

Evaluación de un nuevo método inmunonefelométrico para la determinación de proteína amiloide sérica A

M.L. Seco García, L. Borque De Larrea, F. Iguaz Pascual, M. Lammers¹, M. Caballero Ruiz

Resumen

Se ha evaluado el nuevo inmunoanálisis nefelométrico para la determinación cuantitativa de proteína amiloide sérica A, desarrollado por Dade Behring (Dade-Behring, Marburg, Alemania). El procedimiento se lleva a cabo de manera totalmente automática en el analizador nefelométrico BN II, con un intervalo analítico de 2,8 a 183 mg/L y límite de detección < 0,7 mg/L de proteína amiloide sérica A. Los coeficientes de variación obtenidos fueron $\leq 5,1\%$ en todos los casos. No se observó influencia del tipo de espécimen empleado (suero, plasma-heparina de litio o plasma-EDTA) sobre el valor de proteína amiloide sérica A. El procedimiento evaluado es lineal dentro del intervalo de medida y no presenta interferencias por turbidez, hemólisis, bilirrubina o factor reumatoideo. La comparación con un ELISA (Biotrin SAA-EIA (Biotrin International Ltd., Dublín, Irlanda)) mostró un coeficiente de correlación de 0,98, apreciándose la existencia de errores sistemáticos proporcionales aunque no constantes, probablemente debido a la diferente estandarización y, por lo tanto, diferentes valores de referencia de ambos métodos. El límite superior del intervalo de referencia (95 percentil) fue 7,4 mg/L. En conclusión, este nuevo método inmunonefelométrico puede considerarse un procedimiento adecuado para la medida fiable y precisa de proteína amiloide sérica A, con un amplio intervalo analítico y una alta detectabilidad. Sin embargo, presenta el inconveniente de necesitar un rotor de cubetas propio, que debe solventarse para favorecer la rápida implantación en laboratorios de rutina y urgencias.

Introducción

Las proteínas amiloides séricas A (SAA) constituyen una familia de apolipoproteínas que se sintetizan principalmente en el hígado, en respuesta a las citoquinas liberadas por los macrófagos tras un estímulo de fase aguda tal como una infección o daño físico (1).

Aunque se han encontrado un total de seis isoformas de SAA, la SAA1 y la SAA2, (SAA2 α y SAA2 β) son las que se hallan principalmente en el suero humano durante la inflamación, mientras que la SAA4 (también denominada SAA constitutiva o C-SAA) apenas varía a lo largo de este proceso (1, 2). Una vez liberada a la circulación, la SAA se asocia rápidamente

Summary

We have evaluated the new immunonephelometric assay for the quantitative determination of serum amyloid A, developed by Dade Behring (Dade Behring, Marburg, Germany). The assay is fully automated on the BN II nephelometer analyzer, with an analytical range from 2.8 to 183 mg/L and a detection limit < 0.7 mg/L. Coefficients of variation were $\leq 5.1\%$ in all cases. We observed no differences in serum amyloid A values between the different specimen types studied (serum, heparin or EDTA plasma). The assay is linear over the calibration range and has no interference from turbidity (triglycerides), haemolysis, icterus or rheumatoid factors. Comparison of the present method with a commercial ELISA (Biotrin SAA-EIA (Biotrin International Ltd., Dublin, Ireland)) showed a correlation coefficient of 0.98, and systematic proportional errors which might be due to the different method standardization and cut-offs. The upper limit of the reference interval (95th percentile) was 7.4 mg/L. In conclusion, we think that this new immunonephelometric procedure is a reliable method for serum amyloid A measurement, with a wide analytical range and a high sensitivity. However, it has the disadvantage to use a separate cuvette rotor, which must be solved to be implemented in routine or emergency laboratories.

te con la fracción HDL, pudiendo aumentar su concentración, durante las primeras 24-48 horas del estímulo agudo hasta más de quinientas veces, permaneciendo elevada mientras ocurre el proceso inflamatorio crónico (3, 4). En la mayoría de los casos, la concentración sérica de SAA correlaciona con la de proteína C reactiva (PCR), aunque la proteína amiloide alcanza valores mayores y puede responder más rápidamente (1, 3).

Estudios recientes han señalado la SAA como un marcador de fase aguda sensible, habiéndose aplicado en una variedad de procesos infecciosos (5, 6), cardiovasculares (7), reumáticos (8), digestivos (1) o renales (9). En estas investigaciones se han mostrado las dos principales características de la SAA: su síntesis inmediata tras el inicio del proceso inflamatorio (1, 5-9) y su amplio intervalo dinámico, lo que constituiría una gran ventaja sobre la PCR, sobre todo en patologías que cursan con una reacción inflamatoria menor (1, 3, 5).

Servicio de Análisis Clínicos. Complejo Hospitalario San Millán - San Pedro.
Logroño. La Rioja
¹Dade Behring Marburg GmbH.(Product Line Plasma Proteins).
Marburg. Alemania
Recibido: 2-8-00
Aceptado: 19-7-01

Abreviatura no estandarizada:
SAA: proteína amiloide sérica A

Estas importantes propiedades que presenta la SAA han propiciado el desarrollo de diferentes métodos para su cuantificación. Sin embargo, este proceso ha sido relativamente difícil, debido principalmente a la heterogeneidad de las propias partículas de lipoproteína, la insolubilidad en medio acuoso de las apolipoproteínas aisladas y a la variación de la expresión de sus epítomos bajo diferentes condiciones fisicoquímicas (2-4).

En el presente trabajo se ha evaluado el nuevo inmunoanálisis nefelométrico para la determinación cuantitativa de SAA, N Latex SAA, desarrollado por Dade Behring (Dade Behring, Marburg, Alemania), siguiendo las recomendaciones de la *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS).

Material y métodos

Especímenes

Los especímenes de sangre fueron centrifugados a 1200 g durante 10 minutos. Tras separar el suero o plasma y siguiendo las recomendaciones del fabricante, aquellas muestras que se analizaron durante los cinco días siguientes a su colección se guardaron a 4°C, mientras que los especímenes que se determinaron posteriormente se congelaron a -20°C hasta el momento de su análisis. Para evitar la producción de turbidez, las muestras que no fueron procesadas inmediatamente sólo se sometieron a un ciclo de congelación-descongelación.

Instrumentación

Los especímenes se procesaron en el analizador nefelométrico BN II (Dade Behring, Marburg, Alemania), el cual realiza las medidas mediante el método VlinIntegral. La fuente de luz consiste en un diodo emisor de luz de alto rendimiento, que emite a una longitud de onda de 840 ± 25 nm. El cambio de luz dispersada en un ángulo de 13-24°, ocurre en cubetas reutilizables insertadas en un rotor fijo, siendo detectado mediante un fotodiodo de silicio.

Reactivos

Se emplearon los reactivos N Latex SAA (Dade Behring, Marburg, Alemania), que constan del N Reactivo SAA (liofilizado de partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos de conejo contra SAA humana) y N Reactivo adicional SAA (solución tampón de glicina y cloruro de sodio a la que se le ha añadido pirrolidona y detergentes). Como calibrador se empleó el N Estándar SY-SAA y como material control el N Control SY-SAA (ambos pertenecientes a la casa comercial anterior y fabricados en base a sueros humanos con una concentración elevada de SAA). La estandarización se relaciona con el 1st International Standard 1997, Serum Amyloid Protein lot. No. 92/680 (10).

El procedimiento emplea también la solución amortiguadora de dilución (N Diluyente) y la solución de limpieza Cleaner SCS, ambas de Dade Behring.

Procedimiento de análisis

El análisis se desarrolló de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Automáticamente se pipetea en la cubeta de reacción 300 µL de N Diluyente, 30 µL del N Reactivo SAA, 60 µL de muestra (diluida al 1:400 con N Diluyente), 50 µL de N Reactivo SAA y 30 µL de N Reactivo adicional SAA. Tras agitación, la mezcla se incubó a 37°C durante 6 minutos.

Principio del método

Las partículas de poliestireno recubiertas con anticuerpos contra SAA humana se aglutinan al mezclarse con los especímenes que contienen SAA. La intensidad de la luz dispersada en el nefelómetro depende del contenido de SAA en la muestra, de tal forma que al compararse con los datos de la curva de calibración se obtiene la concentración de SAA de la muestra problema. La curva de calibración se prepara mediante siete diluciones del calibrador N-Estándar SY-SAA, concretamente desde 1:40 a 1:2560 en N-Diluyente y ajustada con una función log-logit. El método no muestra interferencia por la isoforma 4 de SAA.

Estudio de repetibilidad

La determinación de la imprecisión fue realizada para dos concentraciones diferentes de SAA. Se empleó tanto el reactivo control proporcionado por el fabricante, como una mezcla de sueros de pacientes. En el estudio intraserial, se analizaron por duplicado veinte alícuotas en una misma serie analítica. La repetibilidad interserial se evaluó analizando alícuotas de los mismos especímenes durante veinte días consecutivos.

Intervalo analítico

La linealidad se evaluó mediante la medida de diluciones consecutivas, con una solución de salino isotónico, de seis muestras de sueros con concentraciones elevadas de SAA.

Detectabilidad

Para establecer el límite de detección del procedimiento, se analizaron veinte replicados de un blanco de solución salina isotónica, calculándose la media y la desviación típica de las medidas de luz dispersada expresada en unidades nefelométricas arbitrarias.

Influencia del tipo de espécimen

Con el objetivo de evaluar la posible influencia de la naturaleza del espécimen empleado, se determinó la SAA en veinticinco muestras, constando cada una de ellas de un ejemplar de cada espécimen estudiado (suero, plasma-heparina de litio y plasma-EDTA). Las muestras mostraron valores de SAA abarcando todo el intervalo analítico.

Interferencias analíticas

Se estudió el efecto de cinco potenciales interferentes sobre la determinación de SAA. Para cada interferente, se mezclaron cuatro muestras que contenían diferentes cantidades del mismo, en proporciones constantes, con otros tantos especímenes que mostraron valores elevados de SAA pero mínimos de la sustancia interferente. En concreto, las interferencias evaluadas y los intervalos de concentraciones empleados fueron:

- Turbidez (triglicérido): 6,38 - 21,5 mmol/L
- Hemólisis (hemoglobina): 2 - 73 g/L
- Ictericia (bilirrubina): 101 - 410 µmol/L
- Factores reumatoideos: 257 - 2350 mUI/L.

Se consideró interferencia analítica significativa aquella que produjo un error sistemático mayor de tres veces la desviación estándar encontrada en el estudio de repetibilidad, lo que equivale en nuestro caso al 10% de la concentración de SAA.

Análisis de intercambiabilidad de los resultados

El método N Latex SAA fue comparado con un enzimoanálisis cuantitativo en fase sólida (Biotrin SAA-EIA

Tabla I. Estudio de imprecisión.

Imprecisión	Intraserial		Interserial		
	Nivel ^a	\bar{x} (mg/L)	CV ^b (%)	\bar{x} (mg/L)	CV (%)
1		15,1	2,8	14,3	4,3
2		98,1	2,7	98,2	5,1

^a 1: N SAA Control SY (Dade Behring, Marburg, Alemania); 2: Mezcla de sueros de pacientes.

^b: CV: Coeficiente de variación

Tabla II. Estudio de correlación entre el método evaluado (N Latex SAA) y un ELISA (Biotrin SAA-EIA).

Método x	Método y	n ^a	a ^b	I. C. (95%) ^c	b ^d	I. C. (95%) ^e	r
Biotrin SAA-EIA	N Latex SAA	60	0,29	-1,65 - 2,62	0,25	0,23-0,27	0,98

^aNº de muestras. ^bordenada en el origen. ^cintervalo de confianza (95% de probabilidad) de la ordenada en el origen. ^dpendiente. ^eintervalo de confianza (95% de probabilidad) de la pendiente.

(Biotrin International Ltd., Dublín, Irlanda)), específico para la SAA2 y SAA1 y que no muestra reactividad cruzada con SAA4. El procedimiento se basa en la adición secuencial de muestra, conjugado anticuerpo-enzima y sustrato a unas placas recubiertas con IgG (anti SAA1 y 2). La intensidad del color desarrollado es directamente proporcional a la cantidad de SAA1 y 2 que hay en la muestra. El intervalo del método es 0-1500 µg/L.

Para realizar el estudio comparativo, se emplearon 60 sueros, con valores de SAA que abarcaron todo el intervalo de medida del procedimiento N Latex SAA. Ninguna de las muestras mostró concentraciones importantes de los factores potencialmente interferentes.

Intervalo de referencia

Con los resultados obtenidos a partir de los sueros de 122 individuos sanos (donantes de sangre), se calculó el intervalo de referencia de la SAA. La población estudiada comprendió 73 hombres y 49 mujeres, con una media de edad de 42 años (intervalo: 18 – 63). Los valores aberrantes se eliminaron de acuerdo a las recomendaciones de la IFCC. El intervalo de referencia se estableció mediante el método del 95 percentil central. En cada muestra se determinó también la PCR (N Latex CRP mono (Dade Behring, Marburg, Alemania)), con el fin de evaluar el estado inflamatorio de estas personas. Sin embargo, el valor de esta magnitud no se tomó como criterio de selección.

Tratamiento estadístico

La linealidad del método se evaluó mediante regresión lineal entre los valores de SAA experimentales y los obtenidos teóricamente. La significación de las diferencias entre los valores de SAA hallados para los tres tipos de especímenes empleados, se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis. De forma similar a la llevada a cabo para el estudio de linealidad, la especificidad analítica se estudió, para cada potencial interferente evaluado, mediante regresión lineal entre los valores obtenidos y los teóricamente esperados para cada dilución realizada. La comparación entre métodos se estudió mediante el análisis de regresión no paramétrico de Passing y Bablok (11). En la comparación de resultados entre el grupo de hombres y mujeres se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La relación entre la edad y la concentra-

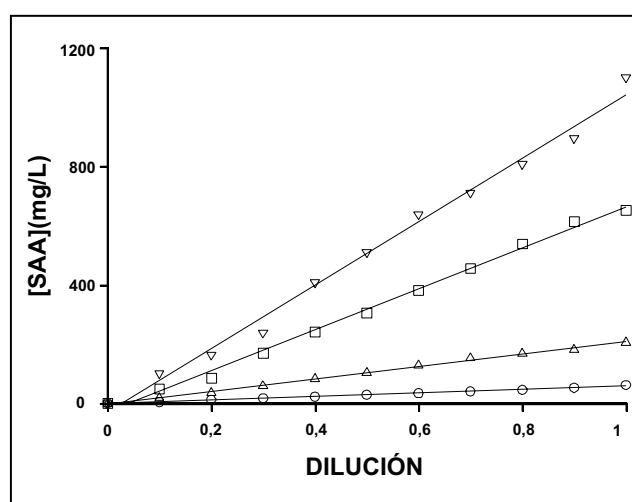


Figura 1. Estudio de linealidad. Curvas de regresión lineal obtenidas para cuatro muestras con concentraciones elevadas de SAA: ▽, [SAA] = 1100 mg/L; □, [SAA] = 653 mg/L; △, [SAA] = 205 mg/L; ○, [SAA] = 62 mg/L.

ción de SAA se estudió mediante regresión lineal. Se consideró significativa aquella $P < 0,05$.

Resultados

Estudio de repetibilidad

Los coeficientes de variación, tanto intra- como interseriales, para las dos concentraciones de SAA analizadas fueron $\leq 5,1\%$. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla I.

Intervalo analítico

El intervalo de medida se establece entre 2,8 y 183 mg/L para diluciones de las muestras de 1:400. Los especímenes con concentraciones de SAA inferiores o superiores a estos límites pueden ser reanalizados automáticamente mediante diluciones adicionales del suero a 1:100 ó 1:2000, pudiéndose ampliar así el intervalo analítico entre 0,7 y 915 mg/L.

El estudio de regresión lineal entre los valores de SAA experimentales y teóricos, mostró unos coeficientes de correlación ($r \geq 0,99$), en todos los casos. En la figura 1 se muestran los resultados de la evaluación de la linealidad de cuatro muestras.

Tabla III. Concentraciones de SAA y PCR en 122 muestras de suero de personas sanas

Magnitud	Intervalo ^a	\bar{x} ^a	\bar{s} ^a	Mediana ^a	P _{2,5}	P ₅₀	P ₉₅	P _{97,5}
SSA	<0,7 - 12,8	3,0	2,2	2,2	0,7	2,2	7,4	8,8
PCR	<3,5 - 7,8	<3,5	0,0	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5	<3,5

^amg/L

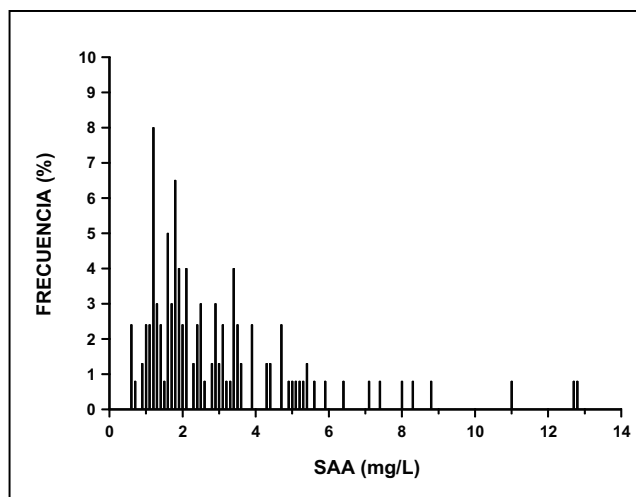


Figura 2. Distribución de frecuencias de los valores de SAA encontrados en el suero de 122 individuos sanos.

Detectabilidad

El límite de detección obtenido fue de 4,4 unidades nefelométricas arbitrarias. Este valor es significativamente menor que el correspondiente al punto más bajo de la curva de calibración (0,7 mg/L), por lo que el método evaluado permite la medida con seguridad de 0,7 mg/L de SAA.

Influencia del tipo de espécimen

El tipo de espécimen empleado (suero, plasma – heparina de litio o plasma – EDTA) no mostró influencia sobre el resultado de SAA, ya que no se encontraron diferencias significativas. *Interferencias analíticas.* Concentraciones de triglicérido hasta 21,5 mmol/L, hemoglobina hasta 73 g/L, bilirrubina hasta 410 μ mol/L y factores reumatoideos hasta 2350 mUI/L no afectaron a la determinación de SAA. En las muestras con valores elevados de triglicérido, no se apreciaron diferencias en los resultados de SAA tras su delipidación.

Análisis de intercambiabilidad de los resultados

Los resultados del estudio comparativo entre el procedimiento evaluado (y) y el método ELISA (x) se muestran en la tabla II. No se evidenciaron errores sistemáticos constantes significativos, aunque sí proporcionales.

Valores de referencia

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de suero de 122 individuos sanos se muestran en la tabla III y en la figura 2. El percentil 95 encontrado en este trabajo (7,4 mg/L de SAA) es ligeramente superior al proporcionado por la casa comercial (6,4 mg/L), mientras que el correspondiente a la PCR es menor en el presente estudio (<3,5 mg/L frente a 5,0 mg/L). Tanto para la SAA como para la PCR, los percentiles 2,5, 50 y 97,5 obtenidos en este estudio resultaron similares a los en-

contrados en la bibliografía (4). Los valores obtenidos resultaron independientes de la edad y el sexo.

Discusión

En el presente trabajo se ha evaluado un nuevo inmunoanálisis nefelométrico para la determinación cuantitativa de SAA (N Latex SAA (Dade Behring, Marburg, Alemania)), en el analizador BN II.

La imprecisión del método resultó adecuada, con coeficientes de variación $\leq 5,1\%$ en todo el intervalo analítico estudiado.

El procedimiento evaluado presenta una buena linealidad y sensibilidad, permitiendo detectar concentraciones de SAA hasta 0,7 mg/L.

Las características del procedimiento permiten utilizar indistintamente especímenes de suero o plasma (heparina de litio o EDTA), a la vez que pueden cuantificarse sin interferencias significativas muestras turbias (lipémicas), hemolizadas, ictericas o con elevadas concentraciones de factores reumatoideos.

Los resultados de SAA obtenidos con el método evaluado, correlacionan ($r = 0,98$) con los valores encontrados empleando un ELISA (Biotrin SAA-EIA (Biotrin International Ltd., Dublín, Irlanda)). Sin embargo, los parámetros de regresión lineal indican la existencia de errores proporcionales, que pueden ser atribuidos a la persistencia de diferencias en las características de los anticuerpos usados por los diferentes procedimientos y/o a diferencias en la estandarización de los mismos, lo cual queda reflejado en los diferentes intervalos de referencia de ambas técnicas. La inexistencia de un método de referencia para la medida de SAA impide calcular la verdadera inexactitud de cualquier procedimiento de medida.

El límite superior del intervalo de referencia (95 percentil) fue 7,4 mg/L de SAA. Este resultado está de acuerdo con los encontrados en la bibliografía (3, 4).

En conclusión, el método evaluado permite la medida rápida, fiable y precisa de SAA con un amplio intervalo analítico y una alta sensibilidad analítica. Sin embargo, presenta el inconveniente de la necesidad de utilizar un rotor de cubetas dedicado, ya que después de traspasar el valor establecido del ensayo en blanco, se deben cambiar las cubetas. Este proceso aumenta considerablemente el tiempo necesario para la obtención de resultados, dificultando su implantación, sobre todo en los laboratorios de urgencias, en los que no pueden realizarse todas las determinaciones de SAA en una misma serie analítica, sino que deben procesarse inmediatamente tras su recepción. La solución de este problema por parte del fabricante del procedimiento facilitará su empleo tanto en laboratorios de rutina como en urgencias.

Correspondencia
L. Borque de Larrea
Servicio de Análisis Clínicos.
Complejo Hospitalario San Millán -
San Pedro
C/ Autonomía de La Rioja, 3.
26003 Logroño. La Rioja

Bibliografía

1. Rau B, Steinbach G, Baumgart K, Gansauge F, Grünert A, Beger HG. Serum amyloid A versus C-reactive protein in acute pancreatitis: Clinical value of an alternative acute-phase reactant. *Crit Care Med* 2000; 28: 736-42.
2. McCormack CC, Hobson AH, Doyle S, Jackson J, Kilty C. Generation of soluble recombinant human acute phase serum amyloid A2(A-SAA2) protein and its use in development of an A-SAA specific ELISA. *J Immunol Methods* 1996; 198: 101-10.
3. Wilkins J, Gallimore JR, Tennet GA, Hawkins PN, Limburg PC, van Rijswijk MH et al. Rapid automated enzyme immunoassay of serum amyloid A. *Clin Chem* 1994; 40: 1284-90.
4. Ledue TB, Weiner DL, Sipe JD, Poulin SE, Collins MF, Rifai N. Analytical evaluation of particle-enhanced immunonephelometric assays for C-reactive protein, serum amyloid A and mannose-binding protein in human serum. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 745-53.
5. Nakayama T, Sonoda S, Urano T, Yamada T, Okada M. Monitoring both serum amyloid protein A and C-reactive protein as inflammatory markers in infectious diseases. *Clin Chem* 1993; 39: 293-7.
6. Casl T, Sabljari-Matovinovic M, Kovacevic S, Pocanic D, Preden-Kerekovic V, Jagarinec N. Clinical relevance of serum amyloid A protein monitoring in urinary tract infectious. *Ann Clin Biochem* 1993; 30: 272-7.
7. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342: 836-43.
8. Cunnane G, Grehan S, Geoghegan S, McCormack C, Shields D, Whitehead AS et al. Serum amyloid A in the assessment of early inflammatory arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 58-63.
9. Casl MT, Bulatovic G, Orlic P, Sabljari-Matovinovic M. The diagnostic capacity of serum amyloid A protein for early recognition of kidney allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 1901-4.
10. Poole S, Walker D, Gaines Das RE, Gallimore JE, Pepys MB. The first international standard for serum amyloid A protein (SAA). Evaluation in an international collaborative study. *J Immunol Methods* 1998; 214: 1-10.
11. Passing H, Bablok W. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *J Clin Chem Clin Biochem* 1983; 21: 709-20.