

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ACURÁCIA DE FASCICULAÇÕES MUSCULARES PARA O  
DIAGNÓSTICO DE FORMAS TARDIAS DE ATROFIA MUSCULAR  
ESPINHAL 5q**

MARCO ANTONNIO ROCHA DOS SANTOS

Porto Alegre – RS  
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ACURÁCIA DE FASCICULAÇÕES MUSCULARES PARA O  
DIAGNÓSTICO DE FORMAS TARDIAS DE ATROFIA MUSCULAR  
ESPINHAL 5q**

MARCO ANTONNIO ROCHA DOS SANTOS

Orientador: Prof. Dr Jonas Alex Morales Saute

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Porto Alegre  
2021

## CIP - Catalogação na Publicação

Dos Santos, Marco Antonnio Rocha  
ACURÁCIA DE FASCICULAÇÕES MUSCULARES PARA O  
DIAGNÓSTICO DE FORMAS TARDIAS DE ATROFIA MUSCULAR  
ESPINHAL Sq / Marco Antonnio Rocha Dos Santos. --  
2021.  
64 f.  
Orientador: Jonas Alex Morales Saute.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2021.

1. atrofia muscular espinhal. 2. fasciculação. 3.  
ultrassonografia. 4. semiologia. I. Saute, Jonas Alex  
Morales, orient. II. Título.

*“A perseverança é a mãe da boa sorte.”*

Miguel de Cervantes

## **Agradecimentos**

Aos meus pais por todo o apoio ao longo da vida, pela educação, pelo amor e por todas as oportunidades que me proporcionaram para garantir minha formação profissional e pessoal. À minha esposa, Hamanda Valle, pelo apoio incondicional em todas as etapas desse projeto e por todo o amor.

Aos pacientes e familiares chamados para a pesquisa e que aceitaram o desafio de participar e fazer ciência em um contexto tão difícil e delicado como na pandemia de COVID-19.

Aos amigos que aceitaram participar na coleta de dados.

À Dra Renata Tenório, autora da primeira versão desse projeto por toda a ajuda em concebê-lo, pela generosidade em passá-lo a mim e pela disponibilidade em ajudar nas avaliações remotas.

À Dra Ana Lucila Moreira pela disponibilidade em ajudar nas avaliações remotamente.

Ao Dr Diego André Eifer, por ter disponibilizado as salas e aparelhos de ecografia, indispensáveis ao desenvolvimento da pesquisa.

Ao grupo de pesquisa em genética de doenças neuromusculares da UFRGS (NEMUG).

Ao meu orientador Prof Jonas Alex Morales Saute por toda a ajuda desde o início, pela disponibilidade, pelos ensinamentos e amizade.

## RESUMO

**Introdução** A AME-5q é uma doença genética de herança autossômica recessiva causada por variantes patogênicas no gene *SMN1*. A presença de fasciculações parece ajudar na diferenciação da AME (especialmente em suas formas tardias) de seus diagnósticos diferenciais. Apesar disso, a frequência de fasciculações em pacientes com AME nunca foi estudada de maneira sistemática. **Objetivo:** Este estudo visou determinar a acurácia diagnóstica de fasciculações na língua para diagnóstico de AME tipos II e III em paciente com fraqueza muscular simétrica proximal sem herança autossômica dominante. **Métodos:** realizou-se um estudo transversal de acurácia diagnóstica em que 19 indivíduos (10 com AME e 9 com diagnóstico de outras doenças genéticas musculares) foram avaliados quanto a presença de fasciculações pelo exame clínico e pela ultrassonografia muscular, 11 indivíduos (5 com AME e 6 com outras doenças musculares) foram avaliados também com eletromiografia. O exame físico e ultrassom foram gravados e avaliados por avaliadores externos. **Resultados:** Dos 10 pacientes com AME, 5 eram do tipo II e 5 do tipo III; dos pacientes do grupo controle, 6 possuem diagnóstico de distrofia de cinturas, 1 com mutação do gene *COL6A1*, 1 com diagnóstico de miopatia nemalínica e 2 sem diagnóstico molecular definido (mas com biópsia compatível com distrofia muscular). O *intraclass correlation coefficient* (ICC) para o exame físico foi de 0,59 ( $p < 0,0001$ ), e para a ultrassonografia muscular de 0,8 ( $p < 0,0001$ ). A presença de fasciculações em mais de um grupo muscular foi percebida em todos os pacientes com AME e um paciente do grupo controle ( $p=0,001$  – teste exato de Fisher); o valor de sensibilidade foi de 100%(IC 95% 69-100), especificidade de 89% (IC 95% 52-100%), valor preditivo positivo de 91%(IC 95% 52-100%) e negativo de 100%(IC 95% 63-100) **Conclusão:** Concluímos que o método empregado, especialmente o uso de exame físico direcionado à busca de fasciculações seguido da ultrassonografia muscular, também direcionada, tem grande sensibilidade e especificidade para diagnóstico de formas tardias de AME em cenário de grupo controle não saudável. Houve moderada correlação para o achado de exame físico pelo método empregado (gravação de vídeo) e correlação boa a excelente para ultrassonografia. Trabalhos adicionais com amostras maiores são encorajados para redução do intervalo de confiança dos dados que obtivemos.

**Palavras-chave:** atrofia muscular espinhal, fasciculação, ultrassonografia, semiologia

## ABSTRACT

**Background:** SMA-5q is a genetic disease of autosomal recessive inheritance caused by pathogenic variants in the *SMN1* gene. The presence of fasciculations seems to help differentiate SMA (especially in its late forms) from its differential diagnoses. Despite this, the frequency of fasciculations in patients with SMA has never been studied in a systematic way. Objective: This study aimed to determine the diagnostic accuracy of tongue fasciculations for the diagnosis of SMA types II and III in a patient with proximal symmetric muscle weakness without autosomal dominant inheritance.

**Methods:** a cross-sectional diagnostic accuracy study was conducted in which 19 individuals (10 with SMA and 9 with a diagnosis of other genetic muscle diseases) were assessed for the presence of fasciculations by clinical examination and muscle ultrasound, individuals (5 with EBF and 6 with other muscle diseases) were also evaluated with electromyography. The physical examination and ultrasound were recorded and evaluated by external evaluators. **Results:** Of the 10 patients with SMA, 5 were type 2 and 5 were type 3; of the patients in the control group, 6 had a diagnosis of waist dystrophy, 1 with a COL6A1 gene mutation, 1 with a diagnosis of nemaline myopathy and 2 without a defined molecular diagnosis (but with a biopsy compatible with muscular dystrophy). The intraclass correlation coefficient (ICC) for physical examination was 0.59 ( $p < 0.0001$ ), and for muscle ultrasonography 0.8 ( $p < 0.0001$ ). The presence of fasciculations in more than one muscle group was noticed in all patients with SMA and one patient in the control group ( $p = 0.001$  - Fisher's exact test); the sensitivity value was 100% (95% CI 69-100), 89% specificity (95% CI 52-100%), a positive predictive value of 91% (95% CI 52-100%) and a negative predictive value of 100% (95% CI 63-100) **Conclusion:** We conclude that the method employed, especially the use of physical examination directed at the search for fasciculations followed by muscle ultrasound, also directed, has great sensitivity and specificity for the diagnosis of late forms of SMA in a scenario of unhealthy control group. There was a moderate correlation for the finding of physical examination by the method employed (video recording) and a good to excellent correlation for ultrasound. Additional work with larger samples is encouraged to reduce the confidence interval of the data we obtained.

**Keywords:** spinal muscular atrophy, fasciculation, ultrasound, semiology

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Fluxograma de revisão sistematizada.....	12
Figura 2 – Estrutura do gene SMN no cromossomo 5.....	17
Figura 3 – Genótipo de indivíduos não-afetados e afetados pela AME.....	18
Figura 4 – Algoritmo diagnóstico da AME.....	20
Figura 5 – Marco conceitual fluxo estabelecido para o presente estudo.....	24

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Critérios de classificação clínica para AME .....	13
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

*ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis*

AME: ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL

*CI: Confidence Interval*

CK: CREATINOFOSFOQUINASE

ELA: ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA

EMG: ELETROMIOGRAFIA/ELETRONEUROMIOGRAFIA

HCPA: HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

IC: INTERVALO DE CONFIANÇA

*ICC: Intraclass Correlation Coefficient*

*gMD: Genetic Muscle Disease*

LGMD: (*LIMB GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY*): DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS

*MUS: Muscular Ultrasound*

*NLR: Negative Likelihood Ratio*

*NPV: Negative Predictive Value*

PCDT: PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS

*PLR: Positive Likelihood Ratio*

*PPV: Positive Predictive Value*

*ROC curve: Receiver Operating Characteristic curves*

*SMA: Spinal Muscular Atrophy*

SUS: SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE

USM: ULTRASSONOGRAFIA MUSCULAR

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 estratégia para localizar e selecionar informações.....	12
2.2 atrofia muscular espinhal (ame).....	13
2.2.1 definição e quadro clínico da ame.....	13
2.2.2 Fisiopatologia da ame.....	14
2.2.3 Epidemiologia da ame.....	17
2.2.4 Diagnóstico da ame.....	17
2.2.5 Diagnósticos diferenciais.....	19
2.2.6 Tratamento e manejo.....	19
2.3 Fasciculações.....	19
2.3.1 Conceito.....	19
2.3.2 Métodos utilizados para reconhecimento de fasciculações.....	21
3. MARCO CONCEITUAL.....	27
4. JUSTIFICATIVA.....	28
5. OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GERAL.....	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
7. ARTIGO.....	35
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	60
9. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	61
10. APÊNDICES.....	62

## 1. INTRODUÇÃO

A atrofia muscular espinhal (AME) é uma doença monogênica de herança autossômica recessiva que se caracteriza pela morte de neurônios do corno anterior da medula espinhal. Tem prevalência de 1 a 2 por 100.000 habitantes e incidência geral de 8 em 100.000 nascidos vivos (Su et al., 2011; Verhaart et al., 2017; Roberts et al., 1970; D'Amico et al., 2011).

Clinicamente apresenta-se com graus variados de fraqueza muscular de predomínio proximal e de membros inferiores com redução do tônus muscular e hipo/arreflexia. O diagnóstico é realizado com base em achados clínicos sugestivos e confirmação por exame molecular. A deleção do éxon 7 nos dois alelos no gene *SMN1* confirma o diagnóstico. Se a deleção do éxon 7 for identificada em uma cópia do *SMN1*, o outro alelo deve ser sequenciado para buscar variantes patogênicas de pequena escala e detectar possíveis heterozigotos compostos (Mercuri et al., 2018).

Fasciculações são definidas como contrações musculares involuntárias e indolores com duração de alguns segundos (Denny-Brown & Pennybacker, 1938). Costumam apresentar-se após dano neuronal agudo e em doença neuromusculares degenerativas tais como esclerose lateral amiotrófica, ataxias espinocerebelares, atrofia muscular espinhal, parkinsonismo atípico e neuropatias hereditárias, ou ainda em indivíduos saudáveis.(Finsterer & Aliyev, 2015; Denny-Brown & Pennybacker, 1938; Finsterer & Aliyev, 2015; de Carvalho et al., 2017; Van der Heijden et al., 1994).

A pesquisa de fasciculações pode dar-se com exame físico direcionado, através de exame de eletroneuromiografia ou através de ultrassonografia muscular. Este último parece ser o método mais sensível na sua detecção, sem perda de especificidade. (Reimers et al., 1996).

O quadro clínico da AME, especialmente das formas de início tardio, pode ser semelhante à de outras doenças neuromusculares, como as distrofias musculares e outras formas de miopatias hereditárias. A presença de fasciculações parece ser uma manifestação clínica comum na AME e que pode ajudar na diferenciação de quadros primariamente musculares. Entretanto, as propriedades diagnósticas da detecção de fasciculações por diferentes métodos para o diagnóstico de AME não são conhecidas.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Estratégia para localizar e selecionar as informações

Foi realizada revisão sistematizada da literatura em busca de estudos a respeito da relação entre AME, fasciculações e ultrassonografia de língua. Para a busca dos estudos, foram consultadas as bases de dados Pubmed e Embase em maio de 2021, utilizando os seguintes descritores:

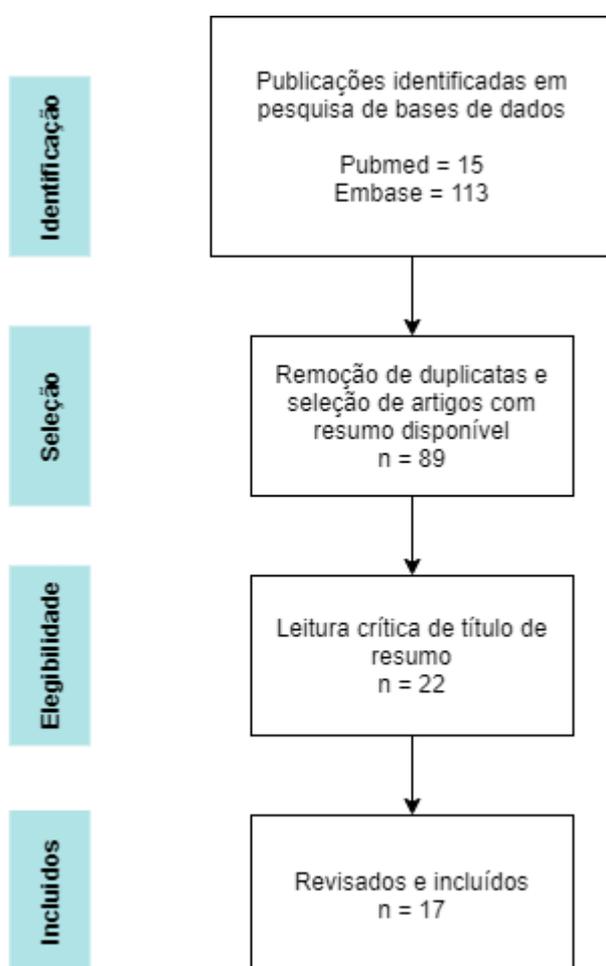
Pubmed: (Atrophy, Spinal Muscular OR Spinal Amyotrophy OR Amyotrophies, Spinal OR Amyotrophy, Spinal OR Spinal Amyotrophies OR Spinal Muscular Atrophy OR Myelopathic Muscular Atrophy OR Atrophy, Myelopathic Muscular OR Muscular Atrophy, Myelopathic OR Adult-Onset Spinal Muscular Atrophy OR Adult Onset Spinal Muscular Atrophy OR Muscular Atrophy, Adult Spinal OR Adult Spinal Muscular Atrophy) AND (Fasciculations OR Fasciculation, Muscular OR Fasciculations, Muscular OR Muscular Fasciculation OR Muscular Fasciculations OR Fasciculation, Tongue OR Fasciculations, Tongue OR Tongue Fasciculation OR Tongue Fasciculations OR Fasciculation, Skeletal Muscle OR Fasciculations, Skeletal Muscle OR Muscle Fasciculation, Skeletal OR Muscle Fasciculations, Skeletal OR Skeletal Muscle Fasciculation OR Skeletal Muscle Fasciculations) AND (Diagnostic Ultrasound OR Diagnostic Ultrasounds OR Ultrasound, Diagnostic OR Ultrasounds, Diagnostic OR Ultrasound Imaging OR Imaging, Ultrasound OR Imagings, Ultrasound OR Ultrasonic Imaging OR Imaging, Ultrasonic OR Sonography, Medical OR Medical Sonography OR Ultrasonographic Imaging OR Imaging, Ultrasonographic OR Imagings, Ultrasonographic OR Ultrasonographic Imagings OR Echography OR Diagnosis, Ultrasonic OR Diagnoses, Ultrasonic OR Ultrasonic Diagnoses OR Ultrasonic Diagnosis)

Embase: ('spinal muscular atrophy'/exp OR 'chronic spinal muscular atrophy' OR 'muscle atrophy, spinal' OR 'muscular atrophy, spinal' OR 'spinal muscle atrophy' OR 'spinal muscular atrophy' OR 'spine muscle atrophy') AND ('fasciculation'/exp OR 'fasciculation' OR 'muscle fasciculation') AND ('echography'/exp OR 'diagnostic ultrasonic examination' OR 'diagnostic ultrasonic imaging' OR 'diagnostic ultrasonic method' OR 'diagnostic ultrasound' OR 'duplex echography' OR 'echogram' OR 'echographic evaluation' OR 'echography' OR 'echoscopy' OR 'echosound' OR 'high

resolution echography' OR 'scanning, ultrasonic' OR 'sonogram' OR 'sonographic examination' OR 'sonographic screening' OR 'sonography' OR 'ultrasonic detection' OR 'ultrasonic diagnosis' OR 'ultrasonic echo' OR 'ultrasonic examination' OR 'ultrasonic scanning' OR 'ultrasonic scintillation' OR 'ultrasonogram' OR 'ultrasonographic examination' OR 'ultrasonographic screening' OR 'ultrasonography' OR 'ultrasound diagnosis' OR 'ultrasound scanning')

Foram encontrados ao total 128 artigos. A seleção segue os passos descritos na **Figura 1**.

**Figura 1. Fluxograma de revisão sistematizada**



Entretanto, antes de detalharmos os aspectos relacionados à questão de pesquisa encontrados na busca sistematizada à literatura, realizaremos uma breve revisão sobre as Atrofia Muscular Espinhal utilizando múltiplas referências originais e

de revisões narrativas sobre o tema obtidas tanto através da revisão sistematizada da literatura apresentada acima, quanto por buscas manuais sobre o tema.

## 2.2. Atrofia muscular espinhal (AME)

### 2.2.1 Definição e quadro clínico da Atrofia Muscular Espinhal (AME)

O termo atrofia muscular espinhal refere-se a um grupo heterogêneo de doenças monogênicas que acometem o corno anterior da medula espinhal. Há diversidade quanto aos genes envolvidos, padrão de fraqueza, padrão de herança, gravidade e características associadas. Noventa e cinco por cento de todas as atrofias musculares espinhais são causadas pela perda do *survival motor neuron (SMN1)* no cromossomo 5q13.2. Esta forma é chamada de atrofia muscular espinhal proximal, AME-5q, AME relacionada ao gene *SMN1*, ou simplesmente AME (Arnold *et al.*, 2015). Este projeto será relacionado apenas à AME-5q, a qual nos referimos apenas como AME a partir de agora.

O espectro fenotípico da AME compreende formas graves com hipotonia e artrogripose ao nascimento, até adultos capazes de caminhar sem apoio (Wirth, 2000; D'Amico *et al.*, 2011; Arnold *et al.*, 2015). Classicamente, a doença é dividida em 4 tipos (AME tipo I a IV) conforme a idade de início dos sintomas e maior marco motor adquirido (**Tabela 1**) (D'Amico *et al.*, 2011; Zerres *et al.*, 1995; International SMA Consortium Meeting, 1992).

**Tabela 1.** Critérios de classificação clínica para AME (adaptado de D'Amico *et al.*, 2011)

	<b>Idade de Início</b>	<b>Maior marco Motor adquirido</b>
<b>Tipo I (Doença de Werdnig-Hoffman)</b>	0-6 meses	Não chega a sentar
<b>Tipo II (Intermediário)</b>	7-12 meses	Senta, não fica em pé
<b>Tipo III (leve, doença de Kugelberg-Welander) em adultos</b>	>18 meses	Fica em pé e caminha durante a vida adulta
<b>Tipo IV (adulto)</b>	2 <sup>a</sup> -3 <sup>a</sup> década de vida	Marcha sem assistência

A AME tipo I (doença de Werdnig-Hoffmann) é a forma mais grave e de maior incidência. Por definição, pacientes com AME tipo I tornam-se sintomáticos antes dos 6 meses de idade e nunca adquirem o marco motor de sentar sem apoio. Essas crianças apresentam hipotonia grave, redução ou ausência de reflexos miotáticos profundos, atraso de desenvolvimento motor, fraqueza muscular simétrica proximal e progressiva, tórax em forma de sino com padrão de respiração abdominal (devido à fraqueza de músculos intercostais com relativa preservação do diafragma). Na AME tipo I a atrofia muscular não é tão marcada no início do quadro. Previamente a disponibilidade dos medicamentos modificadores de doença e sem a adoção de medidas avançadas de suporte de vida, a morte desses pacientes ocorria em geral antes dos 2 anos de vida, sendo a mediana de óbito de 8 meses (International SMA Consortium Meeting, 1992; D'Amico *et al.*, 2011; Kolb *et al.*, 2017; Mercuri *et al.*, 2018).

A AME tipo II (forma intermediária) apresenta-se clinicamente em crianças de 7 a 18 meses de vida. Em geral, os pacientes adquirem a capacidade de sentar sem apoio e, em alguns casos, de conseguir ficar em pé, mas não adquirem deambulação independente. Similarmente ao tipo I, o tipo II apresenta fasciculações, hipo/arreflexia e fraqueza proximal. Um achado clínico diferencial, que pode auxiliar no diagnóstico é a presença de tremor de intenção (Amato & Russel, 2008). A AME tipo II apresenta grande variabilidade fenotípica, incluindo desde pacientes com importante fraqueza que poderá resultar em falência respiratória até pacientes com independência funcional e preservação parcial da força muscular (D'Amico *et al.*, 2011). Cifoesciose e contraturas articulares são achados comuns neste tipo.

A AME tipo III (AME juvenil ou doença de Kugelberg-Welander) é caracterizada por heterogeneidade fenotípica. Os pacientes adquirem a capacidade de deambular de maneira independente e manifestam fraqueza muscular proximal, com cintura pélvica mais proeminentemente afetada do que cintura escapular. Quando o início é antes dos 3 anos de idade, é classificada como AME tipo IIIa; quando depois dos 3 anos de idade, é chamada AME tipo IIIb. A idade de início varia dos 18 meses aos 18 anos de idade e a expectativa de vida parece ser normal. Alguns podem vir a ficar dependentes de cadeira de rodas na infância enquanto outros podem manter-se com marcha independente até a idade adulta. De maneira geral, uma idade de início mais tardia está relacionada a um período mais longo de marcha independente. A progressão da doença é lenta, com períodos de estagnação. Atrofia muscular, poliminimioclonia, escoliose, contraturas musculares e osteoporose são

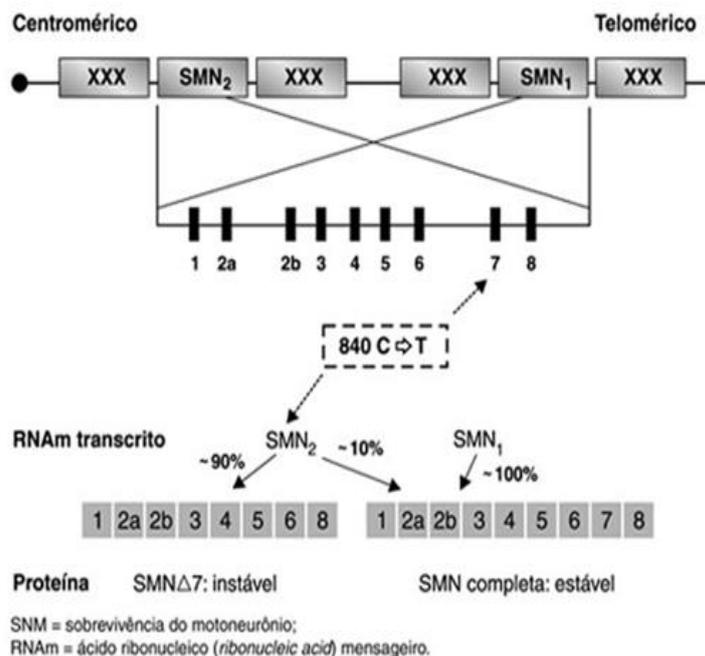
manifestações comuns, principalmente após dependência de cadeira de rodas (International SMA Consortium Meeting 1992; Zerres *et al.*, 1995; D'Amico *et al.*, 2011). Além do acometimento muscular característico, hipertrofia de panturrilhas e CK elevada foram reportadas em até um quarto dos pacientes com AME tipo III, a qual também podem ser chamada de forma pseudomiopática (Alsaman & Alshaikh, 2013; Bouwsma & Van Wijngaarden, 1980).

A AME tipo IV caracteriza-se por fraqueza proximal de início acima de 18 anos. Os pacientes mantêm a deambulação na vida adulta e não apresentam acometimento respiratório (D'Amico *et al.*, 2011).

### 2.2.2 Fisiopatologia da AME

A AME é uma doença de natureza genética, com herança autossômica recessiva. É causada por variantes patogênicas bi-alélicas no gene *SMN*, localizado no cromossomo 5q11.2-q13.3. O *locus* do *SMN* é constituído por dois genes parálogos, sendo um deles telomérico (*SMN1*) e o outro centromérico (*SMN2*). Os genes *SMN1* e *SMN2* diferem em apenas 11 nucleotídeos. No *SMN2* há uma substituição c.840C>T, a mais relevante para o entendimento da AME (Finkel *et al.*, 2017), que ocorre em um *exonic splicing enhancer* que regula a inclusão do éxon 7 deste gene, fazendo com que apenas 10-25% das transcrições *SMN2* contenham o éxon 7, responsável por gerar uma proteína SMN funcional completa; os outros 75-90% darão origem a uma proteína truncada e instável (*SMN $\Delta$ 7*) (**Figura 2**), que será rapidamente degradada. O principal tipo de mutação que causa a AME é a deleção do *SMN1*, que pode ser causada pela deleção de todo o gene ou, então, devido a uma conversão gênica que transforma o *SMN1* em *SMN2* (Vitte *et al.*, 2007; Baioni & Ambiel, 2010).

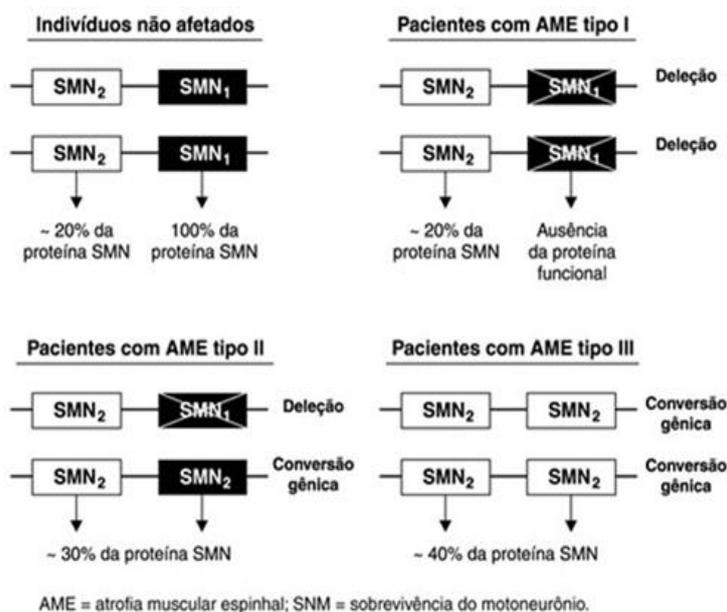
### **Figura 2. Estrutura do gene SMN no cromossomo 5**



Baioni & Ambiel, 2010

Outro ponto importante a ser destacado é o fato de que a quantidade de cópias intactas de *SMN2* é o principal modificador da gravidade da doença. Na **Figura 3**, está esquematizado o genótipo de indivíduos não-afetados e afetados pela AME, caracterizando os pacientes com os tipos I, II e III de AME. Está também representada a quantidade de proteína *SMN* sintetizada, de acordo com cada genótipo. Em consequência do aumento no número de cópias de *SMN2*, é produzida uma quantidade maior da proteína *SMN* funcional, o que leva a manifestações clínicas mais leves da doença. Também se pode observar, na mesma figura, o fato de que eventos de conversão gênica parecem ser os responsáveis pelos fenótipos mais leves da doença, enquanto os de deleção do gene *SMN1* dariam origem às formas mais graves da AME.

**Figura 3. Genótipo de indivíduos não-afetados e afetados pela AME**



Baioni & Ambiel, 2010

Na maioria dos casos de AME ocorre uma deleção do éxon 7 (podendo ou não incluir o éxon 8) do gene *SMN1*. Estudos realizados em diferentes grupos étnicos mostraram que cerca de 90-95% dos indivíduos, na maioria crianças com diagnóstico clínico dos tipos I, II e III de AME, apresentam deleção do éxon 7 em ambas as cópias do *SMN1*, isto é, eles são homocigotos para esta deleção. Além disso, estima-se que cerca de 2-5% dos indivíduos que preenchem os critérios clínicos de AME apresentam a deleção do éxon 7 do *SMN1* em um único alelo com mutação de ponto no alelo presente, caracterizando heterocigose composta (Araújo *et al.*, 2005). Em trabalho recente de amostra brasileira, essa prevalência foi de 10,7% (DE HOLANDA MENDONÇA *et al.*, 2020). Com base nesses dados, é imprescindível a pesquisa de mutações de ponto nestes casos para confirmação diagnóstica. Conforme já mencionado, o fenótipo (dos tipos I, II, III e IV) está principalmente relacionado ao número de cópias presentes no *SMN2* (**Tabela 2**), em que os pacientes com formas mais brandas apresentam um número maior de cópias deste gene (Finkel *et al.*, 2017; Mercuri *et al.*, 2012).

### 2.2.3 Epidemiologia da AME

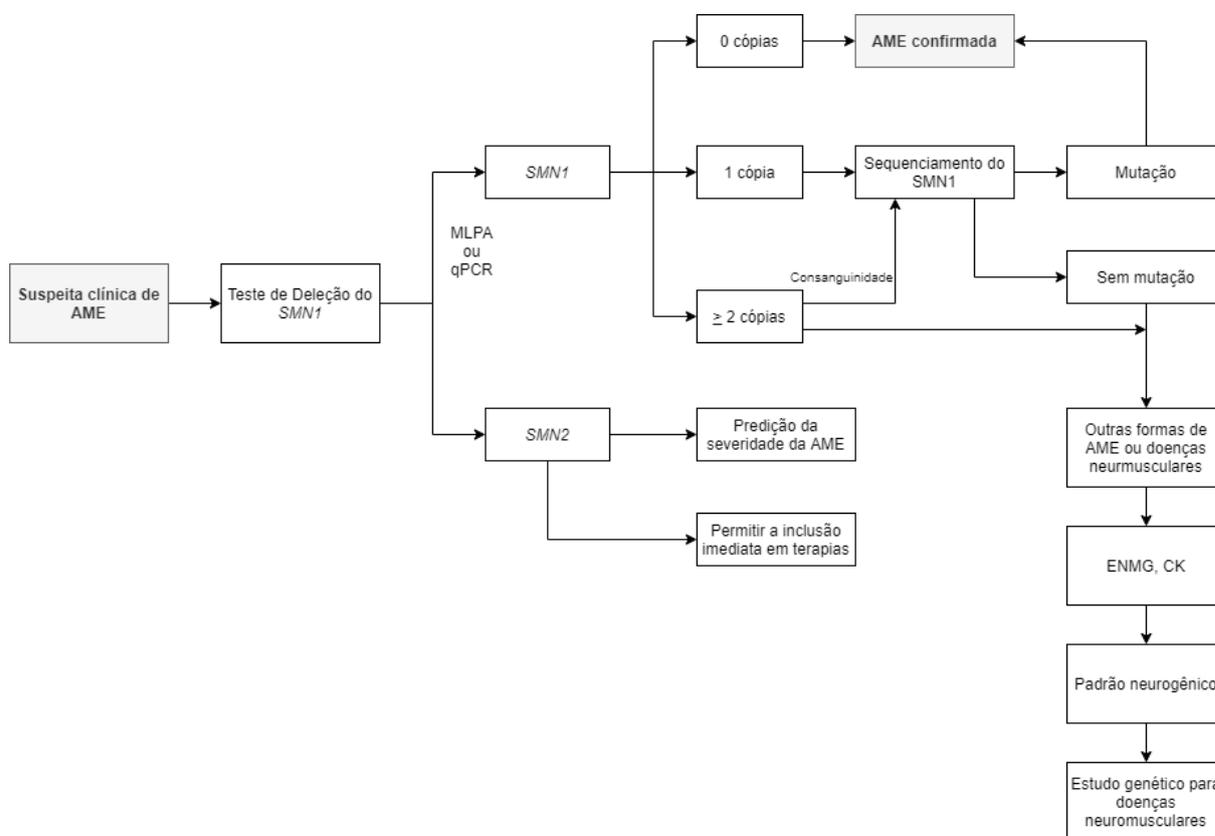
A prevalência geral da AME é de 1 a 2 por 100.000 habitantes e a incidência de 8 em 100.000 nascidos vivos. A AME tipo I é a mais comum e representa 60% dos casos, com uma incidência de 5,5:100.000. No entanto, devido à baixa expectativa de vida, a prevalência é menor, sendo em torno de 0,04-0,28:100.000. A AME tipo II e a AME tipo III têm incidências menores, de 1,9 e 1,7 por 100.000 habitantes, respectivamente, e correspondem aos 40% restantes dos indivíduos afetados. As prevalências da AME tipo II e tipo III são estimadas em 1,5:100.000. A AME tipo III parece ter uma prevalência maior quando comparada a AME tipo II, provavelmente por causa da expectativa de vida maior. (Su *et al.*, 2011; Verhaart *et al.*, 2017). A AME tipo IV não aparece com frequência em estudos epidemiológicos (provavelmente acaba sendo incluída nos casos de AME tipo III), em série de casos brasileira, sua prevalência final foi de 2% dos casos (DE HOLANDA MENDONÇA *et al.*, 2020). A frequência de portadores é maior na população europeia e asiática (1:50) e menor em negros (1:100) e hispânicos (1:76) (Su *et al.*, 2011; Verhaart *et al.*, 2017). Na população brasileira, a frequência estimada de portadores de deleção do *SMN1* é 2,7%. (BUENO *et al.*, 2011)

#### 2.2.4 Diagnóstico da AME

A AME tipo I é uma condição bem descrita e conhecida em que a suspeita clínica deve ser realizada de imediato. Ela é a principal hipótese no diagnóstico diferencial de um lactente hipotônico com arreflexia (Moosa & Dubowitz, 1973). Por outro lado, o diagnóstico de formas menos graves de AME não é sempre óbvio. O padrão de fraqueza muscular é semelhante ao encontrado nas distrofinopatias, nas distrofias de cinturas, nas miopatias congênitas e na doença de Pompe (Amato & Russel, 2008; Graham *et al.*, 2018). Quando Kugelberg e Welander descreveram a AME tipo III, os 12 pacientes mencionados foram inicialmente diagnosticados com distrofia muscular de cinturas (Kugelberg & Welander, 1956). O diagnóstico de AME foi presumido pelos achados da eletromiografia e biópsia muscular, já que naquela época as bases moleculares da doença não eram conhecidas.

O diagnóstico de AME é baseado em achados clínicos sugestivos e confirmado pelo teste molecular. O teste genético deve ser feito se há suspeita clínica de AME. Biópsia muscular e eletromiografia não são necessários a não ser que o fenótipo não seja claro. Um algoritmo diagnóstico é mostrado na **Figura 4**.

**Figura 4. Algoritmo diagnóstico da AME**



Adaptado de Mercuri *et al* (2018).

AME: atrofia muscular espinhal; *SMN1*: survival motor neuron 1; *SMN2*: survival motor neuron 2; ENMG: eletromiografia; CK: níveis de creatina quinase.

É importante notar que o algoritmo trazido por Mercuri *et al* (2018) não diferencia formas infantis das tardias. Estas, pelo quadro de fraqueza proximal simétrica, acabam por assemelhar-se com formas de miopatias hereditárias e a suspeita diagnóstica da AME acaba sendo tardia.

Deleção bialélica do exon 7 do *SMN1* confirma o diagnóstico de AME. Se a deleção do exon 7 for identificada em uma cópia do *SMN1*, o outro alelo deve ser sequenciado para buscar variantes patogênicas de pequena escala e detectar heterozigotos compostos. Se há duas cópias do *SMN1*, o diagnóstico de AME se torna muito improvável, e o sequenciamento do gene deve ser feito apenas em caso de consanguinidade parental aliada a alta suspeita clínica. Apesar de teoricamente possível, não há relatos inequívocos de AME sem deleção do éxon 7 no gene *SMN1* (Mercuri *et al.*, 2018).

Com relação às técnicas utilizadas, são feitos ensaios semi-quantitativos que buscam a ausência do éxon 7 do gene *SMN1* em homozigose. Tais testes apresentam sensibilidade entre 95 a 98% e especificidade de 100% (D'Amico *et al.*, 2011). Deleções em homozigose dos éxons 7 e 8 de *SMN1* podem ser detectadas por métodos como PCR-SSCP (*polymerase chain reaction – single – strand conformation polymorfism*) e PCR-RFLP (*polymerase chain reaction – restriction fragmente length polymorfism*). A análise por PCR-SSCP por detectar também polimorfismos neutros foi praticamente substituída pelo PCR-RFLP. Contudo, a análise semi-quantitativa não permite a detecção de heterozigotos, ou seja, não permite detectar portadores, nem indivíduos doentes heterozigotos compostos (com a deleção comum em um dos alelos e a mutação de ponto no outro).

Os métodos mais sensíveis para o diagnóstico dos pacientes com AME e que são capazes de identificar portadores são os métodos quantitativos tais como PCR quantitativo em tempo real e análise por amplificação multiplex de sondas dependentes de ligação (MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). (Sugarman *et al.*, 2012).

As variantes patogênicas de pequena escala podem ser identificadas por sequenciamento de Sanger ou de nova geração, tendo sido descritas 111 mutações de ponto, inserções e deleções no *SMN1* até 2017 (Stenson *et al.*, 2017). Entretanto, em até 1/3 dos casos com clínica sugestiva e deleção do éxon 7 do *SMN1* em 1 dos alelos a segunda variante não é encontrada, sugerindo a possibilidade de variantes patogênicas em regiões intrônicas usualmente não avaliadas (D'Amico *et al.*, 2011).

A quantificação do número de cópias do gene homólogo *SMN2* não é necessária para o diagnóstico de AME, mas é altamente recomendável pela correlação genótipo-fenótipo, predição da evolução da doença e participação em ensaios clínicos recentes (Parsons *et al.*, 1998; Wirth, 2000; Prior *et al.*, 2016; Mercuri *et al.*, 2018; Calucho *et al.*, 2018).

#### 2.2.5 Diagnósticos diferenciais

Em neonatos e lactentes, o quadro clínico mais comum e que leva à suspeição de AME é a hipotonia com arreflexia sem alteração cognitiva (Bodensteiner, 2008; Graham *et al.*, 2018). O diagnóstico diferencial de AME no lactente hipotônico será feito com outras condições como miopatias congênicas e metabólicas, miastenia

congênita, distrofia congênita, distrofia miotônica congênita e síndrome de Prader-Willi (Amato & Russel, 2008).

Quando a fraqueza muscular proximal e simétrica inicia-se após os 6 meses de vida, as AMEs tipos II, III e IV entram no diagnóstico diferencial com quadros de distrofinopatias, distrofias musculares de cinturas, outras miopatias hereditárias, mitocondriopatias e doenças lisossômicas (Amato & Russel, 2008). As distrofias musculares de cinturas são as doenças que mais facilmente mimetizam AME nas formas tardias.

#### 2.2.6 Tratamento e manejo

Em razão de seu curso progressivo, a AME necessita de vários cuidados especiais, abrangendo terapias de suporte por equipes multidisciplinares, envolvendo cuidados nutricionais, ortopédicos, respiratórios e fisioterapêuticos. O estabelecimento de um correto diagnóstico será fundamental no plano terapêutico bem como para a realização do adequado aconselhamento genético. Atualmente, não há cura para AME, entretanto nos últimos anos está sendo vivenciada uma revolução no tratamento desta doença, com modificações drásticas na história natural desta grave condição.

Em 2016, houve a aprovação do primeiro medicamento modificador do curso da AME, a Nusinersena. Trata-se de um oligonucleotídeo antisense que promove a inclusão do éxon 7 no gene *SMN2*, alterando o “*splicing*” de seu pré-mRNA; desta forma, há aumento na síntese a proteína SMN funcional (Finkel et al., 2017). Mais recentemente, o Risdiplam, de mecanismo semelhante, mas de administração oral, também foi aprovado. (DECONINCK *et al.*, 2021). Há benefícios inclusive em crianças pré-sintomáticas com genótipo molecular preditor do fenótipo de AME tipo I (ou seja, 0 cópias de *SMN1* e 2 cópias de *SMN2*) que adquirem marco motor de deambulação (compatível com fenótipo clínico de AME tipo III) (VIVO *et al.*, 2019). Além destas, existe também a possibilidade da terapia gênica em casos selecionados (MENDELL *et al.*, 2017). Os tratamentos citados já estão aprovados pela ANVISA, a Nusinersena está incluída no Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas (PCDT) da AME, ou seja, está disponível pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Os resultados em conjunto demonstram a mudança de paradigma sofrida pelo tratamento da AME nos últimos

anos e reforçam a necessidade de diagnóstico precoce pela resposta tempo-dependente do tratamento.

## 2.3 Fasciculações

### 2.3.1 Conceito

O termo “fasciculação” foi introduzido por Denny-Brown e Pennybacker em 1938 (Denny-Brown & Pennybacker, 1938) e caracteriza contrações indolores de um grupo de fibras musculares de maneira independente, de curta duração, de forma aleatória e involuntária. Nesse contexto, como as fibras musculares esqueléticas são estruturas independentes, caso não haja conexão sincicial, podem também contrair-se de maneira independente. Do ponto de vista clínico, podem ser avaliadas através do exame físico neurológico, da eletroneuromiografia e da ultrassonografia (Finsterer & Aliyev, 2015).

As fasciculações são muito comuns após dano agudo a um nervo periférico e a um território de uma raiz nervosa (Finsterer & Aliyev, 2015). Em relação às afecções neurodegenerativas, são características de esclerose lateral amiotrófica, mas também são vistas em várias outras doenças (Denny-Brown & Pennybacker, 1938; Finsterer & Aliyev, 2015; de Carvalho *et al.*, 2017). Entre elas, estão as doenças neurológicas hereditárias, como a doença de Charcot-Marie-Tooth, as ataxias espinocerebelares, a polineuropatia amiloidótica familiar e a atrofia muscular espinhal (Finsterer & Aliyev, 2015).

Em relação à fisiopatologia, as fasciculações são manifestação de hiperexcitabilidade dos neurônios motores: assume-se que são geradas por descargas espontâneas ou induzidas de unidades motoras hiperexcitáveis (Finsterer & Aliyev, 2015). A excitabilidade aumentada pode ser resultado de anormalidades na cinética de canais iônicos, como aumento da condutância ao sódio, disfunção dos canais de potássio e despolarização focal da membrana celular. Essas anormalidades já foram descritas na esclerose lateral amiotrófica, na atrofia muscular espinhal, na neuropatia axonal, na neuropatia motora multifocal e em outros distúrbios envolvendo o neurônio motor inferior (Kuwabara & Misawa, 2004).

O sítio de origem das fasciculações pode se encontrar em qualquer lugar do neurônio motor inferior: corpo celular, axônio proximal ou distal e junção neuromuscular; além disso, pode haver modulação adicional por estruturas corticais e espinhais. Nesse contexto, é difícil estabelecer a verdadeira origem da

hiperexcitabilidade (Grapperon & Attarian, 2017). Na esclerose lateral amiotrófica, doença na qual a fisiopatologia das fasciculações foi mais estudada, existem evidências de origem tanto no neurônio motor inferior como no córtex cerebral. Fasciculações instáveis e complexas surgem em unidades motoras sobreviventes, anormais e reinervadas, mais provavelmente em um sítio gerador no axônio distal (de Carvalho *et al.*, 2017).

Fasciculações generalizadas são um sinal clínico importante e altamente sugestivo de doenças do neurônio motor inferior, de qualquer uma de suas porções, incluindo desde as células do corno anterior até os axônios terminais (Reimers *et al.*, 1996; Sleutjes *et al.*, 2015). Ao exame físico neurológico em adultos, costumam ser um sinal de alerta para a esclerose lateral amiotrófica, podendo ocorrer nos estágios iniciais da doença (Leite *et al.*, 2015). No entanto, a presença de fasciculações não deve ser considerada relevante na ausência de outros achados semiológicos de patologia do corno anterior ou do trato piramidal (Mills, 2010). Outras patologias do neurônio motor são as atrofia muscular espinhais, a amiotrofia monomérica benigna e a paralisia secundária a poliomielite.

Fasciculações de língua especificamente são mais observadas em doenças do corno anterior, ocorrendo em aproximadamente um terço dos casos de atrofia muscular espinhal (Grizelj & Vuković, 2013). O achado de fasciculação isoladamente em língua deve ser considerado um alerta para a atrofia muscular espinhal tipo I em neonatos, que comumente apresentam excesso de tecido subcutâneo, dificultando a visualização de fasciculações em membros (Amato & Russel, 2008).

Algumas doenças neurológicas em que o envolvimento do neurônio motor inferior não faz parte das manifestações principais também podem apresentar-se com fasciculações. Na doença de Machado-Joseph, fasciculações foram observadas ao exame físico em 50% dos pacientes por França *et al.* A ataxia espinocerebelar 36, algumas formas de parkinsonismo, incluindo a atrofia de múltiplos sistemas, e as escleroses laterais *plus*, e polineuropatias como a doença de Charcot-Marie-Tooth, a doença inflamatória desmielinizante crônica e a neuropatia motora multifocal com bloqueio de condução também já foram descritas com fasciculações (Kobayashi *et al.*, 2011; Shy & Drager, 1960; Machida *et al.*, 1999; de Carvalho *et al.*, 2017). Alguns autores sugerem que a prevalência de fasciculações em pacientes com neuropatias periféricas seja maior que a reportada na literatura (Finsterer & Aliyev, 2015).

### 2.3.2 Métodos utilizados para reconhecimento das fasciculações

Como já mencionado anteriormente, do ponto de vista clínico, as fasciculações podem ser avaliadas através do exame físico neurológico, da eletroneuromiografia e da ultrassonografia (Finsterer & Aliyev, 2015).

À inspeção, fasciculações são vistas como contrações de curta duração que se sucedem com rapidez tolerável e ocorrem em vários pontos da superfície muscular, por vezes chamadas de movimentos ondulatórios que simulam a movimentação de minhocas no solo. Elas podem ser vistas em porções superficiais do músculo em repouso (Denny-Brown & Pennybacker, 1938; de Carvalho *et al.*, 2017).

Na ultrassonografia muscular, as fasciculações são percebidas como contrações com duração de 0,2 a 0,5 segundos. A sensibilidade na detecção de fasciculações parece ser maior do que a sensibilidade da inspeção (ao exame clínico) e da EMG. Isso se deve provavelmente pela capacidade da ultrassonografia em avaliar áreas maiores e camadas mais profundas (Johansson *et al.*, 2017).

Reimers *et al.* avaliaram 34 pacientes com esclerose lateral amiotrófica com sintomas de neurônio motor inferior. Fasciculações foram observadas ao exame clínico em 94% dos casos e em 79% dos casos em que se utilizou a EMG. Já a ultrassonografia detectou fasciculações em todos os pacientes. Considerando apenas os músculos examinados clinicamente e por ultrassonografia, fasciculações foram vistas em 36% dos casos ao exame clínico e em 61% dos casos com ultrassom. A língua não foi avaliada em nenhum paciente (Reimers *et al.*, 1996).

Misawa *et al.* compararam EMG e ultrassonografia muscular para detectar fasciculações em 81 pacientes com ELA. A EMG realizada na língua não detectou fasciculações em nenhum paciente devido às contrações contínuas voluntárias ou pela atividade associada aos movimentos respiratórios. Por outro lado, a ultrassonografia de língua demonstrou fasciculações em 60% dos pacientes. A ultrassonografia muscular foi considerada uma ferramenta prática e eficiente na detecção de fasciculações, especialmente na língua (Misawa *et al.*, 2011).

Em revisão sistemática recente, Duarte *et al.* (2020) avaliaram a acurácia da detecção de fasciculações comparando a eletromiografia e a ultrassonografia muscular. Os resultados foram favoráveis ao uso da ultrassonografia para detecção de fasciculações (80% dos casos, sempre com sensibilidade acima de 70% e especificidade em torno de 90%) em comparação com a eletromiografia (45%) em

paciente com diagnóstico de esclerose lateral amiotrófica, não havendo estudos em atrofia muscular espinhal.

### 3 MARCO CONCEITUAL

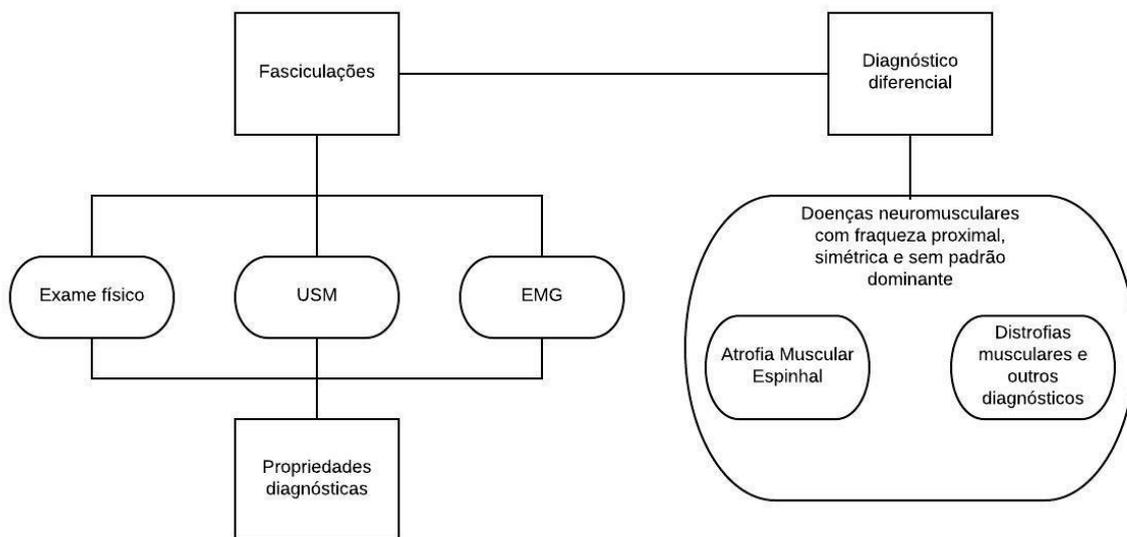
Fasciculações podem ser vistas nas doenças de neurônio motor inferior, seja quando há acometimento do corpo celular ou do axônio, mas são muito mais comuns em doenças do corno anterior da medula espinhal, que é o caso da AME. Nos pacientes com AME, fasciculações de língua ocorrem por envolvimento de neurônios motores bulbares (Amato & Russel, 2008). A prevalência de fasciculações em língua e em outros grupos musculares de indivíduos com AME ainda não está bem definida.

O Consórcio Internacional de AME reconheceu em 1991 a presença de fasciculações como importante manifestação da AME, e as incluiu nos critérios diagnósticos. Em AME tipo I, fasciculações de língua não foram consideradas características marcantes. Apesar disso, na prática clínica, este achado parece ser relevante. Giannopoulou descreveu um caso em que a presença de fasciculações na língua levou ao diagnóstico de AME tipo I, em uma criança com heterozigose composta (Giannopoulou *et al.*, 2017).

A frequência de fasciculações na língua em AME tipo II foi estimada em 70%; e estimaram que 50% dos indivíduos com AME tipo III teriam fasciculações em membros (International SMA Consortium, 1991).

Moosa e Dubowitz descreveram 13 pacientes com AME tipo III; em 3 deles observou-se fasciculações na língua (Moosa & Dubowitz, 1973). Alsaman e Alshaikh descreveram oito pacientes com AMEs tipo III e IV; e apenas dois tinham fasciculações na língua observadas ao exame clínico (Alsaman & Alshaikh, 2013).

De acordo com a experiência na prática clínica no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, fasciculações de língua são frequentemente encontradas em pacientes com AMEs tipo II, III e IV, mas ainda não existem dados objetivos acerca disso na literatura.

**Figura 5 – Marco conceitual fluxo estabelecido para o presente estudo**

#### 4 JUSTIFICATIVA

A atrofia muscular espinhal é uma das doenças mais frequentes dentro do grupo de doenças monogênicas e as perspectivas terapêuticas aumentam a relevância do diagnóstico precoce. O primeiro passo para o diagnóstico de AME é a suspeita clínica da doença, e está se dá pela história clínica e exame físico. Sem esta suspeita, o teste molecular, mesmo que esteja disponível, não é solicitado e o diagnóstico não é realizado. Ou seja, apesar de o teste molecular ser indispensável para a confirmação diagnóstica, a anamnese e o exame clínico se mantêm como as principais ferramentas que conduzem ao diagnóstico.

As formas tardias de AME podem apresentar diagnóstico difícil, com padrão previamente chamado de pseudo-miopático, inclusive com elevação de CK, possibilidade de pseudohipertrofia de panturrilhas.

O acréscimo de uma pesquisa intensiva de fasciculações com modalidades mais sensíveis (como a ultrassonografia muscular) é simples, não invasiva e de baixo custo.

A definição das propriedades diagnósticas da detecção de fasciculação para o diagnóstico de AME poderá modificar as diretrizes atuais de investigação desses pacientes, otimizar a investigação diagnóstica de maneira não invasiva e de baixo custo, reduzir a odisseia diagnóstica dos pacientes, o tempo até o diagnóstico final e propiciar tratamento e cuidados específicos mais precoces.

O Hospital de Clínica de Porto Alegre (HCPA) é Centro de Referência Estadual no Tratamento de AME tipo I e que o ambulatório de genética das doenças neuromusculares do Serviço de Genética Médica do HCPA atualmente acompanha 59 pacientes com diagnóstico de AME.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

O objetivo do presente estudo é avaliar a acurácia da presença de fasciculações para o diagnóstico de AME tipos II e III em pacientes com fraqueza muscular

### 5.2 Objetivos específicos

- 5.2.1 Avaliar sensibilidade, especificidade e acurácia da presença de fasciculações para o diagnóstico de AME tipos II e III;
- 5.2.2 Verificar a frequência de fasciculações em pacientes com AME e com outras doenças neuromusculares;
- 5.2.3 Determinar a confiabilidade interexaminador para a detecção de fasciculações pelo exame clínico;
- 5.2.4 Determinar a confiabilidade interexaminador para a detecção de fasciculações de língua pela ultrassonografia muscular

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALSAMAN, Abdulaziz S. *et al.* Type III Spinal Muscular Atrophy Mimicking Muscular Dystrophies. **Pediatric Neurology**, [S.L.], v. 48, n. 5, p. 363-366, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.12.027>

AMATO AA , RUSSELL JA. **Neuromuscular Disorders**. 1st edition. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2008.

ARAÚJO, Alexandra Pruber de Q-C. *et al.* Dificuldades diagnósticas na atrofia muscular espinhal. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S.L.], v. 63, n. 1, p. 145-149, mar. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-282x2005000100026>.

ARNOLD WD, KASSAR D, KISSEL JT. Spinal muscular atrophy: diagnosis and management in a new therapeutic era. **Muscle Nerve**. 2015 Feb;51(2):157-67.

BAIONI MT, AMBIEL CR. Spinal muscular atrophy: diagnosis, treatment and future prospects. **Jornal de Pediatria** (Rio J). 2010 Jul-Aug;86(4):261-70.

BODENSTEINER JB. The evaluation of the hypotonic infant. **Seminars in Pediatric Neurology**. 2008 Mar;15(1):10-20.

BOUWSMA G, VAN WIJNGAARDEN GK. Spinal muscular atrophy and hypertrophy of the calves. **Journal of the Neurological Sciences**. 1980 Jan;44(2-3):275-9.

BUENO, K.C. *et al.* Detection of Spinal Muscular Atrophy Carriers in a Sample of the Brazilian Population. **Neuroepidemiology**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 105-108, 2011. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000324156>.

CALUCHO, Maite *et al.* Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: an analysis of 625 unrelated spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. **Neuromuscular Disorders**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 208-215, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2018.01.003>..

DE CARVALHO M, KIERNAN MC, SWASH M. Fasciculation in amyotrophic lateral sclerosis: origin and pathophysiological relevance. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**. 2017 Sep;88(9):773-779.

D'AMICO A, *et al.* Spinal muscular atrophy. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. 2011 Nov 2;6:71.

DENNY-BROWN D, PENNYBACKER JB. Fibrillation and fasciculation in voluntary muscle. *Brain*, Volume 61, Issue 3, 1 September 1938, Pages 311–312.

DE VIVO D.C, *et al.* Interim Efficacy and Safety Results from the Phase 2 NURTURE Study Evaluating Nusinersen in Presymptomatic Infants with Spinal Muscular Atrophy (S46.003). **Neurology** Apr 2017, 88 (16 Supplement) S46.003.

DUARTE M.L. *et al.* Ultrasound versus electromyography for the detection of fasciculation in amyotrophic lateral sclerosis: Systematic review and meta-analysis. **Radiologia Brasileira**. 2020;53(2):116–21.

FINKEL R.S., SEJERSEN T, MERCURI E; ENMC SMA Workshop Study Group.. 218th ENMC International Workshop: Revisiting the consensus on standards of care in SMANaarden, The Netherlands, 19-21 February 2016. **Neuromuscular Disorders**. 2017 Jun;27(6):596-605.

FINKEL R.S. *et al*; ENDEAR Study Group. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. **New England Journal of Medicine**. 2017 Nov 2;377(18):1723-1732

FINSTERER J, ALIYEV R. Fasciculations in human hereditary disease. **Acta Neurologica Belgica**. 2015 Jun;115(2):91-5.

GIANNOPOULOU E.Z. *et al*. Tongue fasciculations in an infant with spinal muscular atrophy type 1. **Gene Therapy**. 2017 Sep;24(9):534-538.

GRAHAM R.J. *et al*; SMA Care Group. Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. **Neuromuscular Disorders**. 2018 Feb;28(2):103-115.

GRAPPERON A.M, ATTARIAN S. Disorders of motor neurons manifested by hyperactivity. **Rev Neurol (Paris)**. 2017 May;173(5):345-351.

GRIZELJ R, VUKOVIĆ J. Tongue fasciculations in the newborn. **Journal of Pediatrics**. 2013 Nov;163(5):1526.e1.

JOHANSSON M.T. *et al*. Fasciculations in nerve and muscle disorders - A prospective study of muscle ultrasound compared to electromyography. **Clinical Neurophysiology**. 2017 Nov;128(11):2250-2257.

KOBAYASHI H, *et al*. Expansion of Intronic GGCCTG hexanucleotide repeat in NOP56 causes SCA36, a type of spinocerebellar ataxia accompanied by motor neuron involvement. **American Journal of Human Genetic** 2011;89:121-30.

KOLB, Stephen J. *et al*. Natural history of infantile-onset spinal muscular atrophy. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 82, n. 6, p. 883-891, dez. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ana.25101>.

KUGELBERG E, WELANDER L. Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. **AMA Arch Neurol Psychiatry**. 1956 May;75(5):500-9.

KUWABARA S, MISAWA S. Axonal ionic pathophysiology in human peripheral neuropathy and motor neuron disease. **Curr Neurovasc Res**. 2004 Oct;1(4):373-9.

LEITE B, SILVA E, CROZARA M. Esclerose lateral amiotrófica e suas complicações. III **Simpósio de assistência farmacêutica**, 2015.

MACHIDA Y, *et al*. Sporadic amyotrophic lateral sclerosis with multiple system degeneration: a report of an autopsy case without respirator administration. **Acta Neuropathol**. 1999 Nov;98(5):512-5.

MENDELL J.R. *et al*. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. **New England Journal of Medicine**. 2017;377(18):1713-22.

MERCURI E, BERTINI E, IANNACCONI ST. Childhood spinal muscular atrophy: controversies and challenges. **Lancet Neurology** 2012;11:443-52

MERCURI E, *et al.* CHERISH Study Group. Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. **New England Journal of Medicine**. 2018;378(7):625-635

MISAWA S, *et al.* Ultrasonographic detection of fasciculations markedly increases diagnostic sensitivity of ALS. *Neurology*. 2011 Oct 18;77(16):1532-7.

MOOSA A, DUBOWITZ V. Spinal muscular atrophy in childhood. Two clues to clinical diagnosis. *Arch Dis Child*. 1973 May;48(5):386-8.

PARSONS D.W., *et al.* Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and odification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number. *American journal of human genetics*. 1998 Dec;63(6):1712-23.

PRIOR T.W. Spinal muscular atrophy: newborn and carrier screening. 2010. **Obstetrics and gynecology clinics of North America** (37) 23–36.

PRIOR TW, FINANGER E. Spinal Muscular Atrophy. 2000 Feb 24 [Updated 2016 Dec 22]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, *et al.*, editors. **GeneReviews®** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/#>

REED D.M., KURLAND L.T.. Muscle fasciculations in a healthy population. **Archives of Neurology**. 1963;9:363-367.

REIMERS C.D., *et al.* Fasciculations: clinical, electromyographic, and ultrasonographic assessment. **Journal of Neurology**. 1996 Aug;243(8):579-84.

ROBERTS D.F., CHAVEZ J, COURT S.D. The genetic component in child mortality. **Archives of disease in childhood**. 1970 Feb;45(239):33-8.

SHY G.M, DRAGER G.A. A neurological syndrome associated with orthostatic hypotension: a clinical-pathologic study. **Archives of Neurology**. 1960 May;2:511-27.

SLEUTJES B.T. Identifying fasciculation potentials in motor neuron disease: A matter of probability. **Muscle & Nerve**. 2016 Feb;53(2):227-33.

STENSON P.D. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. **Human Genetics**. 2017 Jun;136(6):665-677.

SU Y.N. *et al.* Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: a prospective population-based cohort study. **PLoS One**. 2011 Feb 25;6(2):e17067

SUGARMAN E.A., *et al.* Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: clinical laboratory analysis of > 72400 specimens. **European journal of human genetics**. 2012 Jan;20(1):27-32.

VAN DER HEIJDEN A, SPAANS F, REULEN J. Fasciculation potentials in foot and leg muscles of healthy young adults. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**. 1994 Jun;93(3):163-8.

VERHAART I.E.C., *et al.* Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - a literature review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**. 2017 Jul 4;12(1):124.

VITTE J, *et al.* Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. **The American journal of pathology**. 2007 OCT;171(4):1269-80.

WIRTH B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). **Human Mutation**. 2000;15(3):228-37.

ZERRES K, *et al.* Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy. **Lancet**. 1995 Oct 28;346(8983):1162.

## **Accuracy of Muscle Fasciculations for the Diagnosis of Later-Onset Spinal Muscle Atrophy-5q**

Marco Antonio Rocha dos Santos<sup>1</sup>, Samanta F. Brighente<sup>1</sup>, Angela Massignan<sup>2</sup>, Renata Barreto Tenório<sup>3,4</sup>, Lorenzo Longo Makariewicz<sup>5</sup>, Ana Lucila Moreira<sup>6</sup>, Jonas Alex Saute<sup>1,5,7,8\*</sup>

1 - Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

2- Radiology Department, Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil

3 – Hospital Pequeno Príncipe, Curitiba, Brazil

4 – Graduate Program in Medicine: Internal Medicine, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil

5 - Medical Genetics Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil

6 – Neurology Department, Faculdade de Medicina, Universidade de (USP), São Paulo, Brazil.

7 - Neurology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

8 - Department of Internal Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

\*Corresponding author:

Jonas Alex Morales Saute

Medical Genetics Division, HCPA

Ramiro Barcelos, 2350, Zip-code 90035-903, Porto Alegre, Brazil

Phone:+55-051-33598011

e-mail: [jsaute@hcpa.edu.br](mailto:jsaute@hcpa.edu.br)

**ABSTRACT**

Diagnosis of later-onset spinal muscular atrophy (SMA) can be challenging. This study aimed to evaluate the diagnostic properties of the detection of muscle fasciculations for SMA diagnosis in adolescents and adults with proximal muscle weakness. A cross-sectional diagnostic accuracy study was performed, in which 10 subjects with SMA (5 with type II and 5 with type III) and 9 subjects with genetic muscle diseases (gMD) were evaluated by physical examination, muscle ultrasound (MUS) and electromyography (EMG). Inter-rater reliability of MUS was higher than physical examination and in a sensitivity analysis of MUS, all SMA subjects and a single patient with gMD presented fasciculations in at least 2 different muscle groups, resulting in a sensitivity of 1 (95% CI: 0.69 to 1) and a specificity of 0.89 (95% CI: 0.52 to 1) for SMA diagnosis. Forty-two percent of evaluated subjects did not agree to perform EMG, limiting this method results. Muscle ultrasound presented the best diagnostic accuracy and physical examination combined with MUS seemed to be a good strategy for screening adolescents and adults with proximal muscle weakness for SMA. These results might improve diagnostic guidelines for later-onset SMA, leading to earlier diagnosis, treatment and specific care.

**Keywords:** spinal muscular atrophy, fasciculation, ultrasound, electromyography, diagnosis

## 1. INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive monogenic disease characterized by the degeneration of lower motor neurons in the spinal cord. In most cases, it is caused by bi-allelic pathogenic variants in the *SMN1* gene, located on chromosome 5q11.2-q13.3, a condition known as SMA-5q (MUNSAT; DAVIES, 1992; VERHAART *et al.*, 2017). The prevalence and incidence of SMA vary across world regions, being estimated in 1-2/100.000 and 1-1.7/10,000 inhabitants, respectively (BUENO *et al.*, 2011; SU *et al.*, 2011).

The spectrum of clinical manifestations of SMA is wide, being classified according to the age of onset and best achieved motor function into a severe form, in which weak and hypotonic infants will not be able to sit independently (type I SMA); a non-ambulating form (type II SMA) and ambulating forms with proximal muscular weakness, in which gait capacity may or may not be retained throughout life (type III SMA if childhood onset and type IV if adult-onset) (MERCURI *et al.*, 2018a).

Current guidelines suggests that SMA suspicion should be based on clinical findings with genetic testing being considered the first-tier complementary study for diagnostic evaluation (MERCURI *et al.*, 2018a). In the context of a floppy baby, SMA type I suspicion is usually straightforward; however, for later-onset forms (SMA types II-IV) neurophysiological and other complementary studies are generally performed earlier than genetic testing for narrowing differential diagnosis, unless the clinical picture is very characteristic of SMA, like in the context of proximal weakness with unequivocal muscle fasciculations (AMATO, ANTHONY A. RUSSEL, [s. d.]) (BODENSTEINER, 2008).

Muscle fasciculations are defined as non-painful, rapid, involuntary and random muscle contractions. They are a common feature after injury of peripheral nerves by

trauma or degenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and SMA and, less frequently, Charcot-Marie-Tooth disease and spinocerebellar ataxias (DE CARVALHO *et al.*, 2016; FINSTERER; ALIYEV, 2015). Fasciculations can be identified during neurological examination, by electromyography (EMG) or muscle ultrasound (MUS). The later method is currently considered the gold-standard for its detection, based on comparative studies across diagnostic methods in ALS patients and healthy individuals. (DUARTE *et al.*, 2020; MISAWA *et al.*, 2011). Although fasciculations are common in SMA, little is known about the diagnostic properties of MUS for this disease (ALSAMAN; ALSHAIKH, 2013; MOOSA; DUBOWITZ, 1973; MUNSAT; DAVIES, 1992).

Therefore, the aim of this study is to evaluate the diagnostic properties of muscle fasciculations detected by MUS, EMG and physical examination for SMA diagnosis in patients with proximal muscle weakness, searching for tools that might speed up the diagnostic odyssey of patients with later-onset forms of SMA potentially leading to earlier disease-modifying treatments and better care.

## **2. METHODS**

### *2.1 Study design*

A single center exploratory diagnostic accuracy cross-sectional study was performed, in which a convenience sample of subjects with genetic or pathological confirmation of a neuromuscular disorder presenting with proximal and symmetrical muscle weakness that started after 6 months of age was recruited.

Exclusion criteria were inheritance pattern suggestive of autosomal dominant disease, clinical signs of pyramidal tract injury, facial weakness, presence of intellectual

disability or cognitive decline according to clinician impression and medical records, previous diagnosis of immune-mediated, toxic or endocrinological myopathies, and chronic use of drugs that facilitate the appearance of fasciculations, including glucocorticoids, succinylacetone, nortriptyline, flunarizine and isoniazid. After being eligible, participants were divided into two groups with similar sample sizes, ages and gender distributions, later-onset SMA and genetic muscle diseases (gMD) with proximal weakness.

Recruitment was performed from October 2019 to February 2021 and the study was approved by the Ethics in Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA 2019-0448), Porto Alegre, Brazil and all subjects or legal representatives signed and informed consent form previous to participation.

## *2.2 Data Collection*

Data regarding sex, age, age at onset, disease duration and diagnosis were collected from patients and relatives or retrieved from electronic medical records.

The evaluation protocol consisted of physical examination, MUS and EMG focused on the detection of fasciculations on *biceps brachii*, first dorsal interosseous, *rectus femoris*, *vastus lateralis*, *tibialis anterior*, paraspinal muscles at tenth dorsal vertebra level and tongue. Physical examination was performed for 30 seconds, with 15 seconds of spontaneous observation followed by 15 seconds of observation after light percussion on the muscle belly; for tongue evaluation, the tongue was observed in a relaxed position inside the patient's mouth for 15 seconds, which was followed by 15 seconds of tongue protrusion. The total number of muscles that fasciculate was informed by each evaluator and the subjects were categorized into three groups: 1 – presence of fasciculation, 2- absence of fasciculation and 3 – undefined.

MUS and EMG were performed on the same muscles by 1 minute, except for the first dorsal interosseous, in which the observation period was 2 minutes (MILLS, 2011). An unblinded neurophysiologist (MARS) was responsible for all of the physical examination sessions, and most EMG and MUS examinations.

Physical examination was recorded with a 12MPx smartphone camera (Motorola Moto Z2 play) and MUS was performed and recorded on a Toshiba Aplio 300 equipment with linear transducer of 5-10 MHz. MUS and physical examination recordings were latter evaluated by other investigators blinded to the patient's diagnosis. There were 3 external evaluators for the physical examination, a medical geneticist with experience in neuromuscular diseases (RBT), a senior neurologist and medical geneticist with expertise in genetic neuromuscular diseases (JAS) and a neurophysiologist (SFB); and 2 for MUS, a radiologist with experience with soft tissues ultrasound (AM) and an experienced neurophysiologist and neurosonologist (ALM). For physical examination analysis, categorical classifications (i.e., presence or absence of fasciculations) disagreements were solved by simple majority or by consensus of investigators in a virtual meeting with videos reviews. For MUS, categorical disagreements were solved by simple majority.

### *2.3 Statistical analysis*

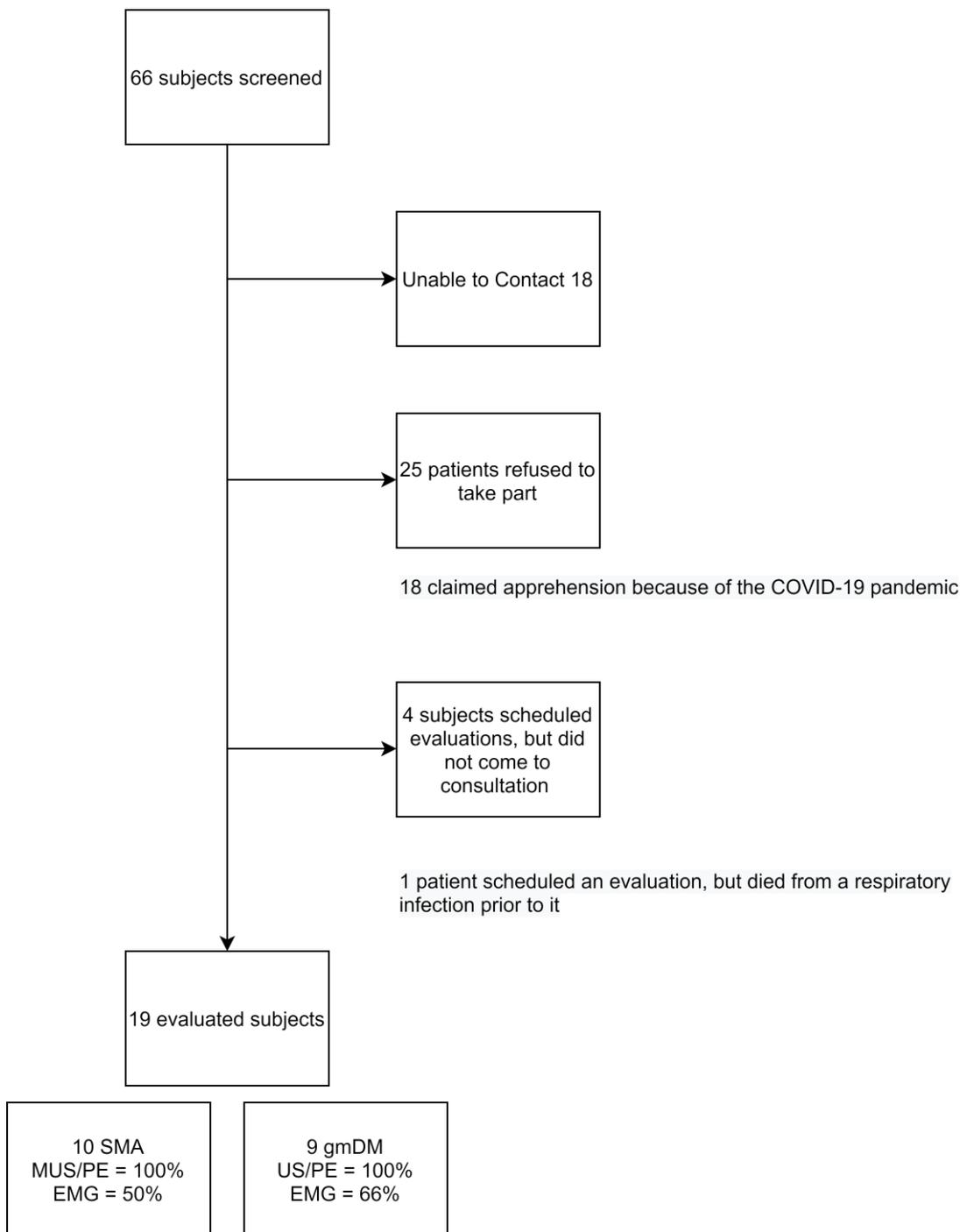
Statistical tests were selected according to the distribution of data given by Shapiro-Wilk test and histograms. Age, disease duration, and other continuous variables in the study exhibited a non-parametric distribution and were shown as median and interquartile ranges. Interrater-reliability was evaluated by Intraclass Correlation Coefficient (ICC). Differences between SMA and gMD concerning the number of muscles that presented fasciculation were compared by Mann-Whitney U test.

Diagnostic properties of investigator's consensus analysis were organized in contingency tables, in which a Fisher's Exact Test was performed. The diagnostic properties of sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were also calculated. Diagnostic accuracy of the different methods or of combined methods was estimated using Receiver Operating Characteristic curves (ROC curve). Statistical significance was defined as  $p < 0.05$  and analysis were conducted in R (R Core Team, 2020), v 4.0.3 and RSTUDIO (RSTUDIO Team, 2020) v1.1.43.

### 3. RESULTS

Sixty-six subjects were initially screened for participation, but only 19 were included. See **Supp. Figure 1** for a detailed description of the study recruitment process. Ten subjects with SMA, being 5 with type II and 5 with type III and 9 subjects with gMD were evaluated. See **Table 1** for the main clinical characteristics and **Table 2** for the number of muscles with fasciculations across the different diagnostic methods on the SMA and gMD groups.

#### **Supp. Figure 1. Recruitment and selection**



**Table 1. Demographic and clinical characteristics**

	SMA (n=10)	gMD (n=9)
<b>Diagnosis</b>		LGMD2A/LGMD-R1 = 2
		LGMD2B/LGMD-R2 = 2
	SMA Type II = 5	LGMD2C/LGMD-R3 = 1
	SMA Type III = 5	LGMD <sup>1</sup> = 2
		COL6A1 related disorder = 1
		NEM = 1
<b>Male sex (%)</b>	8/10 (80%)	7/9 (77.7%)
<b>Age, years</b>	23 (24)	32 (22)
<b>Disease duration, years</b>	21 (13.25)	17 (11)
<b>Wheelchair bound (%)</b>	7/10 (70%)	5/9 (55.5%)
<b>Ventilatory support (%)</b>	2/10 (20%)	1/9 (11.1%)

Data are shown as median and interquartile ranges. gMD, genetic muscle disease; LGMD, limb-girdle muscular dystrophy; NEM, nemaline myopathy; SMA, spinal muscular atrophy. <sup>1</sup> diagnosis based on dystrophic findings in muscle biopsy.

**Table 2. Comparison of the total number of muscles with fasciculations**

	SMA	gMD	
<b>Any method</b>	4.5 (3.25-6)	1 (0-1)	0.0007
<b>Physical Examination</b>	1 (0-1)	0 (0-1)	0.001
<b>MUS</b>	4.5 (3.25-6)	0 (0-1)	0.0007
<b>EMG<sup>1</sup></b>	3 (2-4)	0 (0)	0.01

Data are shown as median and interquartile ranges. SMA, spinal muscular atrophy; gMD, genetic muscle disease; MUS, muscular ultrasound; EMG, electromyography. <sup>1</sup> 5 SMA and 6 gMD subjects performed EMG.

### 3.1 Physical examination

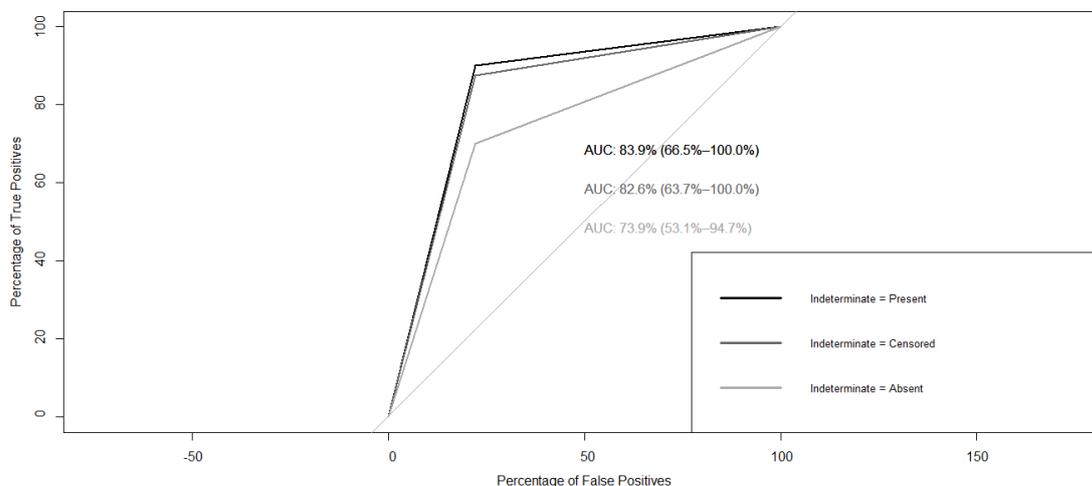
Inter-rater reliability of physical examination recordings was poor for the total number of muscles with fasciculation (ICC=0.333, p=0.0009) and moderate for categorical classification of fasciculation (ICC=0.59, p<0.00001).

Diagnostic properties of physical examination detection of fasciculations to discriminate SMA from gMD were assessed after a consensus of the categorical classification of subjects (i.e., if the subject presented fasciculation or not). Since 3

subjects were classified as “indeterminate” by the consensus the diagnostic properties of physical examination were evaluated in different ways.

When considering indeterminate classification as presence of fasciculations, 9/10 individuals with SMA and 2/9 individuals with gMD were considered to have fasciculations on physical examination ( $p=0.005$ ), resulting in a sensitivity of 0.9 (95% CI: 0.55 to 1), a specificity of 0.78 (95% CI: 0.4 to 0.97), a positive predictive value (PPV) of 0.82 (95% CI: 0.48 to 0.98), a negative predictive value (NPV) of 0.88 (95% CI: 0.47 to 1), a positive likelihood ratio (PLR) of 4.05 (95% CI: 1.17 to 13.99) and a negative likelihood ratio (NLR) of 0.13 (95% CI: 0.02 to 0.85) for SMA diagnosis. Diagnostic accuracy considering indeterminate classifications by physical examination as absence of fasciculations or censoring these individuals' data are shown in **Supp. Figure 2**. Evaluator's accuracy ranged from 68.3% (95% CI: 53.1%-90.5%) to 90.6% (95% CI: 77.2%-100%).

**Supp. Figure 2 – Comparison of physical examination accuracy considering the indeterminate cases as positives, negatives or censored from the analysis**



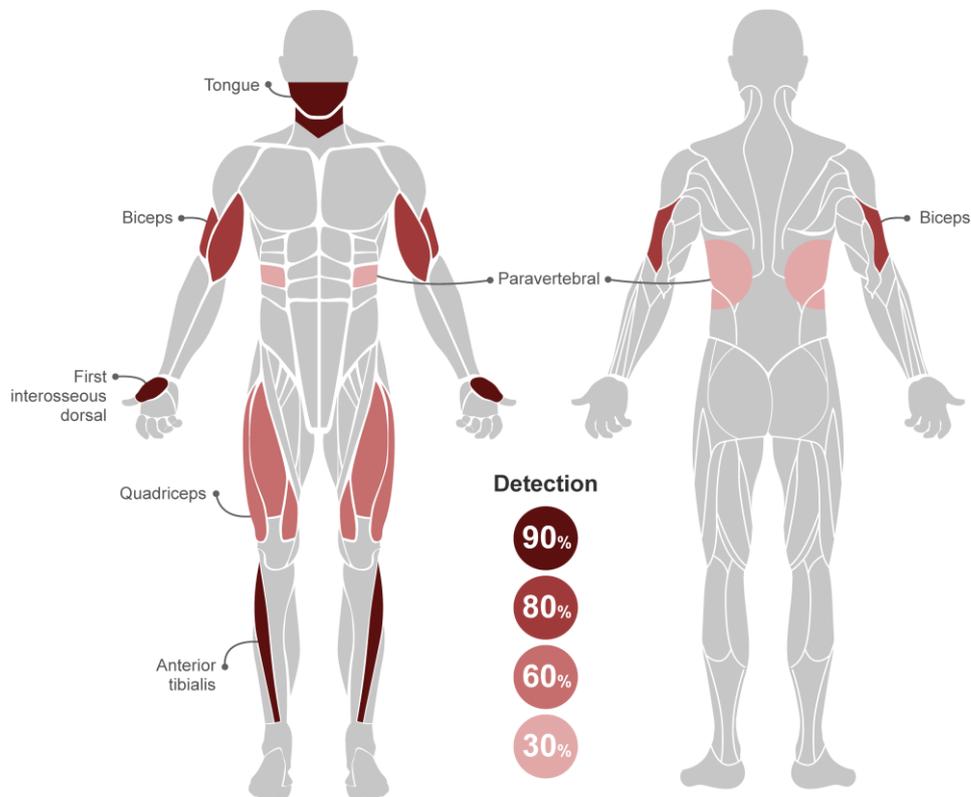
### 3.2 Muscle Ultrasound

ICC for the total number of muscles that fasciculate and for the categorical classification of fasciculation detection by MUS was good to excellent (ICC=0.83,  $p < 0.0001$ ; ICC=0.80,  $p < 0.0001$ , respectively). The detection rate of fasciculations in SMA subjects by MUS in each of the evaluated muscles is shown in **Figure 1**.

Evaluator's accuracy ranged from 91.7% (95% CI: 77%-100%) to 97.8% (95% CI: 92.5%-100%).

All SMA subjects and only 3/9 subjects with gMD were found to fasciculate ( $p=0.003$ ) on MUS, resulting in a sensitivity of 1 (95% CI: 0.69 to 1), specificity of 0.67 (95% CI: 0.3 to 93), PPV of 0.77 (95% CI: 0.46 to 0.95), NPV of 1 (95% CI: 0.54 to 1), a PLR of 3 (95% CI: 1.19 to 7.56) and a NLR of 0 for SMA diagnosis. Interestingly, a patient with Bethlem-myopathy phenotype related to *COL6A1* was found to fasciculate in 4 different muscle groups.

**Figure 1 – Detection Rate of fasciculation in SMA subjects by muscle ultrasound**



Created with Dro, by Clara Heinrich

On a sensitivity analysis, all subjects with SMA and only the patient with Bethlehem-myopathy from the gMD group presented fasciculations in at least 2 different muscle groups ( $p=0.0001$ ), resulting in a sensitivity of 1 (95% CI: 0.69 to 1), specificity of 0.89 (95% CI: 0.52 to 1), PPV of 0.91 (95% CI: 0.59 to 1), NPV of 1 (95% CI: 0.63 to 1), a PLR of 9 (95% CI: 1.42 to 57.12) and a NLR of 0 for SMA diagnosis.

### 3.3 Electromyography

Only eleven subjects agreed to be evaluated with EMG, 5/10 with SMA and 6/9 with

gMD. While 4/5 subjects with SMA presented fasciculations on EMG, none of the gMD group presented fasciculations ( $p=0.01$ ), resulting in a sensitivity of 0.8 (95% CI: 0.42 to 1), specificity of 1 (95% CI: 0.4 to 1), PPV of 0.86 (95% CI: 0.28 to 1), NPV of 1 (95% CI: 0.54 to 1), a PLR of 7 (95% CI: 1.14 to 42.97) and a NLR of 0 for SMA diagnosis.

### 3.4 Combined Methods

While all subjects with SMA were found to fasciculate on at least one of the diagnostic methods, 5/9 of the gMD subjects presented fasciculations with combined methods ( $p=0.03$ ), resulting in a sensitivity of 1 (95% CI: 0.69 to 1), specificity of 0.44 (95% CI: 0.14 to 0.79), PPV of 0.67 (95% CI: 0.38 to 0.88), NPV of 1 (95% CI: 0.4 to 1), a PLR of 1.8 (95% CI: 1.3 to 3.23) and a NLR of 0 for SMA diagnosis, see **Table 3**.

**Table 3 – Contingency table and diagnostic properties of all methods combined**

	SMA	gMD	Total
<b>Fasciculation</b>	10	5	15
<b>No fasciculation</b>	0	4	4
<b>Total</b>	10	9	19

Sensitivity = 1 (95% CI 0.69 to 1)  
 Specificity = 0.44 (95% CI 0.14-0.79)  
 PPV = 0.67 (95% CI 0.38-0.88)  
 NPV = 1 (95% CI 0.4-1)

CI, confidence interval; gMD, genetic muscle disease; NPV: negative predictive value, PPV, positive predictive value; SMA, spinal muscular atrophy.

When performing the sensitivity analysis considering the presence of fasciculations in at least 2 different muscle groups, the diagnostic properties of combined methods was equal to MUS alone, see **Supp. Table 1**.

**Supplemental Table 1 – Contingency table and diagnostic properties of all methods combined, considering the presence of fasciculation in 2 or more muscle groups**

	SMA	gMD	Total
<b>Fasciculation</b>	10	1	11
<b>No fasciculation</b>	0	8	8
<b>Total</b>	10	9	19

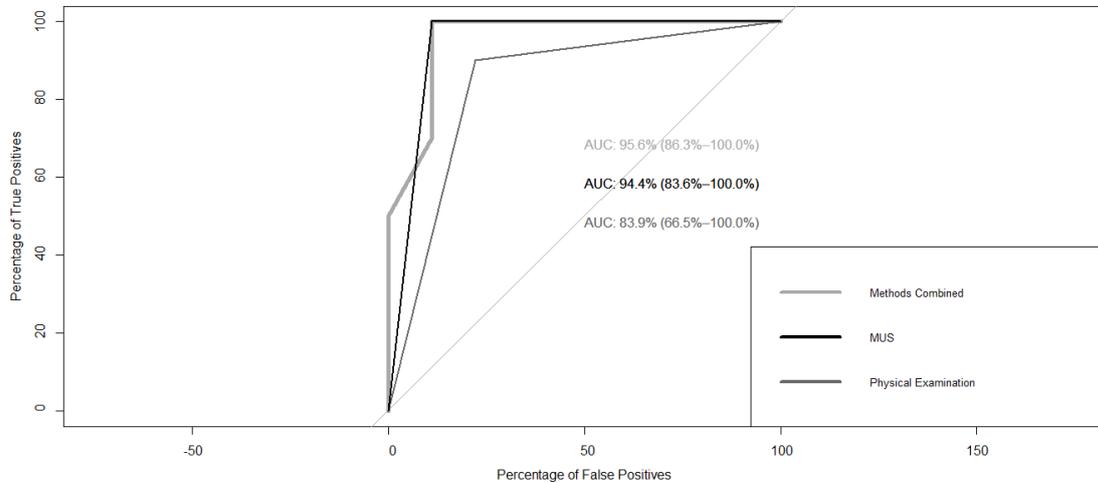
Sensitivity = 1 (95% CI: 0.69 to 1)  
 Specificity = 0.89 (95% CI: 0.52 to 1)  
 PPV = 0.91 (95% CI: 0.59 to 1)  
 NPV = 1 (95% CI: 0.63 to 1)

CI, confidence interval; gMD, genetic muscle disease; NPV: negative predictive value, PPV, positive predictive value; SMA, spinal muscular atrophy.

### *3.5 Which method of fasciculation detection presented a better diagnostic accuracy for SMA diagnosis?*

The accuracy of fasciculation detection by the different studied methods are shown in **Figure 2**. AUC was 95.6% (CI 95%: 86.3 to 100%) for physical examination combined with MUS, 94.4% (CI 95%: 83.6 to 100%) for MUS alone and 83.9% (CI 95%: 66.5 to 100%) for physical examination alone. EMG AUC was 90% (CI 95%: 70.4 to 100%), but due to the lower sample size than the other methods it was not included in the combined analyzes.

### **Figure 2 – Comparison of Accuracy of Physical Examination, MUS and the combination of them**



**MUS**, muscular ultrasound

#### 4. DISCUSSION

The current management of SMA was revolutionized by the recent approvals of disease-modifying treatments such as antisense oligonucleotides and gene-replacement therapy, in which early treatments are related to better clinical outcomes (DECONINCK *et al.*, 2021; FINKEL *et al.*, 2017b; MENDELL *et al.*, 2017; MERCURI *et al.*, 2018b; VIVO *et al.*, 2019). These recent developments made accurate diagnosis of SMA a paramount task. Although genetic testing presents high sensitivity and specificity for this diagnosis, several times the suspicion of later-onset forms of the disease will be raised only after neurophysiological, neuroimaging or even pathological studies. In the present study we have evaluated the diagnostic properties of fasciculation detection by different methods to differentiate SMA from other genetic disease presenting with proximal weakness. Our results showed the highest diagnostic accuracy for muscle ultrasound, which presented 100% of sensitivity and higher specificity when considering the presence of fasciculations in 2 or more muscle groups.

Previous studies that evaluated fasciculation detection by different methods for diagnosis of anterior horn disorders, focused on supporting the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (ARTS *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2020; MISAWA *et al.*, 2011; TSUGAWA *et al.*, 2018). Fasciculations were not systematically studied in SMA patients with more advance tools, with MUS being used only to identify different patterns of muscle involvement (PILLEN *et al.*, 2011)

In the present study we have found that all patients with SMA presented fasciculation on MUS. Specificity of MUS; however, was moderate when considering the detection of fasciculations in any of the six studied muscle groups. When increasing the threshold for a MUS result suggestive of SMA to the presence of fasciculations in 2 or more muscle groups, while MUS sensitivity did not change, its specificity increased importantly, with only a single subject with Bethlem myopathy presenting a false positive result. Of note, the inter-rater reliability of MUS was good to excellent even with evaluators of different degrees of expertise. On the other hand, inter-rater reliability of physical examination for fasciculation detection was only moderate. However, we cannot exclude that limitations of evaluations based on video recording might have impacted physical examination inter-rater reliability.

Previous authors have described the presence of tongue fasciculations as a red flag for the diagnosis of SMA in floppy babies (AMATO, ANTHONY A. RUSSEL, [s. d.]). The prevalence of tongue fasciculations was estimated in 70% of type II SMA and of any muscle fasciculation in 50% of type III SMA based on physical examination (MUNSAT; DAVIES, 1992). A case series that evaluated 13 subjects with type III SMA described tongue fasciculation in only 3 of them; another series of 8 patients with type III and IV SMA found fasciculation in only 2 of them (ALSAMAN; ALSHAIKH, 2013; MOOSA; DUBOWITZ, 1973). We have found that 60% of type II and type III SMA

subjects presented unequivocal fasciculations on physical examination, which was similar to some of the previous reports; however, an additional 30% of subjects presented indeterminate results, raising the suspicion of fasciculations to be present in 90% of type II and type III SMA subjects in study. However, when considering MUS, not only all SMA subjects presented fasciculations, but also all presented fasciculations in at least two different muscle groups. Additionally, contrary to physical examination, there was no single case in which MUS evaluators considered the presence of fasciculation as doubtful or indeterminate. In other words, the greater prevalence of fasciculations in subjects with SMA found in the present study was due to the use of more sensitive and reliable methods for detecting this finding and consequently pointing to SMA diagnosis. Interestingly, detection rate of tongue fasciculation in SMA individuals was 90%, which is higher than what was reported for MUS in ALS, in which the detection rate of tongue fasciculation was 60-69% (MISAWA *et al.*, 2011; O'GORMAN *et al.*, 2017).

Forty-two percent of evaluated subjects did not agree to perform EMG for the purpose of this study, and the sample for EMG examination was not large enough to make robust conclusions about the diagnostic properties of the method. However, since 1/5 subjects with SMA that performed EMG did not present fasciculation and MUS detected fasciculations in at least two muscles in all SMA cases, it is very being unlikely that EMG will have similar or better sensitivity than MUS for fasciculation detection in SMA. Another issue against EMG diagnostic performance in the present study is that the exam was performed and immediately rated by an unblinded investigator, increasing the chance of assessment bias that might lead to better performances of EMG, a bias not expected for MUS or physical examination with the study design. However, it is worth to mention that in a scenario in which the patient doesn't have a

definitive diagnosis, the adherence to EMG may be higher and the role of fasciculation detected by EMG for SMA diagnosis may be established with greater robustness in future studies.

Interestingly, a single subject with Bethem myopathy related to *COL61A* presented fasciculations in 4 muscle groups when evaluated by MUS. We were not able to find any description of fasciculation as part of the clinical picture of this myopathy. Perhaps this finding is just an extreme presentation of benign fasciculation syndrome or perhaps future studies will uncover deep fasciculations in this disorder when evaluated with MUS.

#### *4.1 Study Limitations and Strengths*

The major limitation of the study was its small sample size and its exploratory design. The disease rarity and the single center approach might have explained the small sample; however, as shown in our study recruitment flowchart more than a half of potentially eligible subjects who were contacted did not participate in the study due to the necessity of social distancing imposed by the COVID-19 pandemic. Even with the small sample size, we have found significant difference between groups regarding the presence of fasciculations with the different methods due to large effect sizes; however, smaller sample impacted in the large confidence intervals that were reported. This study was performed in a setting where patients had very long disease durations (median of 21 years for the SMA group and 17 years for the gMD group). Most patients had long standing disability related to muscle weakness; wasting and atrophy, with 70% of SMA subjects and 55% of gMD subjects being wheelchair dependent at evaluation. Considering that late stages neurogenic diseases may have short amplitude potentials, without denervation, resembling myopathic potentials in EMG (PRESTON; SHAPIRO, 2020), longer disease durations of evaluated subjects are

probably acting as a conservative bias to differentiate SMA from gMD, and it is likely that studies evaluating subjects earlier in the disease course will have similar or even greater detection rates of fasciculations.

The study design applying blinded evaluations for MUS and physical examination, which were rated by physicians with different degrees of expertise reveals the robustness of findings and might indicate external validity of the obtained results. Another strength of the study is that the diagnostic properties of the methods for detecting fasciculation were assessed in subjects with SMA when compared to subjects with genetic muscle diseases and not against healthy individuals. Our study resembled a scenario of differential diagnosis that is closer to what is found on neuromuscular disorders clinics practice, but it is different from the studies in ALS that evaluated diagnostic properties of the methods against healthy controls and that might have overestimated its accuracy.

## **5 CONCLUSION**

The present study established the diagnostic properties of fasciculation detection for the diagnosis of SMA, depicting that MUS present the best accuracy and that physical examination and MUS combined seem to be a good strategy for screening adolescents and adults with proximal muscular weakness for the diagnosis of SMA. These results might improve diagnostic guidelines for later-onset SMA, leading to earlier diagnosis, treatment and specific care.



## REFERENCES

- ALSAMAN, Abdulaziz S.; ALSHAIKH, Nahla M. Type III spinal muscular atrophy mimicking muscular dystrophies. **Pediatric Neurology**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 363–366, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2012.12.027>
- AMATO, ANTHONY A. RUSSEL, James A. **Neuromuscular Disorders, 2nd Ed.** [S. l.: s. n.]. E-book.
- ARTS, Ilse M. P. *et al.* Muscle ultrasonography: a diagnostic tool for amyotrophic lateral sclerosis. **Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, Netherlands, v. 123, n. 8, p. 1662–1667, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.11.262>
- BODENSTEINER, John B. The Evaluation of the Hypotonic Infant. **Seminars in Pediatric Neurology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 10–20, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.spen.2008.01.003>
- BUENO, K. C. *et al.* Detection of spinal muscular atrophy carriers in a sample of the Brazilian population. **Neuroepidemiology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 105–108, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000324156>
- DE CARVALHO, Mamede *et al.* Modulation of fasciculation frequency in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, [S. l.], v. 87, n. 2, p. 226–228, 2016. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1136/jnnp-2014-309686>
- DECONINCK, Nicolas *et al.* Risdiplam in Type 1 Spinal Muscular Atrophy. [S. l.], p. 915–923, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2009965>
- DUARTE, Márcio Luís *et al.* Ultrasound versus electromyography for the detection of fasciculation in amyotrophic lateral sclerosis: Systematic review and meta-analysis. **Radiologia Brasileira**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 116–121, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/0100-3984.2019.0055>

FINKEL, Richard S. *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. **The New England journal of medicine**, [S. l.], v. 377, n. 18, p. 1723–1732, 2017 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1702752>

FINKEL, Richard S. *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 377, n. 18, p. 1723–1732, 2017 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/nejmoa1702752>

FINSTERER, Josef; ALIYEV, Rahim. Fasciculations in human hereditary disease. **Acta Neurologica Belgica**, [S. l.], v. 115, n. 2, p. 91–95, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13760-014-0335-6>

MENDELL, Jerry R. *et al.* Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 377, n. 18, p. 1713–1722, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>

MERCURI, Eugenio *et al.* Diagnosis and management of spinal muscular atrophy: Part 1: Recommendations for diagnosis, rehabilitation, orthopedic and nutritional care. **Neuromuscular Disorders**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 103–115, 2018 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2017.11.005>

MERCURI, Eugenio *et al.* Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 378, n. 7, p. 625–635, 2018 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1710504>

MILLS, Kerry R. Detecting fasciculations in amyotrophic lateral sclerosis: Duration of observation required. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, [S. l.], v. 82, n. 5, p. 549–551, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jnnp.2009.186833>

MISAWA, S. *et al.* Ultrasonographic detection of fasciculations markedly increases

diagnostic sensitivity of ALS. **Neurology**, [S. l.], v. 77, n. 16, p. 1532–1537, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318233b36a>

MOOSA, A.; DUBOWITZ, V. Spinal muscular atrophy in childhood Two clues. [S. l.], p. 386–388, 1973.

MUNSAT, Theodore L.; DAVIES, Kay E. International SMA Consortium Meeting (26–28 June 1992, Bonn, Germany). **Neuromuscular Disorders**, [S. l.], v. 2, n. 5–6, p. 423–428, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(06\)80015-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(06)80015-5)

O'GORMAN, Cullen M. *et al.* Detecting fasciculations in cranial nerve innervated muscles with ultrasound in Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Muscle & Nerve**, [S. l.], v. 56, n. 6, p. 1072–1076, 2017.

PILLEN, Sigrid *et al.* Assessing spinal muscular atrophy with quantitative ultrasound. **Neurology**, [S. l.], v. 76, n. 10, p. 933, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182068eed>

PRESTON, David C.; SHAPIRO, Barbara E. **Electromyography and Neuromuscular Disorders**. [S. l.: s. n.]. v. 4E-book. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archneur.55.8.1150>

SU, Yi Ning *et al.* Carrier screening for spinal muscular atrophy (SMA) in 107,611 pregnant women during the period 2005-2009: A prospective population-based cohort study. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 1–7, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017067>

TSUGAWA, Jun *et al.* Fasciculation intensity and disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. **Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology**, Netherlands, v. 129, n. 10, p. 2149–2154, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2018.07.015>

VERHAART, Ingrid E. C. *et al.* Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - A literature review. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13023-017-0671-8>

VIVO, Darryl C. De *et al.* Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. **Neuromuscular Disorders**, [S. l.], v. 29, 2019.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo realizou a exploração da acurácia diagnóstica de fasciculações para o diagnóstico de formas tardias de AME em um cenário bastante parecido ao da prática clínica, com um grupo controle que não era composto de indivíduos saudáveis, mas sim de pacientes com diagnóstico de doenças neuromusculares com fraqueza proximal.

Até o presente momento, não temos conhecimento de outro estudo que tenha pesquisado a presença de fasciculações de modo sistemático e avaliado suas propriedades diagnósticas nessa doença.

Os achados encontrados mostram que o uso de métodos combinados de pesquisa de fasciculação tem alta sensibilidade e especificidade nesse cenário.

A correlação interexaminador foi moderada em relação ao exame físico. Não podemos, entretanto, excluir que limitações nas gravações dos vídeos possam ter impactado esse achado.

Em relação à USM, a correlação foi satisfatória, mostrando que, para o achado de fasciculações musculares, examinadores em graus variados de experiência tiveram impressões semelhantes.

Ao final, o objetivo geral de avaliar a acurácia geral da detecção de fasciculações musculares para o diagnóstico de formas tardias de AME; os objetivos específicos de avaliar as diferentes propriedades diagnósticas desse achado para o diagnóstico, a confiabilidade inter-observador para o exame físico e ultrassonografia foram cumpridos (com a ressalva de intervalos amplos de confiança pela baixa amostragem do estudo).

Espera-se, com isso, que a pesquisa sistematizada de fasciculações possa reduzir o subdiagnóstico de AME e auxiliar na tomada de decisão sobre sua investigação.

## 9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a utilização em maior escala da ultrassonografia muscular em contexto clínico, é possível confrontar os dados obtidos nesse estudo com a realidade clínica, averiguando sua validade externa. Aparelho portáteis como aqueles compatíveis com celular poderão ter qualidade visual suficiente para propiciar seu uso em como método de rastreio. Projetos com essa metodologia de captura de dados poderão disseminar em ambulatórios de doenças neuromusculares com impacto real no cuidado aos pacientes e famílias.

A principal limitação de nosso estudo deu-se por conta de sua amostragem. Frente a isso, consideramos que a metodologia empregada é adequada para a pesquisa do achado de fasciculações, podendo ser apenas ampliada o número de sujeitos investigados.

## 10 APÊNDICES

### Apêndice 1 – **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do CAAE: 17091019.1.0000.5327

**Projeto:** ACURÁCIA DE FASCICULAÇÕES DE LÍNGUA PARA O DIAGNÓSTICO DE FORMAS TARDIAS DE ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL 5q

Você ou a pessoa pela qual você é responsável estão sendo convidados a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar se a ultrassonografia muscular ajuda no diagnóstico de pacientes com Atrofia Muscular Espinhal, diferenciando esta condição de outras doenças neurológicas que também causam fraqueza nas coxas e nos ombros.

Você ou a pessoa por você representada por você está sendo convidado ou por ser portador de atrofia muscular espinhal ou por ter outra doença neurológica que ocasione fraqueza muscular. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Ambulatório de Neurogenética em colaboração com o Serviço de Neurologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Sabemos que no exame físico de pacientes com atrofia muscular espinhal encontramos presença de contrações involuntárias dos músculos, o que chamamos de “fasciculações”. Nesse projeto de pesquisa, nós queremos descobrir se a presença desse achado tornaria o diagnóstico da doença mais fácil e rápido.

Se você concordar, a sua participação neste estudo consistirá em:

1. Entrevista clínica e consulta a dados clínicos e resultados de exames já registrados em prontuário;
2. Exame físico para observação da presença ou não dessas contrações musculares por 1 médico, este exame será gravado em vídeo no aparelho celular do pesquisador para ser posteriormente analisado na pesquisa;
3. Exame de ecografia muscular do queixo, braços e pernas, na qual será colocado um gel em cada parte e será colocado um aparelho de ultrassom para observar a ocorrência dessas contrações, com duração de 10 minutos.
4. Exame de eletromiografia, na qual será introduzida uma agulha muito fina em sua língua, braços e pernas, com duração aproximada de 1 minuto.

Os possíveis riscos e possíveis desconfortos decorrentes da participação na pesquisa são relacionados ao tempo das avaliações, e ao possível desconforto na realização do exame de eletromiografia, que pode ocasionar dor leve a moderada. O exame de ecografia não é um exame invasivo (sendo o mesmo exame realizado por gestantes) e não se espera que tenha desconfortos associados. Também poderá haver algum constrangimento pela filmagem do exame físico, mas estas imagens não serão divulgadas e serão analisadas apenas pelos pesquisadores.

A participação no estudo não trará benefício direto ou imediato para o paciente ou para possíveis parentes afetados, mas a pesquisa poderá ajudar a entender melhor os mecanismos relacionados à doença, com potenciais benefícios em relação a futuros diagnósticos.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar ou autorizar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o paciente

recebe ou possa vir a receber nessa instituição. Não será previsto qualquer tipo de pagamento pela sua participação no estudo. Você também não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da participação na pesquisa, o paciente receberá atendimento integral pelo tempo que for necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o nome e as filmagens não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Jonas Alex Morales Saute pelo telefone (51) 3359-8011 ou com o pesquisador Marco Antonio Rocha dos Santos pelo telefone (51) 3359-8520; ou ainda com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2229, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

\_\_\_\_\_  
Nome do participante da pesquisa:

\_\_\_\_\_  
Assinatura (*se aplicável*)

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável (*se aplicável*)

\_\_\_\_\_  
Assinatura (*se aplicável*)

\_\_\_\_\_  
Nome do pesquisador que aplicou o Termo

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

## Apêndice 2 – Checklist STARD (Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy)

Section & Topic	No	Item	Reported on page
TITLE OR ABSTRACT			
	1	Identification as a study of diagnostic accuracy using at least one measure of accuracy (such as sensitivity, specificity, predictive values, or AUC)	1 and 2
ABSTRACT			
	2	Structured summary of study design, methods, results, and conclusions	5
INTRODUCTION			
	3	Scientific and clinical background, including the intended use and clinical role of the index test	12 to 25
	4	Study objectives and hypotheses	29
METHODS			
<i>Study design</i>	5	Whether data collection was planned before the index test and reference standard were performed (prospective study) or after (retrospective study)	38 to 39
<i>Participants</i>	6	Eligibility criteria	38 to 39
	7	On what basis potentially eligible participants were identified (such as symptoms, results from previous tests, inclusion in registry)	39
	8	Where and when potentially eligible participants were identified (setting, location and dates)	39
	9	Whether participants formed a consecutive, random or convenience series	39
<i>Test methods</i>	10a	Index test, in sufficient detail to allow replication	39 to 40
	10b	Reference standard, in sufficient detail to allow replication	39 to 40
	11	Rationale for choosing the reference standard (if alternatives exist)	NA
	12a	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the index test, distinguishing pre-specified from exploratory	39 to 40
	12b	Definition of and rationale for test positivity cut-offs or result categories of the reference standard, distinguishing pre-specified from exploratory	39 to 40
	13a	Whether clinical information and reference standard results were available to the performers/readers of the index test	40
	13b	Whether clinical information and index test results were available to the assessors of the reference standard	40
<i>Analysis</i>	14	Methods for estimating or comparing measures of diagnostic accuracy	43 to 48

	15	How indeterminate index test or reference standard results were handled	43 to 44
	16	How missing data on the index test and reference standard were handled	NA
	17	Any analyses of variability in diagnostic accuracy, distinguishing pre-specified from exploratory	47
	18	Intended sample size and how it was determined	NA
<b>RESULTS</b>			
<i>Participants</i>	19	Flow of participants, using a diagram	42
	20	Baseline demographic and clinical characteristics of participants	43
	21a	Distribution of severity of disease in those with the target condition	43
	21b	Distribution of alternative diagnoses in those without the target condition	43
	22	Time interval and any clinical interventions between index test and reference standard	NA
<i>Test results</i>	23	Cross tabulation of the index test results (or their distribution) by the results of the reference standard	43
	24	Estimates of diagnostic accuracy and their precision (such as 95% confidence intervals)	43 to 48
	25	Any adverse events from performing the index test or the reference standard	NA
<b>DISCUSSION</b>			
	26	Study limitations, including sources of potential bias, statistical uncertainty, and generalizability	51
	27	Implications for practice, including the intended use and clinical role of the index test	52
<b>OTHER INFORMATION</b>			
	28	Registration number and name of registry	39
	29	Where the full study protocol can be accessed	NA
	30	Sources of funding and other support; role of funders	39