

### Quantitative determination of apolipoprotein C-III (APO C-III) IVD

Store 2 - 8°C.

#### PRINCIPLE OF THE METHOD

Turbidimetric test for the measurement of apolipoprotein C-III in human serum or plasma.

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

#### CLINICAL SIGNIFICANCE<sup>1</sup>

The C apolipoproteins (C-I, C-II and C-III) are surface components of chylomicrons, VLDL and HDL. It appears that the liver is the major site of synthesis of the apo C proteins, with the intestine contributing a minor portion. Apo C-III is the most abundant apolipoproteins C in plasma ( $\approx 4$  mg/dL).

Apo C-III plays an important role in controlling plasma triglyceride metabolism and in determining the plasma concentration of potentially atherogenic triglycerides-rich lipoprotein (TRL). Plasma concentration of apo C-III is positively correlated with the level of plasma triglycerides, and apo C-III production is increased in patients with hypertriglyceridemia. Apo C-III gene polymorphisms are associated with increased levels of plasma apo C-III and hypertriglyceridemia. Liver perfusion studies have demonstrated that apo C-III inhibits the hepatic uptake of TRL and their remnants, and can inhibit the activity of both lipoprotein lipase and hepatic lipase. It therefore modulates the plasma catabolism and clearance of TRL. Statistically speaking, it is very important, as apo C-III is a significant independent predictor of the progression or severity of coronary artery disease.

#### REAGENTS

<b>Diluent (R1)</b>	Tris buffer 100 mmol/L, PEG 4000, pH 8.5. Sodium azide 0.95 g/L.
<b>Antibody (R2)</b>	Goat serum, anti-human Apo C-III, tris 100 mmol/L, pH 7.2. Sodium azide 0.95 g/L.
<b>Optional</b>	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 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 hemolized 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)	750
Sample or Calibrator (μL)	20

5. Mix and read the absorbance ( $A_1$ ) after the sample addition.
6. Immediately, pipette into de cuvette:

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

7. Mix and read the absorbance ( $A_2$ ) 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

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

#### 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 VALUES<sup>5</sup>

Between 5.5 – 9.5 mg/dL.

Each laboratory should establish its own reference range.

#### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Linearity:** Up to 22 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 0.5 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 55 mg/dL.
4. **Sensitivity:**  $\Delta$  44.8 mA / mg/dL (10.7 mg/dL).
5. **Precision:**

Mean (mg/dL)	Intra-assay (n=10)			Inter-assay (n=5)	
	6.9	9.7	25.6	7.2	9.0
SD	0.12	0.06	0.16	0.04	0.06
CV	1.72	0.61	0.63	0.5	0.6

6. **Accuracy:** Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained with single radial immuno diffusion (SRDI) method. 50 samples ranging from 3 to 12 mg/dL of Apo C III were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.975 and the regression equation  $y = 0.95x + 0.57$ .

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 20 g/L), do not interfere. Other substances may interfere<sup>6,7</sup>.

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

#### PACKAGING

Ref.: 93013	Cont.	R1. Diluent: 1 x 45 mL
		R2. Antibody: 1 x 15 mL

**Determinación cuantitativa de la Apolipoproteína C-III (APO C-III) IVD**

Conservar a 2 - 8°C.

**PRINCIPIO DEL METODO**

Ensayo turbidimétrico para la cuantificación de la apolipoproteína C-III en suero o plasma humano.

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

**SIGNIFICADO CLINICO<sup>1</sup>**

Las apolipoproteínas C (C-I, C-II y C-III) son componentes de la superficie de quilomicrones, VLDL y HDL. Se sintetizan mayoritariamente en el hígado y en pequeñas cantidades en el intestino. La apo C-III es la apolipoproteína más abundante en plasma (≈ 4 mg/dL), y su principal acción es el control del metabolismo de los triglicéridos y de las lipoproteínas potencialmente aterogénicas ricas en triglicéridos (TRL). La concentración plasmática de apo C-III así como su polimorfismo génico, correlaciona positivamente con el nivel de triglicéridos en el plasma, y la producción de apo C-III se incrementa en los pacientes con hipertrigliceridemia. Estudios de perfusión en el hígado muestran que la apo C-III inhibe la obtención de TRL hepática y sus remanentes

**REACTIVOS**

<b>Diluyente (R1)</b>	Tris 100 mmol/L, PEG 4000, pH 8,5. Azida sódica 0,95 g/L.
<b>Anticuerpo (R2)</b>	IgG de cabra, anti-Apo C-III humana, tris 100 mmol/L, pH 7,2. Azida sódica 0,95 g/L.
<b>Opcional:</b>	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 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)	20

5. Mezclar y leer la absorbancia (A<sub>1</sub>) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

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

7. Mezclar y leer la absorbancia (A<sub>2</sub>) 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**

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

**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 REFERENCIA<sup>5</sup>**

Entre 5.5–9.5 mg/dL.

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

**CARACTERISTICAS DEL METODO**

**1. Límite de linealidad:** hasta 22 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 0,5 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.

**3. Sensibilidad:** Δ 44,8 mA /mg/dL (10,7 mg/dL).

**4. Efecto prozona:** No se observa efecto prozona hasta valores de 55 mg/dL.

**5. Precisión:**

	Intraserie (n=10)			Interserie (n=5)	
Media (mg/dL)	6,9	9,7	25,6	7,2	9,0
SD	0,12	0,06	0,16	0,04	0,06
CV	1,72	0,61	0,63	0,5	0,6

**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 C-III entre 3 y 12 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,975 y la ecuación de la recta de regresión y = 0,95x +0,57.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

**INTERFERENCIAS**

Bilirrubina (40 mg/dL), hemoglobina (1000 mg/dL) y lípidos (20 g/L), no interfieren. Otras sustancias pueden interferir<sup>6-7</sup>

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

**PRESENTACION**

Ref.: 93013 Cont. R1. Diluyente: 1 x 45 mL  
R2. Anticuerpo :1 x 15 mL

