

Quantitative determination of apolipoprotein B (APO B) IVD

Store 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

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 tryglicerides 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 20 mmol/L, PEG , pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antibody (R2)	Goat serum, anti-human Apo B, tris 50 mmol/L, pH 7.5. 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. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every three weeks, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings. For monoreagent, a reagent blank should be run daily before sample analysis.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following APO CAL Calibrator dilutions in NaCl 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the Apo B calibrator by the corresponding factor stated in table bellow to obtain the Apo B concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

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 lighth path : 1cm

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

Reagent R1 (µL)	800
Sample or Calibrator (µL)	7

5. Mix and read the absorbance (A₁) after the sample addition.
6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2 (µL)	200
-----------------	-----

7. Mix and read the absorbance (A₂) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

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

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference (A₂-A₁) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the Apo B concentration of each calibrator dilution. Apo B concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A₂-A₁) in the calibration curve.

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. Measurement range: Up to 250 mg/dL, 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 1,91 mg/dL give non-reproducible results.

3. Precision: The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in an EP5-based study (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	23.92 mg/dL	59.08 mg/dL	119.07 mg/dL
Total	7.4%	4.3%	3.6%
Within Run	2.0%	1.4%	1.0%
Between Run	3.7%	2.2%	1.8%
Between Day	6.1%	3.4%	3.0%

4. Accuracy: Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained with a Daiichi immunoturbidimetric method. 48 samples ranging from 50 to 200 mg/dL of Apo B were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.965 and the regression equation $y = 0.996x + 5.112$. The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (20 g/L), bilirubin (40 mg/dL), lipemia (5 g/L), and rheumatoid factor (800 UI/mL) do not interfere. Other substances may interfere ^{6,7}.

NOTES

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.: 1003013

Cont.

R1. Diluent: 1 x 40 mL

R2. Antibody: 1 x 10 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 20 mmol/L, PEG pH 8.3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	IgG de cabra, anti-Apo B humana, tris 50 mmol/L, pH 7,5. 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. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada tres semanas, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia. En el caso de monoreactivo debe correrse un blanco de reactivo antes de las muestras.

PREPARACIÓN

Reactivos: Listos para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del Calibrador APO CAL en NaCl 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución de Apo B, multiplicar la concentración de Apo B del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0,25	0,5	0,75	1,0

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	800 µL
Muestra o Calibrador	7 µL

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

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2	200 µL
-------------	--------

7. Mezclar y leer la absorbancia (A₂) exactamente después de 2 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

Calcular la diferencia de absorbancias (A₂ - A₁) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de ApoB de cada dilución del Calibrador. La concentración de ApoB en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia (A₂ - A₁) en la curva de calibración.

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

Rango de medida: hasta 250 mg/dL, en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con NaCl 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.

Límite de detección: valores por debajo de 1,91 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

Precisión: El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	23.92 mg/dl	59.08 mg/dl	119.07 mg/dl
Total	7.4%	4.3%	3.6%
Within Run	2.0%	1.4%	1.0%
Between Run	3.7%	2.2%	1.8%
Between Day	6.1%	3.4%	3.0%

Exactitud: El comportamiento de este método (y) fue comparado con un método inmunoturbidimétrico de Daiichi. 48 muestras de concentraciones de Apo-B entre 50 y 200 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,965 y la ecuación de la recta de regresión y = 0.996 x + 5.112.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (20 g/L), lípidos (5 g/L) y factor reumatoide (800 UI/mL) no interfieren. Otras sustancias pueden interferir⁶⁻⁷

NOTAS

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.: 1003013

Cont. R1. Diluyente: 1 x 40 mL
R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL

Détermination quantitative de l'apolipoprotéine B (APO B) IVD

Conserver à 2 - 8°C.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE¹

Essai turbidimétrique pour la quantification d'apolipoprotéine B en sérum ou plasma humain.

Les anticorps anti-Apo B forment des composés insolubles quand ils sont associés avec les Apo B de l'échantillon du patient, occasionnant un changement d'absorption proportionnel à la concentration d'Apo B dans l'échantillon, et qui peut être quantifiée par comparaison avec un calibre d'Apo B de concentration connue.

SIGNIFICATION CLINIQUE¹

L'Apo B est la principale apolipoprotéine structurelle associée aux lipoprotéines de VLDL (Very Low Density Lipids), LDL (Low Density Lipides) et chylomicrons. Sa principale fonction est la sécrétion de lipoprotéines riches en triglycérides depuis l'intestin et le foie vers d'autres tissus. L'Apo B existe sous deux formes distinctes. Apo B-100 composant majoritaire de la LDL synthétisée dans le foie et excrétée dans le plasma comme partie de VLDL et l'Apo B-48, composant majoritaire des chylomicrons et synthétisée dans l'intestin.

Diverses études montrent que des individus avec une maladie coronaire (CHD) subissent des changements dans les concentrations d'Apo A-I et Apo B, semblables aux changements de concentration de HDL et LDL. En outre, la concentration d'Apo A-I et Apo B sont de meilleurs indicateurs que la concentration LDL et HDL cholestérol.

Dans l'hyperbétalipoprotéinémie, la concentration de LDL cholestérol est normale ou légèrement basse, tandis que la concentration d'Apo B-100 est nettement élevée. Le rapport de LDL cholestérol et l'Apo B-100 diminue chez ces patients.

Les défauts dans la structure d'Apo B ou les lipoprotéines qui contiennent de l'Apo B empêchent la sécrétion des lipoprotéines intestinales et hépatiques riches en triglycérides. Cette dislipoprotéinémie se nomme abétalipoprotéinémie ou hypobétalipoprotéinémie homozygotique.

RÉACTIFS

Diluant (R1)	Tampon tris 20 mmol/L, PEG pH 8,3. Azoture de sodium 0,95 g/L.
Anticorps (R2)	IgG de chèvre, anti-Apo B humaine, tris 50 mmol/L, pH 7,5. Azoture de sodium 0,95 g/L.
En option :	APO CAL réf : 93005

ÉTALONNAGE

La sensibilité des réactifs ainsi que la valeur de concentration du calibre sont standardisées face au Matériel de référence certifié WHO/IFCC SP3-07 (CDC, USA). Il est recommandé d'utiliser le calibre APO CAL pour l'étalonnage. Le réactif (aussi bien monoréactif que biréactif) doit être recalibré toutes les trois semaines, quand les contrôles sont en dehors des spécifications, et quand le lot de réactif ou la configuration de l'instrument change. Dans le cas de monoréactif il faut verser un blanc de réactif avant les échantillons.

PRÉPARATION

Réactifs : Prêt à l'usage.

Courbe d'étalonnage : Préparer les dilutions suivantes du calibre APO CAL dans NaCl 9 g/L comme diluant. Pour obtenir les concentrations de chaque dilution d'Apo B, multiplier la concentration d'Apo B du calibre par le facteur correspondant indiqué dans le tableau :

Dilution calibre	1	2	3	4	5	6
Calibre (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	90	75	50	25	-
Facteur	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

CONSERVATION ET STABILITÉ

Tous les composants du kit sont stables jusqu'à la date d'expiration quand les flacons sont gardés bien fermés à 2-8°C, et que la contamination est évitée au cours de leur utilisation. Ne pas utiliser de réactifs qui ont dépassé la date d'expiration.

Indicateurs de détérioration : La présence de particules et de turbidité.

Ne pas congeler, la congélation de l'anticorps ou du diluant peut affecter leur fonctionnalité.

MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

- Bain d'eau à 37°C.

- Spectrophotomètre ou photomètre avec cuvette thermostabilisable à 37°C pour des lectures à 340 nm.

ÉCHANTILLONS

Sérum ou plasma frais, recueilli avec héparine ou EDTA comme anticoagulants. Stable 2 semaines à 2-8°C ou 3 mois à -20°C.

Les échantillons avec des restes de fibrine doivent être centrifugés.

Ne pas utiliser d'échantillons fortement hémolysés ou lypémiques.

PROCÉDURE

1. Chauffer les réactifs et le photomètre (porte-cuvettes) à 37°C.

2. Conditions de l'essai :

Longueur d'onde : 340 nm

Température : 37°C

Passage de lumière de la cuvette : 1 cm

3. Régler le spectrophotomètre à zéro par rapport à l'eau distillée.

4. Introduire la pipette dans une cuvette :

Réactif R1	800 µL
Échantillon ou calibre	7 µL

5. Mélanger et lire l'absorption (A₁) après l'ajout de l'échantillon.

6. Introduire la pipette dans la cuvette tout de suite après :

Réactif R2	200 µL
------------	--------

7. Mélanger et lire l'absorption (A₂) exactement 2 minutes après avoir ajouté le réactif R2.

Spinreact dispose d'adaptations détaillées à la majorité des analyseurs automatiques du marché. Demandez des informations à votre distributeur.

CALCULS

Calculer la différence d'absorptions (A₂ - A₁) obtenues pour les différents calibres, et construire la courbe d'étalonnage des valeurs obtenues face aux concentrations d'Apo B de chaque dilution du calibre. La concentration d'Apo B dans l'échantillon est calculée par interpolation de sa différence (A₂ - A₁) dans la courbe d'étalonnage.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est conseillé d'utiliser des sérums de contrôle pour contrôler les essais aussi bien en procédure manuel qu'automatique. Spinreact dispose du Sérum APO Contrôle Réf : 93006.

Chaque laboratoire devrait établir son propre Contrôle de qualité et établir des corrections dans le cas où les contrôles ne sont pas conformes aux tolérances exigées.

VALEURS DE RÉFÉRENCE⁵

Entre 69 - 105 mg/dL.

Il est conseillé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

CARACTÉRISTIQUES DE LA MÉTHODE

1. **Plage de mesure :** jusqu'à 250 mg/dL dans les conditions décrites de l'essai. Les échantillons avec des valeurs supérieures doivent être dilués 1/5 avec NaCl 9 g/L et testés à nouveau. L'intervalle de mesure dépend du rapport échantillon/réactif. En réduisant le volume d'échantillon, on augmente la limite supérieure de l'intervalle de mesure, même si la sensibilité est réduite.

2. **Limites de détection :** les valeurs en dessous de 1,91 mg/dL entraînent des résultats peu reproductibles.

3. **Précision :** Le réactif a été testé pendant 20 jours avec trois niveaux de sérum différents dans une étude basée sur les normes EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	23,92 mg/dL	59,08 mg/dL	119,07 mg/dL
Total	7,4%	4,3%	3,6%
Pendant l'exécution	2,0%	1,4%	1,0%
Entre l'exécution	3,7%	2,2%	1,8%
Entre jours	6,1%	3,4%	3,0%

4. **Précision :** Le comportement de cette méthode (y) a été comparé avec une méthode immunoturbidimétrique de Daiichi. 48 échantillons de concentrations d'Apo B entre 50 et 200 mg/dL ont été analysés avec les deux méthodes. Le coefficient de régression (r) a été de 0,965 et l'équation de la droite de régression $y = 0,996x + 5,112$.

Les caractéristiques de la méthode peuvent varier selon l'analyseur utilisé.

INTERFÉRENCES

Bilirubine (40 mg/dL), hémoglobine (20 g/L), lipides (5 g/L) et facteurs rhumatoïdes (800 UI/mL), n'interfèrent pas. D'autres substances peuvent interférer⁶⁻⁷

REMARQUES

Le diagnostic clinique ne doit pas être réalisé uniquement avec les résultats d'un seul essai, il faut considérer en même temps les données cliniques du patient.

BIBLIOGRAPHIE

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

PRÉSENTATION

Réf : 1003013

Cont.

R1. Diluant : 1 x 40 mL

R2. Anticorps : 1 x 10 mL

Apolipoproteína B

Turbidimetria

Determinação quantitativa de Apolipoproteína B (APO B) IVD

Conservar a 2 – 8 °C.

PRINCÍPIO DO MÉTODO¹

Ensaio turbidimétrico para a quantificação de apolipoproteína B no soro ou plasma humano.

Os anticorpos anti-Apo B formam compostos insolúveis quando se combinam com as Apo B da amostra do doente, provocando uma alteração na absorvância proporcional à concentração de Apo B na amostra, e que pode ser quantificada por comparação com um calibrador de Apo B de concentração conhecida.

SIGNIFICADO CLÍNICO¹

A Apo B é a principal apolipoproteína estrutural associada às lipoproteínas VLDL (Very Low Density Lipids), LDL (Low Density Lipids) e quilomicros. A sua função principal é a secreção de lipoproteínas ricas em triglicérides desde o intestino e o fígado para outros tecidos. A Apo B existe em duas formas distintas: Apo B-100, componente maioritário da LDL, sintetizada no fígado e excretada no plasma como parte da VLDL, e a Apo B-48, componente maioritário dos quilomicros e sintetizada no intestino.

Diversos estudos mostram que indivíduos com doença coronária (CHD) sofrem alterações nas concentrações de Apo A-I e Apo B, parecidas às alterações de concentração de HDL e LDL. Adicionalmente, a concentração de Apo A-I e Apo B são melhores indicadores que a concentração de LDL e HDL colesterol.

Na hiperbetalipoproteinemia, a concentração de LDL colesterol está normal ou ligeiramente baixa, enquanto que a concentração de Apo B-100 está significativamente elevada. A proporção da LDL colesterol e Apo B-100 diminui nestes doentes.

Os defeitos na estrutura da Apo B ou das lipoproteínas que contêm Apo B, impedem a secreção das lipoproteínas intestinais e hepáticas ricas em triglicérides. Esta dislipoproteinemia denomina-se abetalipoproteinemia ou hipobetalipoproteinemia homocigótica.

REAGENTES

Solvente (R1)	Tris 20 mmol/L, PEG pH 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticorpo (R2)	IgG de cabra, anti-Apo B humana, tris 50 mmol/L, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	APO CAL ref: 93005

CALIBRAÇÃO

A sensibilidade dos reagentes assim como o valor de concentração do calibrador estão padronizados comparativamente ao Material de Referência Certificado WHO/IFCC SP3-07 (CDC, USA). É recomendável utilizar o Calibrador APO CAL para a calibração. O reagente (tanto monoreativo como bireativo) deve ser recalibrado a cada três semanas, quando os controlos estiverem fora de especificação e quando o lote de reagente ou a configuração do instrumento muda. No caso de monoreativo, deve correr-se um branco de reagente antes das amostras.

PREPARAÇÃO

Reagentes: Prontos a utilizar.

Curva de Calibração: Preparar as diluições seguintes do Calibrador APO CAL em NaCl 9 g/l como solvente. Para obter as concentrações de cada diluição de Apo B, multiplicar a concentração de Apo B do calibrador pelo fator correspondente indicado na tabela:

Diluição do calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (µL)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/l (µL)	100	90	75	50	25	-
Fator	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVAÇÃO E ESTABILIDADE

Todos os componentes do kit são estáveis até à data de validade indicada no rótulo do frasco quando os frascos são mantidos bem fechados a 2 - 8 °C e se evita a contaminação durante a sua utilização. Não utilizar reagentes que tenham excedido a data de validade indicada.

Indicadores de degradação: Presença de partículas e turvação.

Não congelar; a congelação do Anticorpo ou Solvente pode afetar a sua funcionalidade.

MATERIAL ADICIONAL

- Banho de água a 37 °C.
- Espectrofotómetro ou fotómetro com cubete termostaticável a 37 °C para leituras a 340 nm (320 - 360 nm).

AMOSTRAS

Soro ou plasma fresco, recolhido com heparina ou EDTA como anticoagulantes. Estável durante 2 semanas a 2 – 8 °C ou durante 3 meses a -20 °C.

As amostras com resíduos de fibrina devem ser centrifugadas.

Não utilizar amostras altamente hemolizadas ou lipémicas.

PROCEDIMENTO

1. Aquecer os reagentes e o fotómetro (porta-cubetes) a 37 °C.

2. Condições do ensaio:

Comprimento de onda: 340 nm
 Temperatura: 37 °C
 Caminho de luz da cubete: 1 cm

3. Ajustar o espectrofotómetro a zero com água destilada.

4. Pipetar numa cubete:

Reagente R1	800 µL
Amostra ou Calibrador	7 µL

5. Misturar e ler a absorvância (A₁) após a adição da amostra.

6. Imediatamente depois, pipetar na cubete:

Reagente R2	200 µL
-------------	--------

7. Misturar e ler a absorvância (A₂) exatamente 2 minutos após adicionar o reagente R2.

A Spinreact dispõe de adaptações detalhadas para a maioria dos analisadores automáticos do mercado. Solicite a informação ao seu distribuidor.

CÁLCULOS

Calcular a diferença de absorvâncias (A₂ - A₁) obtidas para os diferentes calibradores e construir a curva de calibração dos valores obtidos comparativamente às concentrações de ApoB de cada diluição do calibrador. A concentração de ApoB na amostra é calculada por interpolação da sua diferença (A₂ - A₁) na curva de calibração.

CONTROLO DE QUALIDADE

Recomenda-se utilizar soros controlo para controlar os ensaios tanto em procedimento manual como em automático. A Spinreact dispõe do Soro APO Control Ref: 93006.

Cada laboratório deve estabelecer o seu próprio esquema de Controlo de Qualidade e as ações corretivas no caso de os controlos não estarem de acordo com as tolerâncias exigidas.

VALORES DE REFERÊNCIA⁵

Entre 69 – 105 mg/dl.

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

1. **Intervalo de medição:** até 250 mg/dL, nas condições descritas do ensaio. As amostras com valores superiores devem ser diluídas 1/5 com NaCl 9 g/L e serem ensaiadas novamente. O intervalo de medição depende da proporção amostra/reagente. Diminuindo o volume da amostra, aumenta-se o limite superior do intervalo de medição, embora se reduza a sensibilidade.

2. **Limite de deteção:** valores inferiores a 1,91 mg/dL originam resultados pouco reprodutíveis.

3. **Precisão:** o reagente foi testado durante 20 dias com três níveis diferentes de soro num estudo baseado nas normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	23,92 mg/dL	59,08 mg/dL	119,07 mg/dL
Total	7,4%	4,3%	3,6%
Within Run	2,0%	1,4%	1,0%
Between Run	3,7%	2,2%	1,8%
Between Day	6,1%	3,4%	3,0%

4. **Exatidão:** o comportamento deste método (y) foi comparado com um método imunoturbidimétrico de Daiichi. 48 39 amostras com concentrações de Apo-B entre 50 e 200 mg/dl foram analisadas com ambos métodos. O coeficiente de regressão (r) foi de 0,965 e a equação da reta de regressão y = 0,996 x + 5,112.

As características do método variam de acordo com o analisador utilizado.

INTERFERÊNCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (20 g/L), lípidos (5 g/L) e fator reumatóide (800 UI/ml) não interferem. Outras substâncias podem interferir⁶⁻⁷

NOTAS

O diagnóstico clínico não deve realizar-se unicamente através dos resultados de um único ensaio, devendo considerar-se em simultâneo os dados clínicos do doente.

BIBLIOGRAFIA

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. AACR Pres, 1997.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACR Pres, 1997.

APRESENTAÇÃO

Ref.: 1003013

Cont.

R1. Solvente: 1 x 40 mL

R2. Anticorpo: 1 x 10 mL