

Quantitative determination of apolipoprotein A-II (APO A-II) IVD

Store 2 - 8°C.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Turbidimetric test for the measurement of apolipoprotein A-II in human serum or plasma.

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

CLINICAL SIGNIFICANCE¹

Lipoprotein consists of lipid and protein portions, and the protein portion is referred to as apolipoprotein.

Apolipoprotein A-II is known as the main structural protein of HDL (High Density Lipoprotein). In some cases, behavior of apolipoprotein A-II is different from that of apolipoprotein A-I, which is another main structural protein of HDL. Therefore, the ratio of A-I/A-II is drawing increasing attention.

REAGENTS

Diluent (R1)	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol buffer 100 mmol/L, pH 8.5. Macrogol
Antibody (R2)	Anti-human apolipoprotein A-II goat-polyclonal antibody
Optional	APO CAL ref: 93005

CALIBRATION

The assay and the value of the calibrator concentration have been standardized against an Internal Reference Material. 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 600 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 hemolized or lipemic samples.

PROCEDURE

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

Wavelength : 600 nm
 Temperature : 37 °C
 Cuvette lighth path : 1cm

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

Reagent R1 (µL)	300
Sample or Calibrator (µL)	5

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

Reagent R2 (µL)	100
-----------------	-----

- 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

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

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 25.1 – 34.5 mg/dL.

Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. Linearity: Up to 60 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 0.15 mg/dL give non-reproducible results.

3. Sensitivity: Apo A-II Calibrator 31.5 mg/dL = 5.94 ΔmA / mg/dL apo A-II.

4. Precision:

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=10)			Inter-assay (n=5)	
	26.7	40.0	53.7	35.2	43.3
SD	0.6	0.27	0.21	0.38	0.32
CV	2.40	0.67	0.39	1.1	0.7

5. Accuracy: Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained with single immunodiffusion method. 50 samples of Apo A-II were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.971 and the regression equation $y = 0.97x + 0.56$ for serum, and $r = 0.978$ $y = 1.02x - 0.22$ for plasma.

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

INTERFERENCES

Hemoglobin (up to 1000 mg/L), bilirubin (up to 40 mg/dL), and lipemia (up to 5%), do not interfere. Other substances may interfere^{6,7}.

NOTES

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

BIBLIOGRAPHY

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Rifai N. Arch Pathol Lab Med 1986; 110: 694-701.
- Norum RA et al. Precociuos Coronary Disease 1980; 306(25): 1513-1519.
- Freedman DS et al. N Eng J Med 1986; 315: 721-726.
- Sakurabayashi I et al. Clin Chim Acta 2001: 312: 87-59.
- Young DS. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 93015	Cont.	R1. Diluent: 1 x 45 mL
		R2. Antibody: 1 x 15 mL

Determinación cuantitativa de la Apolipoproteína A-II (APO A-II)

IVD

Conservar a 2 - 8°C.

PRINCIPIO DEL METODO

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de la apolipoproteína A-II en suero o plasma humano.

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

SIGNIFICADO CLINICO¹

La Lipoproteína está compuesta de lípidos y porciones de proteínas, en que la porción de proteína se denomina apolipoproteína.

La apolipoproteína A-II es conocida como la proteína estructural principal de HDL (lipoproteína de alta densidad). En algunos casos, el comportamiento de la apolipoproteína A-II es diferente de la de la apolipoproteína A-I, que es otra proteína estructural principal de HDL. Por lo tanto, la proporción de A-I / A-II está causando cada vez un mayor interés.

REAGENTS

Diluyente (R1)	Tampón 2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanediol 100 mmol/L, pH 8.5. Macrogol
Anticuerpo (R2)	Anticuerpo policlonal de cabra, Anti- Apo A-II humana
Opcional:	APO CAL ref: 93005

CALIBRACION

La sensibilidad de los reactivos así como el valor de concentración del calibrador están estandarizados frente a un Material de Referencia Interno. Se recomienda el uso del Calibrador APO CAL para la calibración.

PREPARACION

Reactivos: Listos para el uso.

CONSERVACION 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 termostatzable a 37°C para lecturas a 600 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: 600 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)	300
Muestra o Calibrador (µL)	5

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

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2	100 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.

CALCULOS

$$\frac{(A_2 - A_1)_{\text{muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{calibrador}}} \times \text{concentración del Calibrador} = \text{mg/dL Apo A-II.}$$

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 25.1 – 34.5 mg/dL.

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

CARACTERISTICAS DEL METODO

1. **Límite de linealidad:** hasta 60 mg/dL (Nota 1), en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con ClNa 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 0,15 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

3. **Sensibilidad:** Apo A-II Calibrador 31.5 mg/dL = 5.94 ΔmA / mg/dL Apo A-II.

3. **Precisión:**

Media (mg/dL)	Intraserie (n=10)			Interserie (n=5)	
	26.7	40.0	53.7	35.2	43.3
SD	0.6	0.27	0.21	0.38	0.32
CV	2.40	0.67	0.39	1.1	0.7

4. **Exactitud:** El comportamiento de este método fue comparado con un método de inmunodifusión radial. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas. 50 muestras de concentraciones de Apo A-II fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0.971 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0.97x + 0.56$ para suero, y $r = 0.978$ y $y = 1.02x - 0.22$ para plasma.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (1000 mg/dL) y lípidos (5%), 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.

BIBLIOGRAFIA

1. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Rifai N. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 694-701.
3. Norum RA et al. *Precocious Coronary Disease* 1980; 306(25): 1513-1519.
4. Freedman DS et al. *N Eng J Med* 1986; 315: 721-726.
5. Sakurabayashi I et al. *Clin Chim Acta* 2001; 312: 87-59.
6. Young DS. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Press, 1997.
7. Friedman and Young. *Effects of disease on clinical laboratory tests*, 3th ed. AACC Press, 1997.

PRESENTACION

Ref.: 93015

Cont.

R1. Diluyente: 1 x 45 mL

R2. Anticuerpo: 1 x 15 mL