

Apolipoprotein B

Turbidimetry

Quantitative determination of apolipoprotein B (APO B) IVD

Store 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD¹

Turbidimetric test for the measurement of apolipoprotein B in human serum or plasma.

Anti- Apo B antibodies when mixed with samples containing Apo B, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the Apo B concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known Apo B concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE¹

Apo B is the major structural apolipoprotein in VLDL (Very Low Density Lipids), LDL (Low Density Lipids) lipoproteins and chylomicron. The most important function is the transport of rich triglycerides lipoproteins from liver and intestine to other tissues. Apo B exists in two forms: Apo B-100 and Apo B-48. Apo B-100, the most important component of LDL, is synthesized in the liver and excreted in plasma as part of VLDL. Apo B-48, the most important component of chylomicrons, is synthesized in the intestine.

Several studies demonstrated that in people with coronary heart disease (CHD), changes in the serum concentrations of Apo A-I and Apo B are similar to those for HDL and LDL, respectively and whereas, are somewhat better discriminators of people with CHD than the LDL and HDL cholesterol concentrations.

The hiperbetalipoproteinemia is characterized by increased LDL Apo B-100 concentrations with normal or moderately increased concentrations of LDL cholesterol. The ratio of LDL cholesterol to Apo B-100 is therefore reduced in these patients.

Defects in the Apo B structure or lipoproteins containing Apo B prevent the secretion of triglycerides rich intestinal and hepatic lipoproteins; this disorder occurs in abetalipoproteinemia or homozygous hypobetalipoproteinemia.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 100 mmol/L, PEG 4000, pH 7.2. Sodium azide 0,95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human Apo B, tris 100 mmol/L, pH 7.2. Sodium azide 0,95 g/L.
Optional	APO CAL ref: 93005

CALIBRATION

The assay and the value of the calibrator concentration have been standardized against the Certified Reference Material WHO/IFCC SP3-07 (CDC, USA). It is recommended the use of the APO CAL Calibrator for calibration.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340 nm filter.

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 2 weeks at 2-8°C or 3 months at -20°C.

The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
2. Assay conditions:

Wavelength : 340 nm
 Temperature : 37 °C
 Cuvette length path : 1cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.
4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1 (µL)	750
Sample or Calibrator (µL)	8

5. Mix and read the absorbance (A₁) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2 (µL)	250
-----------------	-----

7. Mix and read the absorbance (A₂) of calibrators and sample exactly 5 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{sample}}}{(A_2 - A_1)_{\text{calibrator}}} \times \text{Calibrator concentration} = \text{mg/dL Apo B}$$

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact Apolipoprotein Control (Ref.:93006) is available. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES⁵

Between 69 – 105 mg/dL.
 Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Linearity:** Up to 200 mg/dL (Nota 1), under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and retested again. The linearity limit depends on the sample / reagent ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.
2. **Detection Limit:** Values less than 0,52 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 280 mg/dL
4. **Sensitivity:** Δ 4,48 mA / mg/dL (107 mg/dL).
5. **Precision:**

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=10)			Inter-assay (n=5)	
	54,8	86,4	116,7	82,3	170,6
SD	0,45	0,6	1,4	0,65	1,10
CV	0,82	0,76	1,21	0,79	0,64

6. **Accuracy:** Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained with single radial immuno diffusion (SRDI) method. 50 samples ranging from 40 to 160 mg/dL of Apo B were assayed. The correlation coefficient (r) was 0,980 and the regression equation y = 0,927x +5,96.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (up to 500 mg/L), bilirubin (up to 40 mg/dL), and lipemia (up to 20 g/L), do not interfere. Other substances may interfere^{6,7}.

NOTES

1. Linearity depends on the calibrator concentration.
2. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Mahley RW et al. J Lipids Res 1984; 25: 1277-1294.
3. Brown MS et al. Science 1986; 232:34-47.
4. Freedman DS et al. N Eng J Med 1986; 315: 721-726.
5. Sakurabayashi I et al. Clinica Chimica Acta 2001; 312: 87-95.
6. Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 93011	Cont.	R1. Diluent: 1 x 45 mL
		R2. Antibody: 1 x 15 mL



Determinación cuantitativa de la Apolipoproteína B (APO B) IVD

Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL MÉTODO¹

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de la apolipoproteína B en suero o plasma humano.

Los anticuerpos anti-Apo B forman compuestos insolubles cuando se combinan con las Apo B de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de Apo B en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de Apo B de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLÍNICO¹

La Apo B es la principal apolipoproteína estructural asociada a las lipoproteínas de VLDL (Very Low Density Lipids), LDL (Low Density Lipids) y quilomicrones. Su función principal es la secreción de lipoproteínas ricas en triglicéridos desde el intestino y el hígado otros tejidos. La Apo B existe en dos formas distintas: Apo B-100, componente mayoritario de la LDL, sintetizada en el hígado y excretada en el plasma como parte de VLDL, y la Apo B-48, componente mayoritario de los quilomicrones y sintetizada en el intestino.

Estudios diversos, muestran que individuos con enfermedad coronaria (CHD) sufren cambios en las concentraciones de Apo A-I y Apo B, parecidas a los cambios de concentración de HDL y LDL. Además, la concentración de Apo A-I y Apo B son mejores indicadores que la concentración de LDL y HDL colesterol.

En la hiperbetalipoproteinemia, la concentración de LDL colesterol es normal o ligeramente baja, mientras que la concentración de Apo B-100 es significativamente elevada. La relación de la LDL colesterol y la Apo B-100 se reduce en estos pacientes.

Los defectos en la estructura de Apo B o las lipoproteínas que contienen Apo B impiden la secreción de las lipoproteínas intestinales y hepáticas ricas en triglicéridos. Esta dislipoproteinemia se denomina abetalipoproteinemia o hipobetalipoproteinemia homocigótica.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tris 100 mmol/L, PEG 4000, pH 7,2. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	IgG de cabra, anti-Apo B humana, tris 100 mmol/L, pH 7,2. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	APO CAL ref: 93005

CALIBRACIÓN

La sensibilidad de los reactivos así como el valor de concentración del calibrador están estandarizados frente al Material de Referencia Certificado WHO/IFCC SP3-07 (CDC, USA). Se recomienda el uso del Calibrador APO CAL para la calibración.

PREPARACIÓN

Reactivos: Listos para el uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: Presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.

- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatable a 37°C para lecturas a 340 nm.

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con heparina o EDTA como anticoagulantes.

Estable 2 semanas a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas.

No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

1. Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.

2. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura: 37°C

Paso de luz de la cubeta: 1 cm

3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1 (µL)	750
Muestra o Calibrador (µL)	8

5. Mezclar y leer la absorbancia (A₁) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2	250 µL
-------------	--------

7. Mezclar y leer la absorbancia (A₂) exactamente después de 5 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.

CÁLCULOS

(A₂-A₁)_{muestra}

_____ x concentración del Calibrador = mg/dL Apo B.

(A₂-A₁)_{calibrador}

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del Suero APO Control ref: 93006.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA⁵

Entre 69– 105 mg/dL.

Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. **Límite de linealidad:** hasta 200 mg/dL (Nota 1), en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con CINA 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.

2. **Límite de detección:** valores por debajo de 0,52 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

3. **Sensibilidad:** Δ 4,48 mA /mg/dL (107 mg/dL).

4. **Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta valores de 280 mg/dL.

5. **Precisión:**

Media (mg/dL)	Intraserie (n=10)			Interserie (n=5)	
		54,8	86,4	116,7	82,3
SD	0,45	0,6	1,4	0,65	1,10
CV	0,82	0,76	1,21	0,79	0,64

6. **Exactitud:** El comportamiento de este método fue comparado con un método de inmunodifusión radial (SRID). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas. 50 muestras de concentraciones de Apo B entre 40 y 160 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,980 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0,927x + 5,96$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (500 mg/dL) y lípidos (20 g/L), no interfieren. Otras sustancias pueden interferir⁶⁻⁷

NOTAS

1. La linealidad depende del valor de concentración del calibrador utilizado.

2. El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Mahley RW et al. *J Lipids Res* 1984; 25: 1277-1294.
3. Brown MS et al. *Science* 1986; 232:34-47.
4. Freedman DS et al. *N Eng J Med* 1986; 315: 721-726.
5. Sakurabayashi I et al. *Clinica Chimica Acta* 2001; 312: 87-95.
6. Young DS. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Pres, 1997.
7. Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACIÓN

Ref.: 93011

Cont.	R1. Diluyente: 1 x 45 mL
	R2. Anticuerpo: 1 x 15 mL