

Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA LA DETECCIÓN DE NIVELES ELEVADOS DE LIPOPROTEÍNA (A): AUBIODOT LP (A)

Maritza B. Torres,¹ Flor de la C. Heres Álvarez,² Aida Rodríguez Hernández,³ Luis Sorell
Gómez⁴ y María B. Cabalé Vilariño⁵

RESUMEN

La lipoproteína (a) [Lp (a)] ha sido identificada como un factor de riesgo independiente de enfermedad vascular aterosclerótica (arterio-coronaria, cerebrovascular y vascular periférica), por lo que su determinación ha cobrado gran interés en los últimos años. En este trabajo se describen los resultados obtenidos con el uso de un inmunoensayo visual para la determinación de Lp(a): AuBioDOT[™] Lp(a) en comparación con un ELISA comercial: BioSCREEN[™] LP(a) (ambos desarrollados en el CIGB; Heber Biotec S.A). El AuBioDOT[™] Lp(a) es un ensayo sencillo y rápido; la correlación obtenida con respecto al BioSCREEN fue de $r=0,987$; la sensibilidad de 88,8 % y la especificidad de 100 %. En las 100 muestras estudiadas, la frecuencia de distribución de las concentraciones de Lp(a) mostró una desviación típica hacia la derecha similar a la reportada en otras poblaciones. Este estudio permitió considerar la utilidad del AuBioDOT[™] LP(a) como un método de pesquiasaje para identificar riesgo individual de forma rápida y económica.

Descriptores DeCS: LIPOPROTEINA(A)/sangre; INMUNOENSAYO/métodos; TEST DE ELISA/métodos.

La lipoproteína (a) [Lp (a)] es una lipoproteína similar a las de baja densidad (LDL) por la presencia de Apo B, pero estructuralmente caracterizada por la apoproteína (a) [apo (a)] la cual se une por

enlaces disulfuros a la apoproteína B-100 (apo B).¹⁻³

El interés clínico por la Lp (a) ha crecido notablemente en los últimos años ya que se ha demostrado que constituye un factor

¹ Licenciada en Bioquímica. Investigadora Agregada. ICCCV.

² Especialista de I Grado en Inmunología. ICCCV.

³ Ingeniera. Profesora Titular, Departamento de Matemática Aplicada. ISPJAE.

⁴ Doctor en Ciencias Médicas. Investigador Titular. IACV.

⁵ Estudiante Facultad de Biología. UH.

de riesgo independiente, de enfermedad vascular aterosclerótica. Elevadas concentraciones de Lp (a) están asociadas con un incremento en la incidencia y severidad de enfermedad de arterias coronarias, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica.^{2,4,5} Se reporta además que la Lp (a) constituye un factor de riesgo importante para la recurrencia clínica de reestenosis después de angioplastia coronaria e injertos aorto-coronarios. El grado de reestenosis está directamente asociado con los niveles de Lp (a).^{6,7}

Algunos autores han encontrado niveles elevados de Lp (a) en pacientes con diabetes mellitus y fallo renal, aunque el papel de la Lp (a) en estas enfermedades aún no está bien definido.^{8,9}

Se le atribuyen también a la Lp (a) propiedades trombogénicas, teniendo en cuenta la fuerte homología estructural de la apo (a) con el plasminógeno (proteína involucrada en la lisis de coágulos sanguíneos) y la posible competencia con sus activadores. Se considera que niveles elevados de Lp (a) pueden tener un efecto inhibitorio sobre los mecanismos fibrinolíticos.^{10,11}

El potencial aterogénico y trombogénico de Lp (a) ha constituido un desafío para los investigadores en la aplicación de nuevos métodos que permitan su determinación. Se han medido concentraciones de Lp (a) en suero o plasma mediante inmunodifusión radial,¹² electroinmunoensayo,¹³ inmunolectroforesis,¹³ nefelometría,¹⁴ radioinmunoensayo¹⁴⁻¹⁷ y ensayos inmunoenzimáticos.¹⁵⁻¹⁸ Entre estos, el método de ELISA (ensayo inmunoenzimático en fase sólida) basado en el uso de anticuerpos policlonales y/o monoclonales (AcM) ha tenido gran aplicación en la determinación de Lp(a), con una alta sensibilidad y especificidad.¹⁶⁻²⁰ Si

bien estas técnicas han probado su utilidad en la cuantificación de Lp (a), también requieren de tiempo, equipos y personal entrenado para su realización.

Por otra parte, la mayoría de los autores^{2,21,22} consideran que el grado de riesgo aterogénico se incrementa marcadamente a partir de concentraciones de Lp(a) por encima de 300 mg/L. Teniendo en cuenta este criterio algunos investigadores han propuesto el uso de métodos de pesquijaje para identificar el riesgo individual de forma rápida y económica a partir de este valor de corte.^{23,24}

Recientemente, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) ha desarrollado un inmunoensayo visual para la determinación de niveles elevados de Lp(a) en muestras de suero, plasma o sangre humana denominado AuBioDOT[™] Lp (a), el cual se realiza de forma rápida (30 minutos) y no requiere equipos de laboratorio ni personal especialmente entrenado.²⁵

En este trabajo se evalúan los resultados obtenidos en la detección de niveles elevados de Lp (a) con el AuBioDOT[™] Lp (a) mediante la comparación con un método cuantitativo (BioSCREEN[™] Lp(a), disponible comercialmente.²¹

MÉTODOS

Se estudiaron muestras de sueros de 100 sujetos procedentes de la fábrica «La Estrella» en Ciudad de la Habana, 64 mujeres y 36 hombres, con una edad promedio de 42 años (22 a 67 años).

Las muestras de sueros se obtuvieron a partir de sangre venosa periférica la cual fue centrifugada a 4000 x g por 10 minutos después de la coagulación a temperatura ambiente, y fueron guardadas a -20 grados Celcios hasta su posterior uso (por no más de un mes).

A todas las muestras se les determinó Lp(a) mediante el inmunoensayo AuBioDot y por una técnica de micro ELISA [BioSCREEN™ Lp(a)].

AUBIODOT™Lp(a)

Este inmunoensayo utiliza como soporte láminas blancas opacas de poliestireno cuyos pocillos están sensibilizados con un AcM anti-apo (a) como anticuerpo de captura que no tiene reactividad cruzada con el plasminógeno. La lámina sensibilizada se sumergió en buffer de lavado (PBS-tween 20 al 0,05 %) por 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 20 microlitros por pocillo de un suero patrón con una concentración de 300 mg/L, además un suero control de alta concentración de Lp(a) (900 mg/L) y un suero control de baja concentración de Lp(a) (100 mg/L). Paralelamente se añadieron 20 µL de cada una de las muestras de suero previamente diluídas (1 en 100) sobre el resto de los pocillos y las láminas se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS-tween 20 al 0,5 % se añadieron 20 µL de otro AcM anti-apo(a) conjugado con oro coloidal. Después de incubar (10 min) a temperatura ambiente y lavar, la reacción fue amplificada por la adición de una solución reveladora de iones de plata la que produce reacciones coloreadas insolubles de color pardo claro a oscuro metálico.

Los resultados se interpretaron por simple inspección visual de las áreas de reacción. La intensidad del color dependerá de la concentración de Lp(a) presente en las muestras. Para la clasificación de las muestras en positivas o negativas se comparó su intensidad de color contra la intensidad de color obtenida para el patrón; si la intensidad de color de la muestra era

igual o mayor a la del patrón la muestra fue considerada positiva ($= 300$ mg/L), y si la intensidad de color de la muestra fue menor a la del patrón entonces se consideró negativa (< 300 mg/L).

El resultado de cada muestra fue clasificado por 3 analistas de forma independiente; la coincidencia de al menos 2 de ellos sirvió como criterio final para la clasificación de las muestras en negativas o positivas.

Teniendo en cuenta la media de los 3 analistas se determinaron 4 categorías: 0, 0.33, 0.66, 1

0: Cuando 3 analistas clasificaron las muestras como “negativas”.

0.33: Cuando 2 analistas clasificaron las muestras como “negativas”.

0.66: Cuando 2 analistas clasificaron las muestras como “positivas”.

1.0: Cuando 3 analistas clasificaron las muestras como “positivas”.

ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE LP(A)

El BioSCREEN™ Lp(a) es un ELISA tipo *sandwich* para la determinación cuantitativa de Lp(a) en suero humano, basado en el empleo de un AcM anti-apo(a) como anticuerpo de captura y un AcM-anti apo B conjugado a la peroxidasa como anticuerpo detector. La técnica se realizó según lo propuesto por *Sorell et al.*²¹

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Se determinó la sensibilidad (S) y especificidad (E) del método según las siguientes fórmulas:

$S = \frac{\text{verdaderos positivos}}{\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}} \times 100$.

$E = \frac{\text{verdaderos negativos}}{\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$.

La correlación biserial (r_b) se utilizó para comparar una variable cualitativa dicotomizada (clasificada por AuBioDOT) con otra variable cuantitativa (concentración de Lp(a) por ELISA) y de esta forma conocer el grado de asociación entre los 2 métodos.²⁶

RESULTADOS

El análisis de 100 muestras de suero con el BioSCREEN Lp(a) permitió detectar 64 muestras con concentraciones de Lp(a) menores de 300 mg/L y 36 con concentraciones superiores. El histograma representa la frecuencia de distribución de la concentración de Lp(a) en estas muestras (fig.1).

En el análisis con el AuBioDOTtm Lp(a) se detectaron 32 muestras positivas y 68

negativas. Al compararlas con los resultados obtenidos por ELISA se encontró que 4 de las 68 muestras negativas por el método en estudio fueron positivas por el método de referencia, con concentraciones de Lp(a) de 302, 314, 331 y 366 mg/L respectivamente. Todas las muestras negativas por ELISA fueron también negativas por AuBioDOTtm Lp(a). A partir de estos resultados se obtuvo una sensibilidad del 88,8 % y una especificidad del 100 % del AuBioDOTtm Lp(a) para la detección de niveles elevados de Lp(a) (fig.2).

La figura 2 muestra el grado de asociación entre las determinaciones de Lp(a) por el ensayo tipo ELISA (BioSCREENtm Lp(a) y el inmunoensayo visual AuBioDOTtm Lp(a). La correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos fue de 0,987.

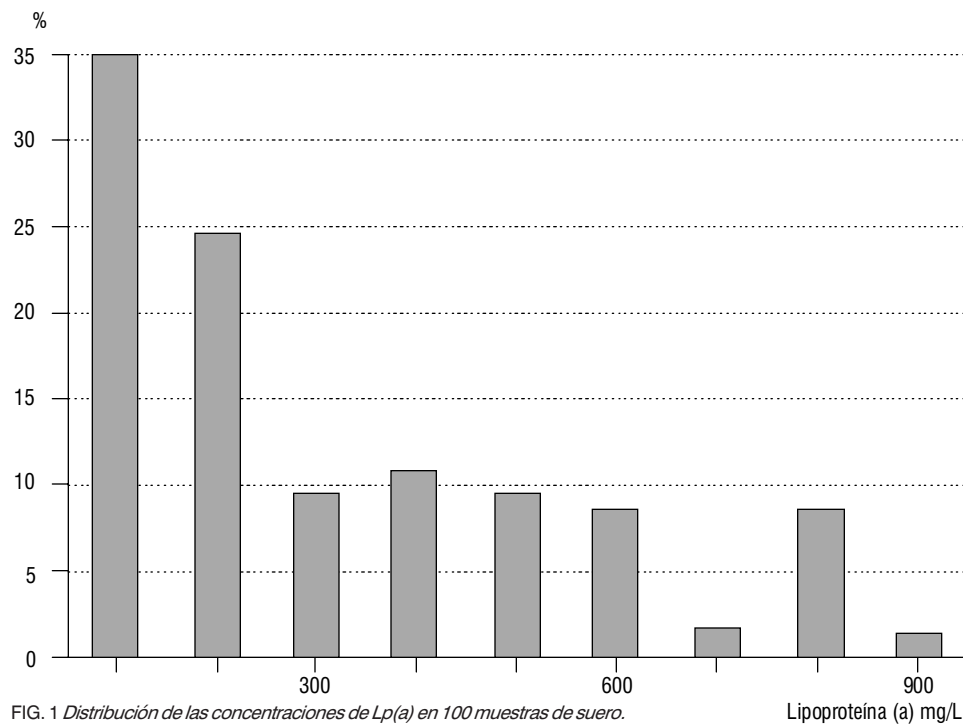


FIG. 1 Distribución de las concentraciones de Lp(a) en 100 muestras de suero.

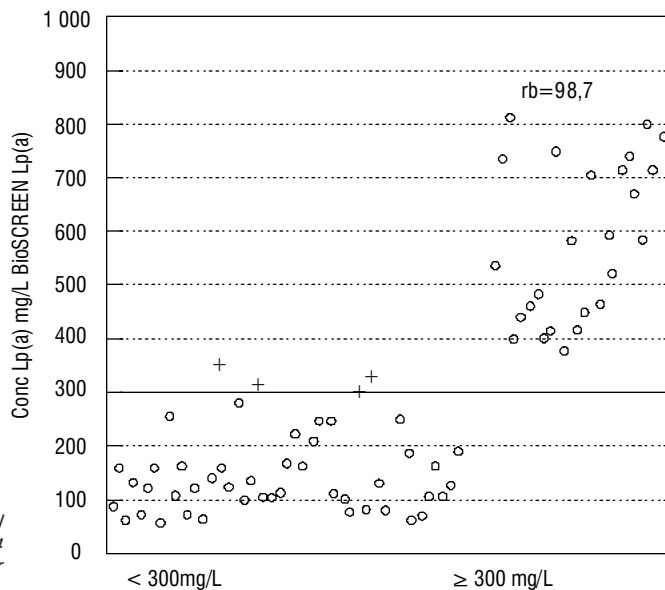


FIG. 2. Comparación del inmunoensayo visual y el ELISA. Los 4 falsos negativos están cerca del valor de corte (300 mg/L).

DISCUSIÓN

La distribución de los niveles de Lp(a) en muestras de suero refleja una desviación típica hacia la derecha donde las frecuencias más altas aparecen en los niveles más bajos. Este comportamiento es similar al observado en otras poblaciones.²² La sensibilidad obtenida, del 88,8 % (dada por los 2 resultados falsos negativos) pudiera ser explicada por el polimorfismo genético de la apo (a); de acuerdo con su masa molecular la concentración de Lp(a) puede ser sobreestimada o subestimada^{17,20,26} y la influencia de los diferentes fenotipos de apo (a) en los ensayos, depende de la combinación de anticuerpos utilizados en el sistema, así como de su especificidad.

El método de referencia BioSCREEN[™] Lp(a) es un ELISA basado en la combinación de un AcM anti-apo(a) y un AcM anti apo-B por lo que debe ser menos susceptible de

las variaciones individuales correspondientes al polimorfismo genético de la apo (a),²¹ que el AuBioDOT[™] Lp(a) evaluado en este trabajo, que utiliza dos AcM anti-apo(a) en su sistema.

También se debe tener en cuenta que las concentraciones de Lp(a) (302,314,331 y 366 mg/L respectivamente) que presentaban las 4 muestras consideradas negativas por el método en estudio y positivas por el método de referencia (falsos negativos) se encontraban cerca del valor de corte (300 mg/L).

El empleo de un suero patrón común para calibrar los sistemas y el estado de conservación de las muestras pueden explicar la alta correlación encontrada (rb=.987) entre los 2 métodos con principios diferentes.

El sistema AuBioDOT[™] Lp(a) tuvo una buena correlación con el método de referencia, una especificidad de 100 % y una sensibilidad de 88,8 %.

En resumen, el inmunoensayo visual basado en anticuerpos monoclonales para detectar niveles elevados de Lp(a) en suero humano, plasma o sangre, es confiable, fácil de realizar y ofrece sus resultados en menos de 30 minutos. Consideramos que el

AuBioDOT™ Lp(a) como sistema visual no instrumental, constituye una alternativa válida para identificar de forma rápida y económica un importante factor de riesgo individual de enfermedad vascular aterosclerótica en diferentes programas de salud.

SUMMARY

AS lipoprotein (a) [Lp(a)] has been identified as risk factor separate from vascular atherosclerotic disease (arterio-coronary, cerebrovascular and vascular peripheral), there has been a great interest in its determination during the last year. The results obtained with the use of a visual immunoassay for the determination of Lp (a): AuBioDOT™ Lp (a) as compared with a commercial ELISA: bioSCREEN LP(a) (both were developed at the CIGB; Heber Biotec S.A.) are described in this paper. The auBioDOT™ Lp(a) is a simple and fast assay. The correlation attained as regards the BioSCREEN was $r = 0.987$, the sensitivity was 88.8 %, and the specificity was 100 %. In the 100 studied samples the distribution frequency of the concentrations of Lp(a) showed a typical deviation towards the right similar to that reported in other populations. This study allowed to consider the usefulness of AuBioDOT™ Lp(a) as a screening method to find the individual risk in a fast and economic way.

Subject headings: LIPOPROTEIN (A), blood; IMMUNOASSAY/methods; ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY/methods.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Utermann G. The mysteries of lipoprotein (a). *Science* 1989;246:904-10.
2. Karmasny I, Gruener N. Structure and possible biological roles of Lp (a). *Clin. Biochem.* 1994;27: 151-62.
3. Morrisett JD, Guyton JD, Gaubatz JW, Gotto AM Jr. Lipoprotein (a): structure, metabolism and epidemiology. In: Gotto AM, ed. *Plasma lipoproteins*. Amsterdam: Elsevier Science Pub. BV, Chapter 4, 1987:129-52.
4. Hearn JA, De Macio SJ, Roubin GS, Hammarstrom M, Sgoutas D. Predictive value of lipoprotein (a) and other serum lipoproteins in the angiographic diagnostic of coronary disease. *Am J Cardiol* 1990;66:1176-80.
5. Nishino M, Ito T, Yasuno M, Nago N, Matsuo H, Goto T. Serum Lipoprotein (a) as a risk factor for thoracic atherosclerosis in subjects aged > 40 years. *Am J Cardiol* 1993;24:965-969.
6. Hoff HF, Beck G J, Skibinski CI, Vega G, Grayburn M, Serum Lp (a) levels as a predictor of vein graft stenosis after coronary artery bypass, surgery in patients. *Circulation* 1988;77:1238-44.
7. Desmarais RL, Sarembuck IJ, Ayers CR, Vernon SM, Powers ER, Gimble LW, Elevated Serum Lipoprotein (a). Is a risk factor for clinical recurrence after coronary balloon angioplasty?. *Circulation* 1995;91: 1403-09.
8. Haffner S. Lipoprotein (a) and diabetes. *Diabetes Care* 1993;16:835-40.
9. Irish AB, Simons LA, Saudie E, Hayes JM, Simons J, Lipoprotein (a) levels in chronic renal disease states, dialysis and transplantation. *Aust N Z J Med* 1992;22:243-48.
10. Hajjar KA, Gavish D, Breslow JL, Nachman RL. Lipoprotein (a) modulates endothelial cell surface fibrinolysis: Potential role in atherosclerosis. *Nature* 1989;339:302-35.

11. ||Leerink CB, Gimpel JA, Kortlandt W, Bouma BN, Van Rijn HJM. Kinetic analysis of Lp (a) inhibition of plasminogen activation by tissue plasminogen activator in vitro. *Fibrinolysis* 1991;5:233-38.
12. |Albers JJ, Hazzard WR. Immunochemical quantification of human plasma Lp (a) lipoprotein. *Lipids* 1974;9:15-27.
13. |Marz W, Grob W. Quantification of human serum lipoprotein Lp (a): Zone immunoelectrophoresis assay, a new sensitive method as compared to electroimmunoassay. *Clin Chim Acta* 1983, 134:265-79.
14. |Albers JJ, Adolphson JL, Hazzard WR. Radioimmunoassay of human plasma Lp (a) lipoprotein. *J Lipid Res.*1993,18:331-38.
15. Marz W, Siekmeier R, Gross E, Gorss W. Determination of lipoprotein (a): enzyme immunoassay and immunoradiometric assay compared. *Clin Chim Acta* 1993;214:153-63.
16. Marz W, Siekmeier R, Grob W, Kostner M. Determination of lipoprotein (a): Evaluation of three methods. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993;31:295-301.
17. Labeur C, Rosseneu M, Henderson O. International Lp (a) standarization. *Chem Phys, Lip.* 1994;67/68:265-70.
18. Wong W, Eaton D, Berlovi A, Frendly B, Hass PA. A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay of lipoprotein (a) *Clin Chem* 1990;36:192-97.
19. Labeur C, Michlels, Bury J, Usher D, Rosseneu M. Lipoprotein (a) quantified by an enzymelinked immunosorbent assay with monoclonal antibodies. *Clin Chem* 1989;35:1380-4.
20. Taddie-Peetrs W, Butman B, Jones G, Venetta TH, Ma Comber P, Ransom J. Quantitation of lipoprotein (a) particles containing various apolipoprotein (a) isoforms by a monoclonal anti-apo (a) capture antibody and a polyclonal anti-apolipoprotein B detection antibody sandwich anzyme immunoassay. *Clin Chem* 1993;39:1382-9.
21. Sorell L, Rojas G, Rodríguez M, Ramos C,Torres L, Torres MB. A sandwich ELISA based on anti-apo (a) and anti-apo B monoclonal antibodies for lipoprotein (a) measurement. *Clini. Chim. Acta* 1995;236:59-70.
22. Nago N, Kayaba K, Hiraoka J. Lipoprotein (a) levels in the japanese population: influence of age and sex and relation to atherosclerotic risk fators. *Am J. Epidemiol.* 1995;141:815-21.
23. Lippi G, Ruzzenente O, Facchinetti R, Guidi G. Semiquantitative latex method for lipoprotein (a) assay. *Clin Chem. Acta* 1994;229:147-51.
24. Mc Namara JR, Campos H, Adolphson J L, Albers JJ. Screening for lipoprotein (a) elevations in plasma and assessment of size heterogeneity using gradient gel electrophoresis. *J Lipid Res* 1989,30:747-55.
25. Sorell L, Rojas G. A simple visual inmunoassay for the rapid detection of high Lp(a) blood levels.*Clin Chim Acta.*1997,260:65-71.
26. Ostle B. Estadística aplicada: ed. Ciencia y Técnica. C. Habana, Cuba.1981:251-61.

Recibido:30 de marzo de 1998. Aprobado: 23 de julio de 1998.

Lic. *Maritza B. Torres*. Instituto de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Calle 17 No.702 entre Paseo y A. municipio Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.