

Determinación de apolipoproteínas B y A-I en sangre desecada en tarjeta: estudio preliminar

M. Lafita^a, Y. Sáez^a, J.P. Sáez de Lafuente^{a,b}, I. Narváez^a, E. Baztán^a, A. Magro^a, P.J. Lafuente^{a,c}, E. Molinero^d, J.D. Sagastagoitia^d y J.A. Iriarte^{a,b}

^aFundación para la Investigación y Docencia de las Enfermedades Cardiovasculares (FIDEC). Bilbao. Vizcaya.

^bEscuela Universitaria de Enfermería. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa. Vizcaya.

^cDepartamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa. Vizcaya.

^dServicio de Cardiología. Hospital de Basurto. Bilbao. Vizcaya. España.

El objetivo del presente trabajo ha sido la validación preliminar de un método inmunturbidimétrico para la determinación de apolipoproteínas (apo) B y A-I en sangre desecada en tarjeta. El método se basa en la técnica desarrollada por Bangert et al, adaptada a un autoanalizador Hitachi 911.

Se obtuvo un coeficiente de determinación entre la concentración de apo B en sangre desecada en tarjeta y en suero de 0,929. El coeficiente de variación interserial fue del 7,4% a 0,63 g/l y del 2,97% a 1,64 g/l (n = 9); mientras que el de variación intraserial fue del 6,7% a 0,58 g/l (n = 13). El coeficiente de determinación entre la concentración de apo A-I en sangre desecada en tarjeta y en suero fue de 0,892. Se obtuvo un coeficiente de variación intraserial del 5,8% a 0,86 g/l (n = 13) y un coeficiente de variación interserial del 3,9% a 0,97 g/l (n = 10).

Según estos resultados, se considera que la determinación de apo B y A-I en sangre desecada en tarjeta es fiable y que la medida de apo B se podría utilizar para el escrutinio de hipercolesterolemia familiar en niños.

Palabras clave:

Apolipoproteína A-I. Apolipoproteína B. Método inmunturbidimétrico.

QUANTITATION OF APOLIPOPROTEINS B AND A-I IN DRIED BLOOD SPOTS: A PRELIMINARY STUDY

The aim of the present study was to carry out a preliminary evaluation of an immunoturbidimetric method for measurement of apolipoproteins (apo) A-I and B in dried blood spots. The method used was based on the technique developed by Bangert et al, adapted to a Hitachi 911 autoanalyzer.

The coefficient of determination between concentrations of apo B in dried blood spots and serum was 0.929. The inter-assay coefficient of variation (CV) was 7.4% at 0.63 g/l and was 2.97% at 1.64 g/l (n = 9). The intra-assay CV was 6.7% at 0.58 g/l (n = 13). The coefficient of determination between concentrations of apo A-I in dried blood spots and serum was 0.892. The intra-assay CV was 5.8% at 0.86 g/l (n = 13) and was 3.9% at 0.97 g/l (n = 10).

These results indicate that measurement of apo B and apo A-I in dried blood spots is a reliable method, which could probably be used to screen for familial hypercholesterolemia in childhood.

Key words:

Apolipoprotein A-I. Apolipoprotein B. Immunoturbidimetric method.

Correspondencia: Dr. M. Lafita Bernar.
Calle Mayor 20, bis, entrpl.
48930 Las Arenas. Vizcaya. España.
Correo electrónico: mlafita@jet.es

Introducción

La aterosclerosis es un proceso continuo cuyas primeras etapas se inician en la niñez-adolescencia. Las lesiones iniciales (estrías grasas) se pueden encontrar en las aortas de niños de 3 años de edad y, una década más tarde, aparecen en las arterias coronarias¹. Se cree que las estrías grasas

son las precursoras de las lesiones ateroscleróticas más avanzadas (placas fibrosas). Más tarde, las placas fibrosas pueden producir síntomas de enfermedad coronaria al obstruirse progresivamente la luz arterial o, al provocar la formación repentina de un trombo, produciendo una obstrucción súbita. Por esta razón, parece apropiado que las medidas preventivas para dicha enfermedad comenzaran a aplicarse desde la infancia. En numerosos estudios se ha demostrado que uno de los factores de riesgo principales de enfermedad coronaria es la elevación de la concentración plasmática de colesterol ligado a lipoproteínas de baja densidad (cLDL). Para detectar alteraciones lipídicas en la infancia es necesario estimar el cLDL y determinar el colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad (cHDL), ya que si se utiliza la concentración de colesterol total como test de escrutinio podría haber diagnósticos incorrectos en relación con las concentraciones anormalmente elevadas o bajas de cHDL²⁻⁴. En diversos estudios se ha planteado que la determinación de las concentraciones de apolipoproteína (apo) B y apo A-I es un mejor discriminante de enfermedad coronaria que las de cLDL y cHDL. El riesgo de desarrollar una enfermedad coronaria aumenta con la concentración de apo B (apolipoproteína mayoritaria de las partículas LDL) y disminuye con la concentración de apo A-I (apolipoproteína mayoritaria de las partículas HDL). Se ha comprobado que la cuantificación del índice apo A-I/B posee un alto valor predictivo positivo a la hora de identificar a individuos jóvenes con un perfil lipídico desfavorable^{4,5}.

La determinación de apo B y apo A-I en sangre desecada en tarjeta se ha utilizado para programas de escrutinio neonatales de hipercolesterolemia familiar. Empleando un método manual inmunonefelométrico, Van Biervliet et al⁶ demostraron que es posible medir la apo B en sangre desecada en tarjeta. También se han utilizado técnicas como la inmunodifusión radial⁷, el enzoinmunoanálisis⁸ y la inmunoturbidimetría⁹. El presente trabajo, basado en el método inmunoturbidimétrico desarrollado por Bangert et al⁹ para la determinación de apo B en sangre desecada en tarjeta, se ha modificado con objeto de adaptarlo a nuestro laboratorio, determinar la apo A-I en el mismo extracto de sangre desecada que la apo B y calcular el índice apo A-I/B. Así se podrían disminuir los falsos positivos producidos por variaciones en el volumen de la muestra y el hematocrito^{2,6,10,11}. Los resultados obtenidos en sangre desecada se han comparado con los obtenidos en suero.

Material y métodos

Instrumentación

Se utilizó un autoanalizador de bioquímica Hitachi 911 (Roche Diagnostics, Basel, Suiza) con lectura a dos longitudes de onda. En el citado autoanalizador pueden programarse longitudes de onda para la lectura, volumen de muestra, volumen de reactivos (reactivos 1 y 2), tipo de calibración, número de calibradores, puntos de lectura, valor de los calibradores y unidades.

Reactivos

Para el método inmunoturbidimétrico en suero se utilizaron antisueros policlonales, calibradores y controles de Immunturb apo A-I direct e Immunturb apo B direct (Immuno S.A., Barcelona, España). Tanto los calibradores como los controles están preparados a partir de suero humano y se presentan liofilizados. El valor del calibrador de apo A-I está calibrado de acuerdo con la preparación de referencia apo A-I WHO-IFCC (SP1-01), y el valor del calibrador de apo B de acuerdo con la preparación de referencia WHO-IFCC (SP3-07).

Para el método de apo A-I y B en sangre desecada se utilizaron los mismos antisueros que para los métodos en suero; dicho antisuero se comercializa diluido con una solución de polietilenglicol 6.000. Los controles y calibradores se prepararon en nuestro laboratorio (véase más adelante).

Para preparar los calibradores, controles y muestras de sangre desecada se usaron tarjetas de papel de filtro de Schleicher & Schwell, referencia: 903 (Acefe S.A., Barcelona, España), que cumplen con las normas de la Food and Drug Administration. Los discos de sangre desecada en tarjeta de 3,2 mm de diámetro se perforaron con un perforador manual (McGill Co., Marengo, Ill, EE.UU.).

Método

A partir del método inmunoturbidimétrico desarrollado por Bangert et al⁹ para la determinación de apo B, y del método desarrollado por Lafita et al¹² para la determinación de apo A-I, se introdujeron modificaciones para adaptar los anteriormente descritos reactivos a un autoanalizador Hitachi 911.

Preparación de los calibradores y controles en sangre desecada en tarjeta. Para preparar los calibradores de apo B en sangre desecada, se seleccionaron 5 sueros con concentraciones de apo B desde valores bajos (0,33 g/l) a muy elevados (1,83 g/l), en intervalos proporcionales. Los sueros fueron valorados mediante la medición repetida (n = 10) de la concentración de apo B con un método comercial de apo B en suero (Immunturb apo B direct, Immuno S.A., Barcelona, España). Se excluyeron los sueros de pacientes con problemas hepáticos o concentración de triglicéridos superior a 2,26 mmol/l, ya que pueden producir interferencias por turbidez. Los 5 sueros seleccionados, con un rango entre 0,33 y 1,83 g/l, se mezclaron en proporción 1:1 con hemáties lavados con ClNa 0,9 g/l para asemejar sangre total. Una vez obtenidos los calibradores, se dispensaron 20 µl de cada uno de ellos en papel de filtro por triplicado, se dejaron secar a temperatura ambiente una noche y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Para su uso como controles se seleccionaron sueros que se mezclaron en proporción 1:1 con hemáties lavados, se dispensaron 20 µl por duplicado en papel de filtro y también se dejaron secar una noche a temperatura ambiente y se almacenaron a -20 °C.

Para preparar los controles y calibradores de apo A-I en sangre desecada, se seleccionaron controles y calibradores comerciales (Immunturb reference standard apo A-I Ref. 4700025 y

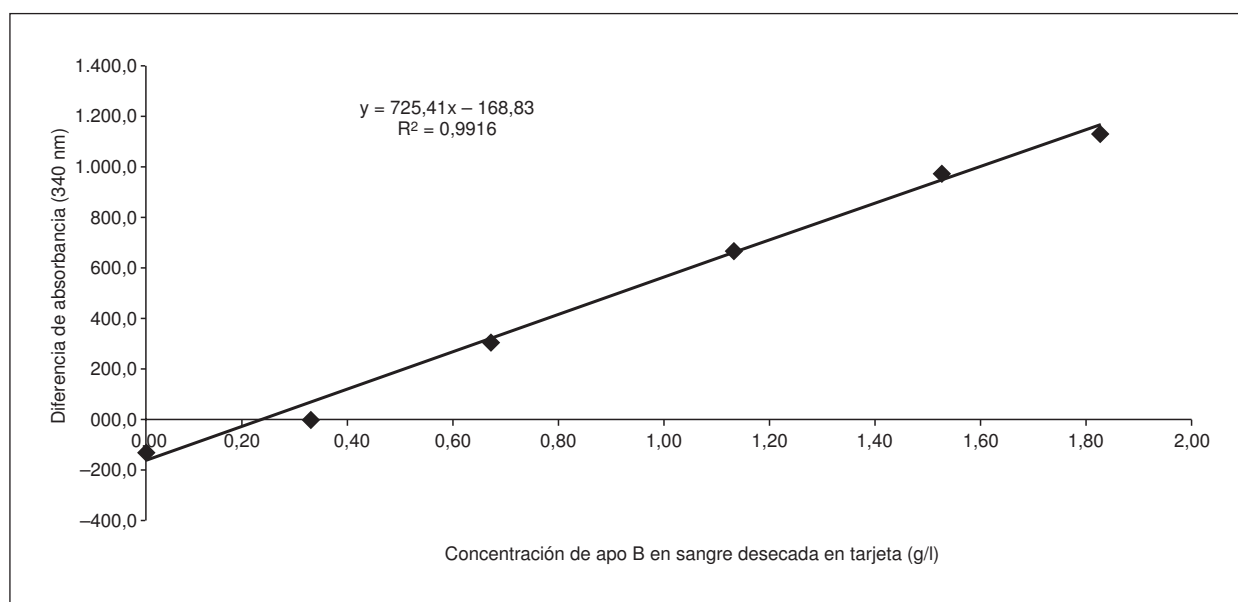


Figura 1. Curva de calibración en modo lineal de la apolipoproteína B en sangre desecada en tarjeta.

Norm control apoproteins Ref. 4977006, Immuno S.A.). El control comercial tiene una concentración de apo A-I de 0,98 g/l, y el calibrador, de 2,70 g/l. El calibrador se diluyó con PBS (Phosphate Buffered Saline, pH 7.4, 1% Bovine Serum Albumin, Sigma, St. Louis, Estados Unidos) para obtener un rango entre 0,49 y 2,70 g/l, y se mezclaron en proporción 1:1 con hematíes lavados para asemejar sangre total. Una vez obtenidos los calibradores y controles, se procedió como en el caso de la apo B.

Programación del Hitachi 911

–*Volumen de muestra.* El volumen de muestra utilizado para el método de apo B y apo A-I fue de 50 µl.

–*Volumen de antisuero.* Se utilizaron 200 µl para ambas determinaciones, siendo el mínimo posible en el autoanalizador cuando se utiliza un volumen de muestra de 50 µl.

–*Concentración del calibrador 1.* Se seleccionó el código 999 para ambos métodos, que equivale a una concentración de 0,00 g/l, ya que el instrumento dispensa agua destilada.

–*Concentración de los calibradores 2, 3, 4, 5 y 6.* Para la curva de calibración de apo B se utilizaron 5 calibradores con un rango entre 0,33 y 1,83 g/l, y un ajuste de la curva lineal. Para la curva de apo A-I se utilizaron 5 calibradores con un rango entre 0,49 y 2,70 g/l, y un ajuste de la curva *spline*.

–*Tipo de ensayo.* Para ambos métodos se eligió una lectura a dos puntos y obtención de la diferencia de absorbancias. Esto permite conseguir una lectura de la reacción inmunoturbidimétrica exacta (al hacerse un blanco de muestra más reactivo) y conseguir una lectura lo más amplia posible (diferencias de absorbancias mayores), ya que el segundo punto de lectura se aproxima al punto final de la reacción.

–*Longitudes de onda.* Lectura de la reacción con dos longitudes de onda. La longitud de onda primaria fue 340 nm, y la secundaria de 570 nm para compensar la hemoglobina presente en la reacción.

Procedimiento de trabajo.

Se perforaron discos (3,2 mm de diámetro) de los calibradores (por triplicado), controles y muestras a analizar (por dupli-

cado) en pocillos de una microplaca. Se añadieron 100 µl de eluyente (agua destilada) a cada pocillo de la microplaca y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Las tres eluciones de cada calibrador, control o muestra se transfirieron a un cubilete de muestras del autoanalizador y se agitaron levemente con un vórtex.

Procedimiento de evaluación

–*Imprecisión.* Para el método de apo B y de apo A-I en sangre desecada, se evaluó la repetibilidad intraserial a una concentración de una muestra de sangre desecada en tarjeta, depositando gotas independientes en 13 tarjetas. De cada tarjeta se perforó un disco, se obtuvieron los eluyentes y se determinaron la apo B y la apo A-I en una misma serie. La repetibilidad interserial se realizó a dos concentraciones en muestras de sangre desecada en tarjeta, depositadas en diferentes tarjetas y en 9 días diferentes (n = 9) para la apo B y en 10 días distintos (n = 10) para la apo A-I.

–*Comparación entre sangre desecada y suero.* Para el estudio del posible error sistemático de la medida de sangre desecada frente al suero se seleccionaron 24 muestras con un rango amplio de valores de colesterol total y cHDL. En cada muestra se determinaron la apo B y apo A-I en sangre desecada en tarjeta y en suero. Los métodos utilizados para la determinación de apo B y A-I en suero fueron Immunturb apo B direct e Immunturb apo A-I direct (Immuno S.A., Barcelona, España).

Análisis estadístico

En la comparación de los resultados obtenidos en sangre desecada en tarjeta y en suero se utilizó la correlación lineal simple, calculándose el coeficiente de determinación.

La valoración de la imprecisión intra e interserial se efectuó mediante el coeficiente de variación, expresado en porcentaje.

Resultados

En la figura 1 se muestra una curva de calibración típica de apo B en sangre desecada en tarjeta.

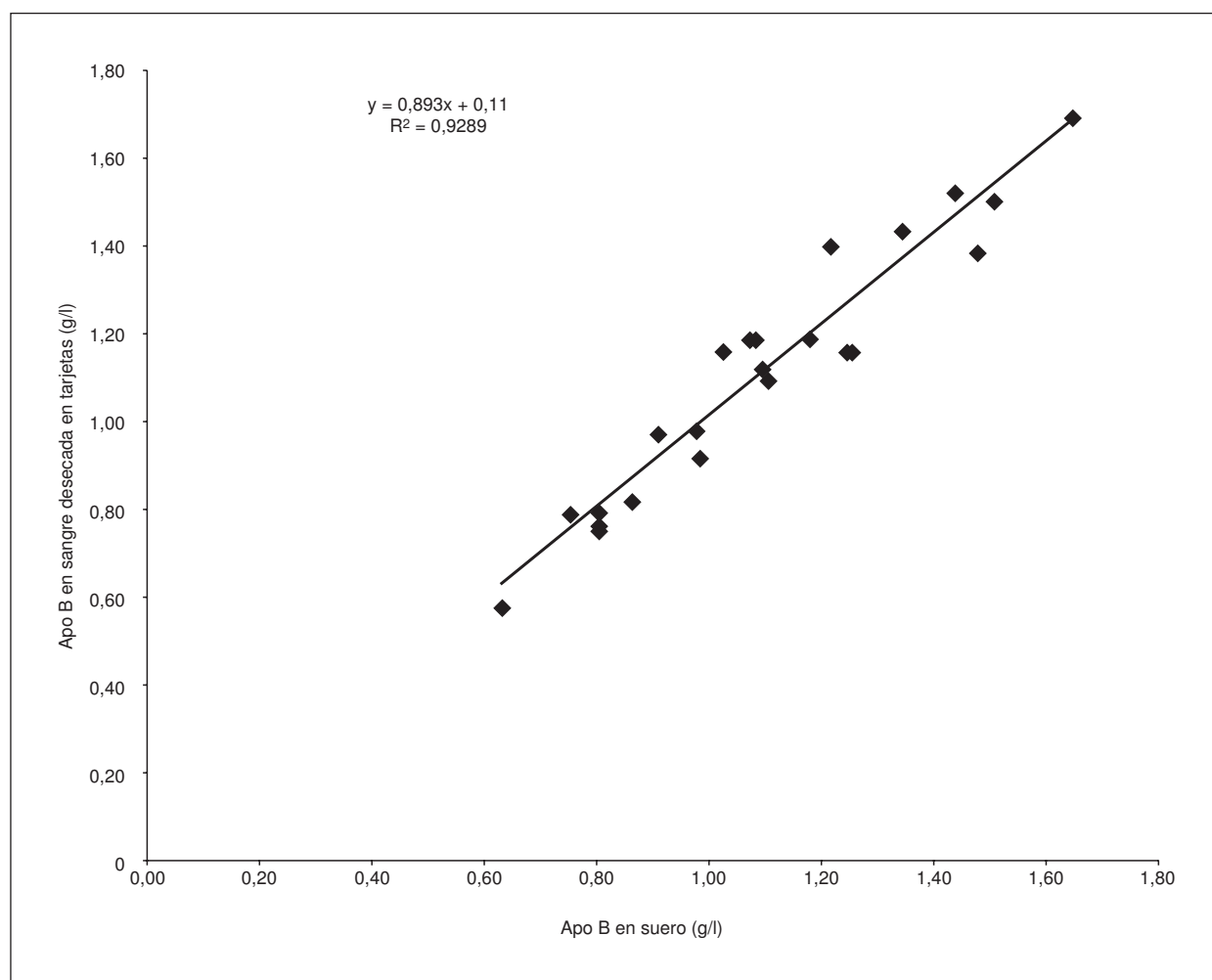


Figura 2. Correlación entre la concentración de apolipoproteína (apo) B en suero y en sangre desecada en tarjeta (n = 24).

En la figura 2 se ilustra la correlación entre la concentración de apo B en sangre desecada en tarjeta y en suero, observándose una ecuación: apo B (g/l) en sangre desecada = $0,893 \text{ apo B en suero} + 0,11$, con un coeficiente de determinación de 0,929; tanto la pendiente ($-0,166$ a $1,954$) como la ordenada en el origen ($-0,011$ a $0,23$) incluyeron 1 y 0, respectivamente, en sus intervalos de confianza del 95%. La imprecisión intraserial fue del 6,7% a $0,58 \pm 0,04 \text{ g/l}$ (n = 13), en tanto que la interserial fue del 7,4% a $0,63 \pm 0,05 \text{ g/l}$ y del 2,97% a $1,64 \pm 0,05 \text{ g/l}$ (n = 9).

En la figura 3 se muestra la curva de calibración de apo A-I en sangre desecada en tarjeta.

En la figura 4 se presenta la correlación entre la concentración de apo A-I en sangre desecada en tarjeta y en suero, observándose una ecuación: apo A-I (g/l) en sangre desecada = $1,008 \text{ apo A-I en suero} + 0,05$, con un coeficiente de determinación de 0,892; tanto la pendiente ($0,858$ a $1,158$) como la

ordenada en el origen ($-0,18$ a $0,29$) incluyeron 1 y 0, respectivamente, en sus intervalos de confianza del 95%. La imprecisión intraserial fue del 5,8% a $0,86 \pm 0,05 \text{ g/l}$ (n = 13), y la interserial fue del 3,9% a $0,97 \pm 0,04 \text{ g/l}$ (n = 10).

En la figura 5 se expone las correlaciones entre el índice de apo B/A-I en suero y en sangre desecada en tarjeta, observándose una ecuación: apo B/A-I (g/l) en sangre desecada = $0,914 \text{ apo B/A-I en suero} + 0,03$, con un coeficiente de determinación de 0,946, siendo los intervalos de confianza del 95% para la pendiente de $0,935$ a $1,071$ y para la ordenada en el origen de $0,062$ a $0,122$.

Discusión

En el método desarrollado por Bangert et al⁹, Wong et al¹¹ y Lafita et al¹², el antisuero (el mismo que el utilizado en el presente trabajo, aunque más concentrado) se preparaba diluyéndolo con PEG

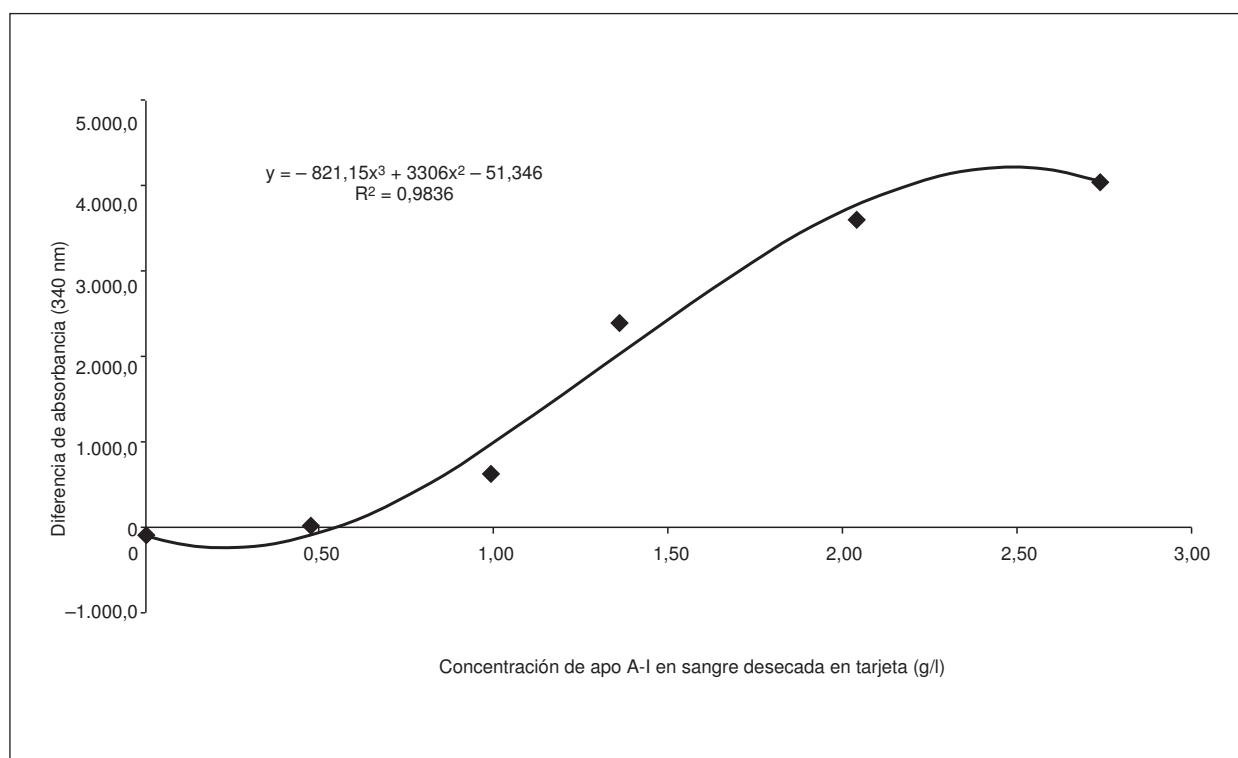


Figura 3. Curva de calibración en modo *spline* de apolipoproteína (apo) A-I en sangre desecada en tarjeta.

8.000, y el reactivo resultante era inestable. En nuestro caso, hemos utilizado el mismo antisuero, pero listo para su uso (Inmunoturb Direct). Esto nos ha permitido conseguir un mejor método, ya que no existía manipulación del reactivo y se obtenían señales más altas en las lecturas de las absorbancias. La elución de la muestra se realizó con 100 µl de agua destilada en vez de 200 µl, para aumentar la concentración de apo en la muestra. Los estudios de estabilidad e interferencias^{9,11,12} muestran que es importante cuidar el almacenamiento de las muestras de sangre desecada en tarjeta, ya que la apo B se degrada rápidamente a temperatura ambiente y con la humedad. La apo B se mantiene estable más de 15 días si las tarjetas se almacenan a 4 °C en una caja herméticamente cerrada con gel desecante de sílice. Durante el presente estudio utilizamos los mismos calibradores desecados en tarjeta, que permanecieron almacenados a -20 °C, y observamos que el tiempo máximo de almacenamiento no debe sobrepasar los 7 meses, ya que a partir de este tiempo se produce un deterioro de los calibradores y se obtienen concentraciones bajas de apo B y apo A-I. El método para la determinación de apo A-I parece más robusto, lo que podría deberse al antisuero, a medidas de concentración más elevadas o a la mayor estabilidad de la apo A-I.

El autoanalizador Hitachi 911 permite realizar lecturas a dos longitudes de onda (principal y secundaria) y efectuar un blanco de muestra; de esta forma se reducen las interferencias en los ensayos, como la producida por la hemoglobina. El objetivo es que la lectura de la reacción inmunturbidimétrica a 340 nm esté lo más libre posible de interferencias, es decir, que la señal que se está recogiendo sea producida por la reacción antígeno-anticuerpo, y no por un interferente de la reacción. Respecto a la medición de la reacción de apo B, se observó que durante aproximadamente las primeras 15 vueltas del rotor de cubetas, o bien no se producía reacción o bien ésta producía una señal decreciente. Por otra parte, la reacción continuaba de una forma progresiva hasta el tiempo máximo de lectura del autoanalizador (50 vueltas); por ello se eligió como primer punto de medida de absorbancia el 15 y como último, el 49. En el caso de la medición de la reacción de apo A-I, se eligió como primer punto de medidas de absorbancias el 8 y como último, el 40, ya que durante aproximadamente las 8 primeras vueltas del rotor de cubetas ocurrían hechos similares a los observados en la medición de la apo B.

El método descrito es menos laborioso y, por lo tanto, más practicable que la inmunodifusión radial, y probablemente de características similares a

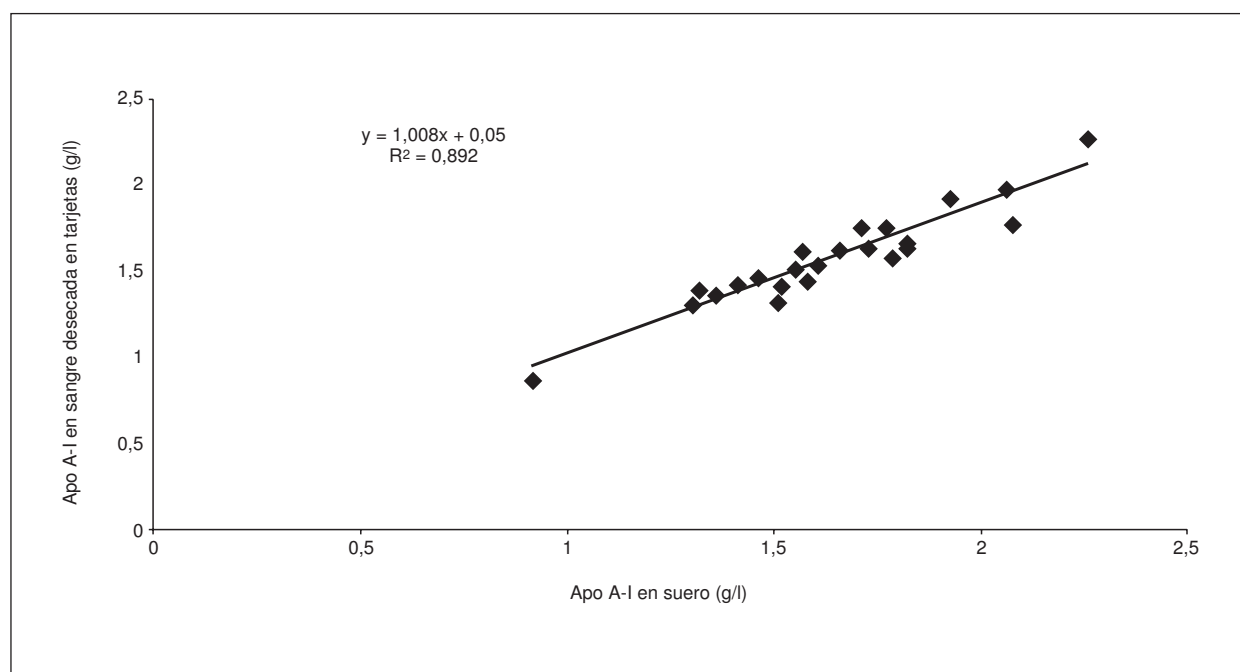


Figura 4. Correlación entre apolipoproteína (apo) A-I en suero y sangre desecada en tarjeta (n = 24).

los métodos inmunonefelométricos o de enzimo-inmunoanálisis. No obstante, con respecto a estos dos últimos métodos y al método inmunturbidimétrico utilizado previamente^{9,11,12}, se ha mejorado la

consistencia del reactivo, el cual viene listo para su uso, y se ha conseguido que disminuyan las interferencias por las posibilidades técnicas del autoanализador. Consideramos que los resultados en suero y

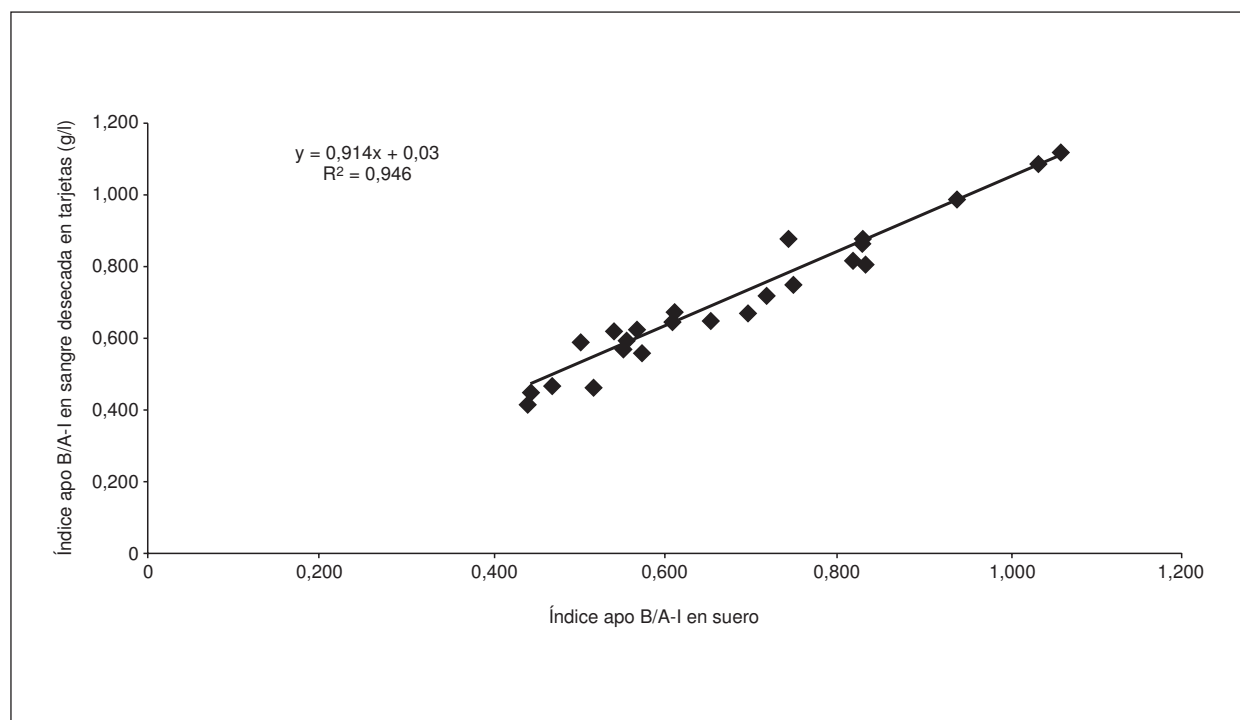


Figura 5. Correlación entre apolipoproteína (apo) B/A-I en suero y en sangre desecada en tarjeta (n = 24).

sangre desecada en tarjeta no son totalmente equiparables; aunque la correlación entre ambos métodos es buena, existen factores que afectan al método de sangre desecada en tarjeta y no al de suero como, por ejemplo, la hemólisis, la recuperación y estabilidad de las apo del papel de filtro, lecturas de absorbancias inferiores por el autoanalizador. De todas formas, a la espera de que se lleven a cabo estudios más exhaustivos del método, podemos concluir que los métodos inmunoturbidimétricos descritos para la determinación de apo B y apo A-I en sangre desecada en tarjeta son rápidos y fiables, y parece posible utilizarlos en cribados para detectar hipercolesterolemia familiar en niños.

Agradecimiento

Este trabajo ha podido realizarse gracias a las ayudas prestadas por la Fundación para la Investigación y Docencia de las Enfermedades Cardiovasculares (FIDEC) y la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (ref. UPV 078.352-EA 163/95).

Bibliografía

1. Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D'Armiento FP, Palinski W. Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: Fate of Early Lesion in Children (FELIC) Study. *Lancet* 1999;354:1234-41.
2. Skovby F, Micic S, Jepsen B, Larsen SO, Hansen B, Tegllund L, et al. Screening for familial hypercholesterolaemia by measurement of apolipoproteins in capillary blood. *Arch Dis Child* 1991;66:844-7.
3. Dennison BA, Kikuchi DA, Srinivasan SR, Webber LS, Berenson GS. Measurement of apolipoprotein B as a screening test for identifying children with elevated levels of low-density lipoprotein cholesterol. *J Pediatr* 1990;117:358-63.
4. Lynch JF, Marshall MD, Wang XL, Wilcken DE. Apolipoprotein screening in Australian children: feasibility and the effect of age, sex and ethnicity. *Med J Aust* 1998;168:61-4.
5. Srinivasan SR, Berenson GS. Serum apolipoprotein AI and B as markers of coronary artery disease risk in early life: the Bogalusa Heart study. *Clin Chem* 1995;41:159-64.
6. Van Biervliet JP, Vinaimont N, Caster H, Rosseneu M, Belpaire F. A screening procedure for dyslipoproteinemia in the newborn. Apolipoprotein quantification on dried blood spots. *Clin Chim Acta* 1982;120:191-200.
7. Dudman NP, Blades BL, Wilcken DEL. Enzyme-linked immunosorbent assay of apolipoprotein B in blood dried on filter paper—a potential screening method for familial type II hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta* 1985;149:117-27.
8. Wang XL, Dudman NP, Wilcken DEL. Enzyme-linked immunosorbent assay of apolipoprotein B in blood spotted onto filter paper, suitable for neonatal screening. *Clin Chem* 1989;35:1000-4.
9. Bangert SK, Eldridge PH, Peter TJ. Neonatal screening for familial hypercholesterolaemia by immunoturbidimetric assay of apolipoprotein B in dried blood spots. *Clin Chim Acta* 1992;213:95-101.
10. Wang XL, Wilcken DE, Dudman NP. Neonatal apo AI, apo B, and apo (a) levels in dried blood spots in an Australian population. *Pediatr Res* 1990;28:496-501.
11. Wong N, Beeso J, Sherwood RA, Peters TJ. An improved method for the quantitation of apolipoprotein B and apolipoprotein AI in dried blood spots. *Ann Clin Biochem* 1995;32:175-80.
12. Lafita Bernar M, Lafuente Urdinguio PJ, Sáez Meabe Y, Sáez de Lafuente Chivite JP, Narváez Gofinondo I, Baztán Alonso E. Determinación en neonatos de apolipoproteínas AI y B en sangre desecada en tarjeta. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1999;11:71-7.