI, el resultado se expresa como la fracción de la dilución realizada (título) del suero, en caso de evidenciarse fluorescencia.

Se realizó el procesamiento de los sueros y el material de referencia siguiendo las recomendaciones del fabricante. Un resultado se considera positivo para el método de CLIA cuando el valor es igual o mayor a 20 CU) y, para el método de ELISA, cuando el valor es igual o mayor a 20 U/ml, según recomendación del fabricante. Para los ANA-HEp-2 por IFI, se considera un resultado positivo la presencia de fluorescencia con un patrón moteado grueso a partir de la dilución de tamizaje de 1/80.

El procesamiento de muestras por el método CLIA fue realizado en un equipo de inmunoensayo automatizado de la marca Bio-Flash® (INOVA Diagnostics Inc.). Con respecto al procedimiento del método de ELISA, se utilizaron un lavador de placa (PW40) y un lector o espectrofotómetro (PR4100) de la marca Bio-Rad. La lectura de las láminas de IFI (ANA HEp-2) se realizó en un microscopio de inmunofluorescencia Axioscope 5 (ZEISS). Las muestras fueron procesadas junto con los controles positivos y negativos de cada kit, luego de realizarse la calibración correspondiente en el caso del método de CLIA.

El presente estudio fue aprobado por los comités de Ética de la Asociación Española Primero de Socorros Mutuos (AEPSM) y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El estudio es de gran interés y beneficio para la AEPSM, en particular para los pacientes y médicos de la policlínica de autoinmunidad, y conlleva una mejora en la calidad del resultado. Se utilizaron datos demográficos como sexo, edad y condición diagnóstica, con fines de análisis de los resultados. El manejo de datos se realizó conforme a las normas éticas vigentes. Los remanentes de sueros fueron descartados, no siendo utilizados para otras investigaciones. Durante las reuniones médicas semanales de la Policlínica de Enfermedades Autoinmunes de la AEPSM, se realizó la devolución de los resultados a los clínicos.

Análisis estadístico

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

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

Se determinó el *cut-off* óptimo en términos de sensibilidad y especificidad del método de CLIA para anti-Sm mediante el análisis de la curva *receiver operating characteristic* ROC[15,16].

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

Resultados

Se recibieron en el sector de inmunología del laboratorio de la AEPSM 1.227 sueros de pacientes con solicitud de Ac. anti-Sm por método de CLIA, de los cuales el 39 (3,2%) arrojaron resultados positivos, 1.187 (96,7%) negativos, y 1 (el 0,1%) muestra no fue procesada por tener cantidad insuficiente. De las 1.227 muestras, se seleccionaron 20 de pacientes con LES/Sm+ y 20 de población control (con EAS y sin EAS). El promedio de edad de los 40 pacientes fue de 48,9 años con una proporción mujer:hombre de 12:1.

En las **Tablas 2** y **3** se muestran y describen los resultados de los Ac. anti-Sm por CLIA, ELISA e IFI.

Para el método de CLIA se obtuvo una sensibilidad del 95%, una especificidad del 75%, un VPP del 79%

Tabla 2. Ac. anti-Sm (CLIA/ELISA) y ANA en poblacion control vs. población con LES/Sm+.

n°	CLIA (CU)	ELISA (U/mL)	ANA (IFI)	Dato clínico
Controles s/EAS				
1	<3,3	2,3	Negativo	Control
2	<3,3	3,4	Negativo	Control
3	<3,3	3,5	Negativo	Control
4	<3,3	1,6	Negativo	Control
5	<3,3	2,4	Negativo	Control
6	<3,3	10,1	Negativo	Control
7	<3,3	3,1	Negativo	Control
8	10	4,3	Negativo	Control
9	102	5,8	Negativo	Control
10	41	8,5	Negativo	Control
Controles c/EAS				
11	<3,3	3,1	Negativo	EMTC
12	<3,3	1,6	Negativo	ED
13	<3,3	5,6	Homogéneo 1/640	PM
14	<3,3	3,1	Moteado 1/160	SJOGREN
15	<3,3	5,9	Moteado 1/320	SJOGREN
16	34,8	12,1	Moteado 1/80	EPID
17	<3,3	3,5	Moteado 1/640	PAR
18	<3,3	2,8	Moteado 1/2560	SJOGREN
19	41	8,5	Negativo	VASCULITIS
20	27	9,2	Negativo	ARTRITIS

...continuación tabla 2.

n°	CLIA (CU)	ELISA (U/mL)	ANA (IFI)	Dato clínico
Casos				
21	32,0	37,8	Moteado 1/2560	LES
22	609,0	100,6	Moteado 1/160	LES
23	63,0	67,9	Moteado 1/2560	LES
24	42,0	33,8	Homogéneo 1/2560	LES
25	> 693,5	125,6	Moteado 1/5120	LES
26	115,6	63,7	Moteado 1/2560	LES
27	> 693,5	120,9	Moteado 1/2560	LES
28	> 693,5	130,1	Moteado 1/2560	LES
29	74,0	60	Moteado 1/2560	LES
30	483,0	96,1	Moteado 1/640	LES
31	> 693,5	121,8	Moteado 1/2560	LES
32	> 693,5	146,1	Homogéneo 1/5120	LES
33	18,0	47,3	Homogéneo 1/160	LES
34	> 693,5	169,4	Homogéneo 1/5120	LES
35	313,0	125,6	Homogéneo 1/2560	LES
36	599,0	108,1	Moteado 1/5120	LES
37	76,0	46,5	Homogéneo 1/640	LES
38	57,0	5,1	Homogéneo 1/640	LES
39	59,0	24,7	Moteado 1/320	LES
40	28,0	70	Moteado 1/80	LES

EAS: Enfermedad autoinmune sistémica; EMTC: enfermedad mixta del tejido conectivo; ED: esclerodermia; PM: polimiositis; SJÖGREN: síndrome de Sjögren; EPID: enfermedad pulmonar intersticial difusa; PAR: poliartritis reumatoidea; LES: lupus eritematoso sistémico.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de los Ac. anti-Sm en la población de estudio por CLIA y ELISA.

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

Se encuentran representados la media, desvío estándar, error estándar e intervalo de confianza del 95% de los resultados obtenidos de Ac. anti-Sm en población control (sana y con otra enfermedad autoinmune sistémica) y en población con lupus eritematoso sistémico (LES).

y un VPN del 94%, mientras que el método de ELISA presentó una sensibilidad del 95%, una especificidad del 100%, un VPP del 100% y un VPN del 95%.

La tabla de contingencia, así como los resultados del análisis de chi cuadrado y del coeficiente kappa de Cohen hallados, se muestran en las **Tablas 4, 5** y **6**.

Al realizar el análisis de regresión lineal, se encontró un coeficiente R^2 de 0,83 con un valor de p= 1,92 x 10^-16 (ANOVA). El valor de la pendiente (b) fue 4,73 (p= 1,92 x 10^-16). En la **Figura 2** se muestra la curva de regresión ajustada del CLIA en base a los resultados del método de ELISA.

En la **Figura 2** se muestra la curva ROC de los métodos CLIA y ELISA, con los valores de *cut-off* del CLIA que muestran los más altos valores de especificidad con respecto a los de sensibilidad (41,5 CU con 85% y 95%, y 108,8 CU con 55% y 100% de sensibilidad y especificidad, respectivamente).

Tabla 4. Contingencia de resultados de Ac. anti-Sm (CLIA vs. ELISA).

			ELISA		
			Negativo	**Positivo**	**Total**
CLIA	Negativo	Recuento	15	1	16
		Recuento esperado	8,4	7,6	16,0
	Positivo	Recuento	6	18	24
		Recuento esperado	12,6	11,4	24,0
	Total	Recuento	21	19	40
		Recuento esperado	21,0	19,0	40,0

Recuento de resultados observados y esperados positivos y negativos de Ac. anti-Sm realizados por inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA) con respecto a los que fueron positivos y negativos por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).

Tabla 5. Asociación entre resultados del método de CLIA y ELISA.

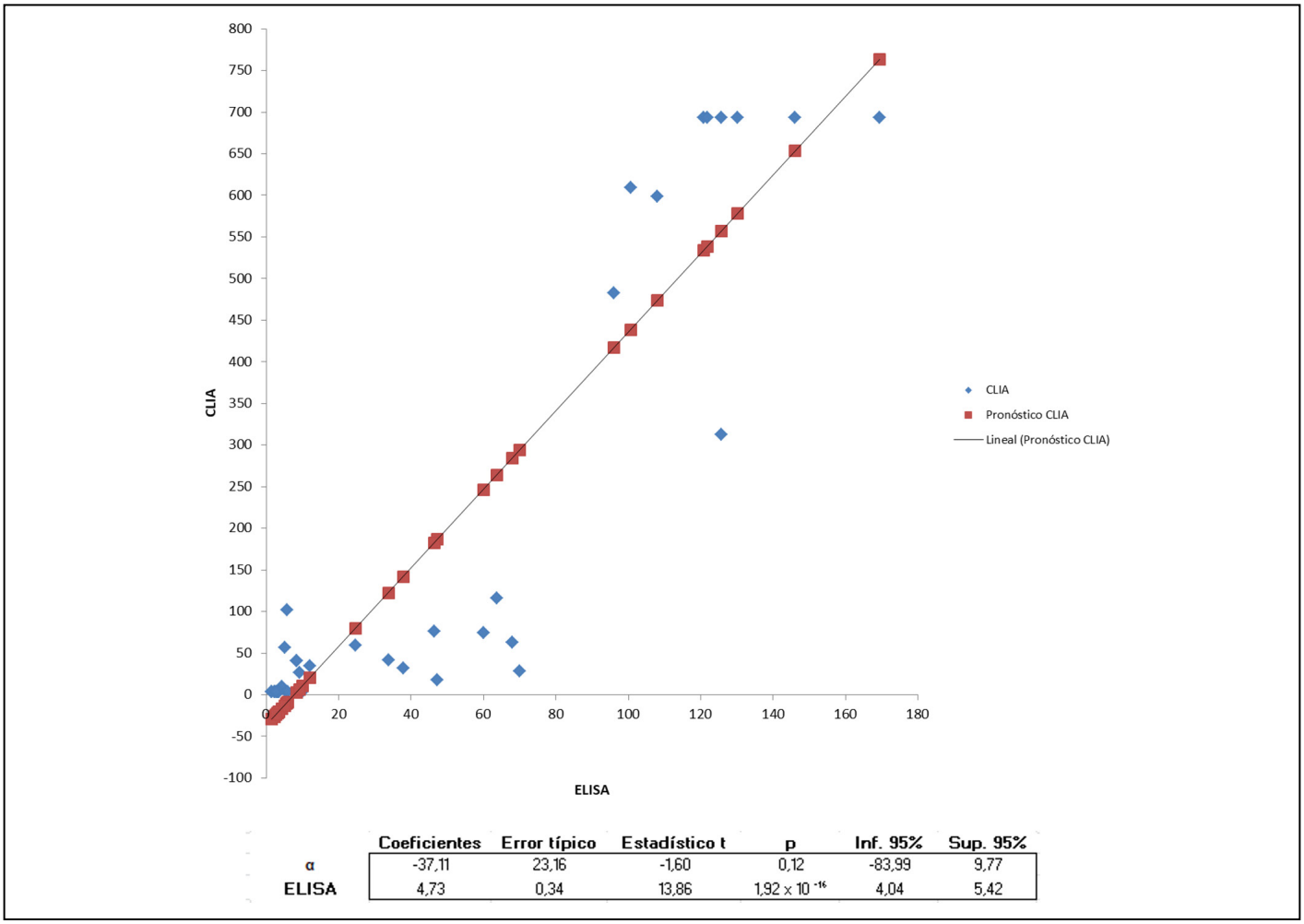
	Valor	**gl**	**Significación asintónica (bilateral)**
Chi² de Pearson	18.195[a]	1	< 0,01
Corrección de Continuidad[b]	15.543	1	< 0,01
Razón de verosimilitud	20.878	1	< 0,01
N.º de casos válidos	40		

a. Análisis de asociación entre los resultados del método de CLIA y el ELISA mediante el cálculo de Chi²: 18.195, p < 0,01.
b. Análisis de asociación entre los resultados del método de CLIA y el ELISA mediante el cálculo de Chi² con corrección de Yates: 15.543, p <0,01.
Razón de verosimilitud Chi²: 20.878 p < 0,01.
Grados de libertad (gl).

Tabla 6. Grado de acuerdo entre el método CLIA y ELISA.

	Valor	**Error estandar asintónico[a]**	**T aproximada[b]**	**Significación aproximada**
Medida de acuerdo Kappa	0,653*	0,115	4,266	< 0,01
N.° de casos válidos	40			

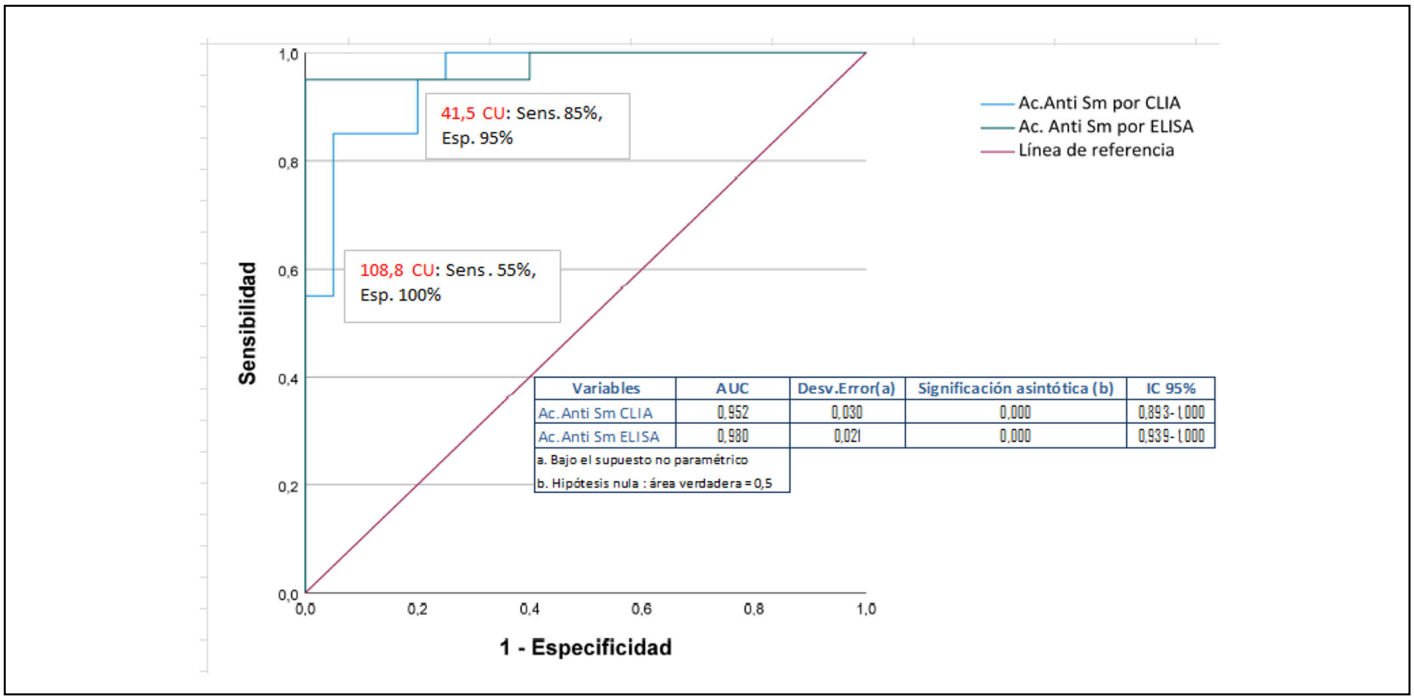
a. No se supone la hipótesis nula.
b. Utilización del error estándar asintótico que presupone la hipótesis nula.
*IC del 95%: 0,428 - 0,878.
Resultado del cálculo del coeficiente Kappa de Cohen que muestra el grado de acuerdo del método de CLIA con el ELISA (0.653, intervalo de confianza (IC) del 95%: 0,428 - 0,878 y su significación estadística (p<0,01)).



	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	p	Inf. 95%	Sup. 95%
α	-37,11	23,16	-1,60	0,12	-83,99	9,77
ELISA	4,73	0,34	13,86	$1,92 \times 10^{-16}$	4,04	5,42

Figura 2. Curva de regresión ajustada: CLIA vs. ELISA.

En esta curva se muestra la proporción de la variabilidad de los valores de Ac. Ant- Sm hallados por el método de CLIA que son explicados por los valores hallados por el método de ELISA. Coeficiente de determinación (R^2): 0,83 (p=1,92 x 10^-16). Valor de la pendiente (coeficiente b): 4,73.



Variables	AUC	Desv.Error(a)	Significación asintótica (b)	IC 95%
Ac.Anti Sm CLIA	0,952	0,030	0,000	0,893- 1,000
Ac.Anti Sm ELISA	0,980	0,021	0,000	0,939- 1,000

a. Bajo el supuesto no paramétrico
b. Hipótesis nula : área verdadera = 0,5

Figura 3. Curva ROC de Ac. anti-Sm por CLIA vs. ELISA.

Curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) que muestra el desempeño diagnóstico del método de CLIA versus el ELISA para la búsqueda de los Ac. anti-Sm. Se muestran dos valores de *cut-off* por método de CLIA con sus respectivas sensibilidad (Sens.) y especificidad (Esp.) (41,5 CU: 85% y 95%, respectivamente, y 108,8 CU: 55% y 100%, respectivamente). Área bajo la curva (AUC): intervalo de confianza (IC), error estándar (Desv. Error).

Tabla 7. *Cut-off* de los métodos de CLIA, ELISA e IFI frente a diluciones sucesivas del *standard* de referencia del Ac. anti-Sm.

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

Material de referencia (*Standard* Anti-Sm) puro y con diluciones al medio procesado por método de CLIA, ELISA e IFI (ANA-HEp-2) y sus puntos de corte correspondientes (1/1024: 25,9 CU, 1/512: 36,2 (U/mL) y 1/4096: débil +).

En la **Tabla 7** se muestran los resultados de la titulación del material de referencia de Ac. anti-Sm una vez procesados por los métodos de CLIA, ELISA e IFI. El título *cut-off* del material de referencia por método de CLIA fue de 1/1024 (25,9 CU), por IFI de 1/4096, y por ELISA de 1/512 (36,2 U/mL).

Discusión

Inicialmente se planificó trabajar con un N de 80 muestras, pero dada la dificultad de poder obtenerlas en el plazo de estudio, se realizó un ajuste del tamaño muestral (n=40), cuya potencia estadística calculada fue de 0,84, conservando un valor aceptable y preservando la importancia del mismo (software GPower)[17].

La sensibilidad encontrada del método de CLIA fue igual a la del método ELISA, aunque la especificidad encontrada (75%) fue menor que la del ELISA, cuya especificidad hallada fue del 100%. Esta característica es importante resaltarla, ya que a la hora de realizar un diagnóstico de una enfermedad autoinmune como el LES, es de relevancia que la prueba sea muy específica, aunque se pierda un poco de sensibilidad. Para lograr esto, si analizamos la curva ROC, encontramos que el valor de *cut-off* para el método CLIA con el valor más alto de especificidad diagnóstica (95%), sin una gran pérdida de sensibilidad (85%), fue 41,5 CU, mientras que el valor de 108,8 CU, si bien posee un 100% de especificidad, la sensibilidad cae a un 55%. Por lo que, del análisis de la curva, se deduce que el valor de *cut-off* más adecuado para el método CLIA en nuestra población es 41,5 CU y no 20,0 CU, como recomienda el fabricante.

Con respecto al análisis de asociación entre los métodos de CLIA (QUANTA Flash®-INOVA Diagnostics) y ELISA (Quanta Lite®-INOVA Diagnostics), encontramos que existe asociación estadísticamente significativa (Chi cuadrado de 18,2; $p < 0,01$), mientras que el grado de acuerdo hallado fue sustancialmente bueno entre ambos métodos (65%; $p < 0,01$) (coeficiente kappa de Cohen).

Cuando analizamos los diferentes *cut-off* de los métodos de CLIA, ELISA e IFI al hacer las diluciones sucesivas del material de referencia, observamos que la IFI es el método más sensible, con un valor de 1/4096, dos títulos por encima del método CLIA (1/1024) y tres títulos por encima del ELISA (1/512), evidenciando que un valor positivo por CLIA con ANA HEp-2 negativo nos alertaría de la presencia de un falso positivo del método CLIA.

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

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

A su vez, en un estudio realizado en el año 2016 por Melguizo et al., que comparaban el método CLIA (Zenit RA) con el ELISA (QUANTA Lite®-INOVA Diagnostics) para cada uno de los ENA, se encontró un excelente grado de acuerdo (coeficiente kappa de Cohen) para Ac. anti-SSA/Ro, bueno para Ac. anti-SSB/La y Ac. anti-SCL-70, moderado para Ac. anti-RNP y malo para Ac. snti-Sm y Jo-1, aunque elevando el *cut-*

off del método CLIA, mejoraron la especificidad y el grado de acuerdo para los Ac. anti-Sm y Jo-1[18].

Conclusión

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

Creemos que el CLIA puede ser utilizado como alternativa en el laboratorio para la búsqueda de Ac. Anti-Sm, ajustando el punto de corte del método, siendo para nuestra población de estudio un valor de 41,5 CU. Creemos que es importante estar en alerta frente a un resultado positivo por CLIA con un resultado de ANA-HEp-2 por IFI negativo, dado que la probabilidad de un falso resultado positivo del método CLIA es alta en estos casos. Por ello, se sugiere la utilización de ambas técnicas en paralelo o en forma escalonada en el laboratorio clínico para la instancia diagnóstica en los pacientes con sospecha clínica de LES.

Agradecimientos

A las licenciadas del laboratorio de la ASESP, L. Emed, G. Pacheco y E. Barreiro, por su colaboración.

Financiación

Este estudio se realizó en el marco de una tesis de Maestría de Inmunología, sin recibir financiación para los autores. El reactivo de ELISA QUANTA Lite® (INOVA Diagnostics) y el envío del material de referencia CAT# IS2076: Anti-Sm (*nuclear large/coarse speckled pattern* AC-5) (este material no tiene costo), fueron donados por el representante de INOVA Diagnostics en Uruguay (Biodiagnóstico-Cabinsur S.A.); el resto de los reactivos se utilizó en el marco de los estudios solicitados al laboratorio de la AEPSM. Por último, los materiales de laboratorio utilizados (pipetas, punteros, agua destilada y papel) fueron aportados por la institución donde se llevó a cabo el estudio.

Contribución de autoría

Natalia Rodríguez: Conceptualización, Adquisición de financiación, Administración del proyecto, Metodología, Recursos, Análisis formal, Validación, Software, Investigación, Redacción - revisión y edición, Redacción - borrador inicial, Recopilación de datos, Visualización.

Victor Neyra Chagua: Redacción - revisión y edición, Supervisión, Validación.

Conflicto de intereses

No se identificó ningún conflicto de interés comercial, financiero o personal para la investigación, autoría y/o publicación de este artículo.

Declaraciones éticas

El estudio fue aprobado por los comités de ética de la Asociación Española Primera de Socorros Mutuos el día 20/07/2021 y de la Universidad Peruana Cayetano Heredia el 5/04/2022 bajo el código de inscripción 205999, y se realizó de conformidad con la normativa ética aplicable a la investigación en seres humanos. Se utilizaron datos demográficos, como sexo, edad y condición diagnóstica, exclusivamente con fines de análisis. Para garantizar la confidencialidad, los datos fueron anonimizados y tratados conforme a la normativa vigente de protección de datos personales. Los remanentes de suero fueron descartados y no se utilizaron para otras investigaciones. Durante las reuniones médicas semanales de la Policlínica de Enfermedades Autoinmunes de la AEPSM, se realizó la devolución de los resultados a los clínicos.

Disponibilidad de datos y materiales

El conjunto de datos que respalda los resultados de este estudio se encuentra disponible previa solicitud razonable al autor de correspondencia.

Aprobado por el Consejo Editorial de la Revista Médica del Uruguay.

Referencias

1. Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S. Anti-Sm and anti-RNP antibodies. Autoimmunity. 2005; 38(1):47-54. Disponible en: http://doi.org/10.1080/08916930400022715
2. Didier K, Bolko L, Giusti D, Toquet S, Robbins A, Antonicelli F, et al. Autoantibodies associated with connective tissue diseases: What meaning for clinicians? Front Immunol. 2018;9:541. Disponible en: http://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00541
3. Javier Zepeda C. Anticuerpos anti-nucleares: Una familia diversa. Rev Med Hondur. 2002;70:189–93.
4. Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al. International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. Ann Rheum Dis. 2014; 73(1):17-23. Disponible en: http://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203863
5. Carballo OG, Ingénito FB, Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. Primer consenso argentino para la estandarización de la determinación de anticuerpos anti-nucleares por inmunofluorescencia indirecta-HEp-2. Acta Bioquim Clin Latinoam. 2012; 46(1):3–13.
6. Rodríguez N, Montenegro C, Buzzi C, Cairoli E, Coelho Andrade LE, Danza Á, et al. 1er Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares Departamento de Laboratorio Clínico, Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital de Clínicas Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Pasteur. Rev Med Urug. 2019; 35(4):302–15.
7. Chan EKL, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo OG, Conrad K, Francescantonio PLC, et al. Report on the second

International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. Lupus. 2016; 25(8):797-804. Disponible en: http://doi.org/10.1177/0961203316640920

8. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. Am J Clin Pathol. 2002; 117(2):316-24. Disponible en: http://doi.org/10.1309/Y5VF-C3DM-L8XV-U053
9. Tonutti E, Bizzaro N, Morozzi G, Radice A, Cinquanta L, Villalta D, et al. The ANA-reflex test as a model for improving clinical appropriateness in autoimmune diagnostics. Auto Immun Highlights. 2016;7(1):9. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s13317-016-0080-3
10. Aringer M. EULAR/ACR classification criteria for SLE. Semin Arthritis Rheum. 2019; 49(3S):S14-7. Disponible en: http://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2019.09.009
11. Munive R, Domínguez JIS, Solís RG, Eugenia M, Botello S. Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares. Rev Latinoam Patol Clínica y Med Lab. 2010;57(2):100–4.
12. Cinquanta L, Fontana DE, Bizzaro N. Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? Auto Immun Highlights. 2017;8(1):9. Disponible en: http://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2
13. Oh J, Park Y, Lee KA, Kim HS. Detection of anti-extractable nuclear antigens in patients with systemic rheumatic disease via fluorescence enzyme immunoassay and its clinical utility. Yonsei Med J. 2020;61(1):73-8. Disponible en: http://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.1.73
14. Mahler M, Bentow C, Serra J, Fritzler MJ. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2016;38(1):14-20. Disponible en: http://doi.org/10.3109/08923973.2015.1077461
15. López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández S. Curvas ROC. Cad Aten Primaria. 1998;5(4):229-35.
16. Whiting PF, Sterne JAC, Westwood ME, Bachmann LM, Harbord R, Egger M, et al. Graphical presentation of diagnostic information. BMC Med Res Methodol. 2008;8(1):20. Disponible en: http://doi.org/10.1186/1471-2288-8-20
17. Mayr S, Erdfelder E, Buchner A, Faul F. A short tutorial of GPower. Tutor Quant Methods Psychol. 2007;3(2):51-9. Disponible en: http://doi.org/10.20982/tqmp.03.2.p051
18. Melguizo Madrid E, González-Rodríguez C, Ávila-García M de G, Arrobas-Velilla T, Fernández-Riejos P. Zenit RA evaluation, a solid-phase chemiluminescence immunoassay for detection of anti-cellular antibodies. Bioanalysis. 2017;9(5):435-45. Disponible en: http://doi.org/10.4155/bio-2016-0252

Comparison of chemiluminescence versus ELISA methods for anti-Sm antibodies detection in support of systemic lupus erythematosus diagnosis

Abstract

Introduction: Anti-Sm antibodies (Ab.) are highly specific for the diagnosis of systemic lupus erythematosus (SLE), although they occur infrequently. In cases of suspected systemic autoimmune disease, several guidelines recommend a stepwise testing protocol which, in clinical practice, is not always followed. The laboratory of the Asociación Española (Montevideo, Uruguay) began using the chemiluminescence method (CLIA), occasionally observing unexpected anti-Sm reactivities.

Objectives: The objectives were to determine the optimal cut-off of the CLIA method and to compare its diagnostic performance with ELISA for the detection of anti-Sm antibodies.

Materials and methods: The CLIA cut-off was compared with ELISA and indirect immunofluorescence (IIF, ANA HEp-2) using a reference material. Anti-Sm antibodies were determined by CLIA and ELISA in 40 patient sera. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and the optimal CLIA cut-off were calculated by ROC curve analysis. In addition, chi-square, Cohen's kappa coefficient, and R2 between CLIA and ELISA were calculated.

Results: The cut-offs found were: IIF 1/4096, CLIA 1/1024, and ELISA 1/512. The sensitivity of both CLIA and ELISA was 95%, whereas specificity was 93% and 100%, respectively. The PPV of CLIA and ELISA was 76% and 100%, respectively, and the NPV was 93% and 95%, respectively. The optimal CLIA cut-off was 41.5 CU (85% sensitivity and 95% specificity), chi-square was 18.2 ($p < 0.01$), the kappa coefficient was 0.65 ($p < 0.01$), and the R2 coefficient was 0.83 ($p = 1.92 \times 10^{-16}$).

Conclusions: CLIA may be used as an alternative to ELISA for the detection of anti-Sm antibodies, provided that the method cut-off is adjusted to the population of each laboratory, using IIF, ANA HEp-2 either in parallel or in a stepwise manner.

Keywords: Chemiluminescent immunoassay. Enzyme-linked immunosorbent assay. ANA by indirect immunofluorescence on HEp-2 cell substrate. Anti-Sm antibodies. Systemic lupus erythematosus.

Comparação de um método de quimioluminescência versus ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-Sm, em apoio ao diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmico

Resumo

Introdução: Os anticorpos (Ac.) anti-Sm são altamente específicos para o diagnóstico do lúpus eritComparação de um método de quimioluminescência versus ELISA para a pesquisa de anticorpos anti-Sm, em apoio ao diagnóstico do lúpus eritematoso sistêmicoematoso sistêmico (LES), embora sua frequência seja baixa. Diante da suspeita de uma doença autoimune sistêmica, diversas diretrizes recomendam um protocolo escalonado de estudo que, na prática clínica, nem sempre é cumprido. O laboratório da Asociación Española (Montevidéu, Uruguai) começou a utilizar o método de quimioluminescência (CLIA), observando ocasionalmente reatividades anti-Sm não esperadas.

Objetivos: Os objetivos foram determinar o cut-off ótimo do método CLIA e comparar seu desempenho diagnóstico com o ELISA para a detecção de Ac. anti-Sm.

Materiais e métodos: O cut-off do CLIA foi comparado com o ELISA e a imunofluorescência indireta (IFI, ANA HEp-2) utilizando um material de referência. Os Ac. anti-Sm foram determinados por CLIA e ELISA em 40 soros de pacientes. Calcularam-se a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo (VPP), o valor preditivo negativo (VPN) e o cut-off ótimo do CLIA por meio de curva ROC. Além disso, calcularam-se o qui-quadrado, o coeficiente kappa de Cohen e o R2 entre CLIA e ELISA.

Resultados: Os cut-offs encontrados foram: IFI 1/4096, CLIA 1/1024 e ELISA 1/512. A sensibilidade do CLIA e do ELISA foi de 95% em ambos os casos, enquanto a especificidade foi de 93% e 100%, respectivamente. O VPP do CLIA e do ELISA foi de 76% e 100%, respectivamente, e o VPN foi de 93% e 95%, respectivamente. O cut-off ótimo do CLIA foi de 41,5 CU (sensibilidade de 85% e especificidade de 95%), o qui-quadrado foi de 18,2 ($p < 0,01$), o coeficiente kappa foi de 0,65 ($p < 0,01$) e o coeficiente R2 foi de 0,83 ($p = 1,92 \times 10^{-16}$).

Conclusões: O CLIA pode ser utilizado como alternativa ao ELISA para a detecção de Ac. anti-Sm, desde que o cut-off do método seja ajustado à população de cada laboratório, utilizando a IFI, ANA HEp-2 em paralelo ou de forma escalonada.

Palavras-chave: Imunoensaio de quimioluminescência. Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima. ANA por imunofluorescência indireta em substrato celular HEp-2. Anticorpos anti-Sm. Lúpus eritematoso sistêmico.