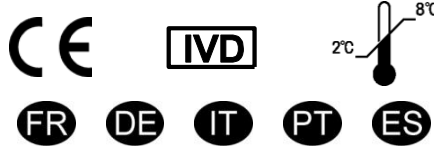



**Dosage immunoenzymatique pour la détermination
quantitative du taux de Lp-PLA₂ dans le plasma ou le sérum
humain**








www.plactest.com

diaDexus

 **diaDexus, Inc.**
349 Oyster Point Blvd.
South San Francisco, CA 94080 États-Unis
Tél. : 1-877-PLACTEST (1-877-752-2837)
Fax : 1-650-246-6499
www.plactest.com

EC REP mdi Europa GmbH
Langenhagener Str. 71
30855 Hannover-Langenhagen, Allemagne

Définition des symboles

REF	Numéro catalogue	IVD	Dispositif médical de diagnostic In vitro
PLATE	Microplaque recouverte d'anticorps	LOT	Lot
CAL	Calibreur		Date de péremption
CONTROL LOW	Contrôle bas		Conserver entre 2 et 8 °C
CONTROL HIGH	Contrôle haut		Irritant
WASH	Tampon de lavage		Consulter le mode d'emploi
CONJ	Conjugué		Fabricant
TMB	Substrat TMB	EC REP	Représentant agréé dans la Communauté européenne
STOP	Solution d'arrêt	CE	Conformité CE

Lire cette notice dans son intégralité avant d'utiliser le produit. Suivre attentivement les instructions lors de la réalisation des tests. Le non-respect des instructions risque de compromettre les résultats.

Ce produit est couvert par les brevets américains 5532152, 5641669, 5698403, 5847088, 5968818, 5981252, 6177257, 7045329, 7416853 et les brevets européens 658205 et 673426. Autres brevets sont en attente.

PLAC et PLAC sont des marques commerciales de diaDexus, Inc., société inscrite aux États-Unis.

Copyright © 2011 diaDexus, Inc. Tous droits réservés.

P/N 30035-05FR
2011-11-03

APPLICATION

Le kit ELISA PLAC[®] test de diaDexus est une méthode de dosage immunoenzymatique utilisée pour la détermination quantitative du taux de Lp-PLA₂ (lipoprotéine phospholipase A₂) dans le plasma ou le sérum humain, à utiliser avec l'évaluation clinique et l'évaluation des facteurs de risques chez le patient comme une aide dans le calcul du risque de maladie coronarienne et d'accident cérébrovasculaire ischémique associés à l'athérosclérose.

RESUME ET EXPLICATION

La Lp-PLA₂ est une sérine lipase indépendante du calcium associée au LDL (lipoprotéine de basse densité) et, dans une moindre mesure, au HDL (lipoprotéine de haute densité) dans le plasma et le sérum humain [1] et distincte des autres phospholipases (cPLA₂ et sPLA₂ par exemple) [2]. La Lp-PLA₂ est produite par les macrophages et d'autres cellules inflammatoires et elle se trouve exprimée de manière plus élevée dans les lésions athéromateuses avancées que dans les lésions de stade précoce [3,4]. Plusieurs résultats suggèrent que l'oxydation des LDL joue un rôle essentiel dans le développement et la progression de l'athérosclérose [5,6]. La Lp-PLA₂ joue un rôle dans la modification des LDL oxydés par hydrolyse de la phosphatidylcholine oxydée qui génère de la lysophosphatidylcholine et des acides gras libres oxydés, lesquels sont de puissants produits pro-inflammatoires qui contribuent à la formation de plaques athérosclérotiques [7,8,9]. La Lp-PLA₂ a révélé une légère variation intra et inter individuelle comparée à d'autres marqueurs lipidiques du risque cardiovasculaire et légèrement inférieure à la protéine C réactive (CRP). De plus, la concentration de Lp-PLA₂ n'est pas élevée dans les conditions inflammatoires systémiques et peut être un marqueur plus spécifique d'une inflammation vasculaire. La variation biologique relativement faible de la Lp-PLA₂ et sa spécificité sont utiles dans le dépistage et la surveillance du risque cardiovasculaire [10,11].

Des concentrations élevées de Lp-PLA₂, mesurées par dosage immunologique, ont été identifiées chez des patients atteints d'une maladie coronarienne confirmée par une angiographie par rapport à des sujets témoins de même âge [1]. Dans une étude rétrospective s'appuyant sur des échantillons de sujets de sexe masculin présentant une hypercholestérolémie (n=1740) provenant de l'étude WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study), un facteur de risque deux fois supérieur de maladie coronarienne a été observé chez les sujets se trouvant dans le quintile le plus élevé de niveaux de Lp-PLA₂ par rapport au quintile le plus bas [12]. De plus, l'association du risque de maladie coronarienne au taux de Lp-PLA₂ s'est avérée indépendante des LDL et des autres marqueurs de l'inflammation : CRP, numération des leucocytes et fibrinogène. Les auteurs de l'étude ont indiqué dans leur conclusion que des « Taux élevés de Lp-PLA₂ associée à une lipoprotéine semblent être un important facteur de risque coronarien, une découverte ayant des implications au niveau de l'athérogénèse et de l'évaluation du risque ». Dans un autre rapport s'appuyant sur des échantillons provenant de l'étude ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) qui a suivi 12 819 sujets de sexe masculin et féminin en bonne santé et d'âge moyen (45 à 64 ans) pendant six à huit ans, la concentration en Lp-PLA₂ s'est avérée être un important prédicteur de risque de maladie coronarienne. Chez les individus présentant un taux de LDL inférieur à 130 mg/dl, la Lp-PLA₂ était associée de manière significative et indépendante à un risque de maladie coronarienne deux fois plus élevé incluant le besoin de revascularisation, l'infarctus du myocarde et le décès suite à une maladie cardiaque [13].

L'étude ARIC a été réanalysée pour déterminer le risque d'accident cérébrovasculaire associé à des concentrations élevées de Lp-PLA₂. Un total de 223 accidents cérébrovasculaires a été identifié dans le groupe d'étude, dont 194 (87 %) accidents cérébrovasculaires ischémiques associés à une athérosclérose, selon la classification adoptée par les investigateurs de l'étude ARIC. Cette proportion d'accidents cérébrovasculaires ischémiques par rapport au nombre total d'accidents cérébrovasculaires est cohérente avec le pourcentage trouvé chez la population générale [14]. Les résultats de cette étude ont montré que la Lp-PLA₂ était un puissant prédicteur de risque pour les accidents ischémiques cérébraux, avec un risque pratiquement deux fois plus élevé, même après l'ajustement de la pression artérielle, des lipides, du diabète, de l'indice de masse corporelle et des autres marqueurs inflammatoires [15].

PRINCIPE DU TEST

Le kit ELISA PLAC[®] test de diaDexus est un dosage immunoenzymatique de type « sandwich » qui utilise deux anticorps monoclonaux hautement spécifiques pour la mesure directe de la concentration de Lp-PLA₂ dans le plasma ou le sérum humain. Le système de dosage utilise un premier anticorps monoclonal anti-Lp-PLA₂ (2C10) dirigé contre la Lp-PLA₂ pour une immobilisation sur phase solide sur la microplaque. L'échantillon est ajouté sur la plaque et incubé pendant 10 minutes entre 20 et 26 °C. Un deuxième anticorps monoclonal anti-Lp-PLA₂ (4B4) marqué à la peroxydase de raifort (HRP) est ensuite ajouté et réagit avec l'antigène immobilisé, entre 20 et 26 °C pendant 180 minutes, provoquant ainsi la capture des molécules Lp-PLA₂ entre la phase solide et les anticorps marqués par l'enzyme. Les puits sont ensuite lavés avec le tampon fourni pour éliminer toute trace

d'antigène libre. Le substrat, le tétraméthylbenzidine (TMB), est ensuite ajouté et incubé pendant 20 minutes entre 20 et 26 °C, ce qui provoque l'apparition d'une couleur bleue. La réaction colorée est stopée par l'ajout de la solution d'arrêt entraînant l'apparition d'une coloration jaune. L'absorbance liée à l'activité enzymatique sur le substrat est déterminée par spectrophotométrie d'absorption à 450 nm et est directement proportionnelle à la concentration de Lp-PLA₂ présente. Un jeu de calibres de Lp-PLA₂ est utilisé pour tracer une courbe d'absorbance standard en fonction de la concentration de Lp-PLA₂ qui permettra de déterminer la concentration de Lp-PLA₂ présente dans l'échantillon à doser. Deux niveaux de contrôle sont fournis afin de valider la performance dans la plage clinique du dosage.

REACTIFS ET MATERIAUX

Matériaux fournis avec le kit : (contenu suffisant pour 96 puits)

REFERENCE	SYMBOLE	DESCRIPTION DU COMPOSANT	QUANTITE
60001	PLATE	Microplaque recouverte d'anticorps Microplaque recouverte d'anticorps monoclonaux murins anti-Lp-PLA ₂ (2C10)	1
60006	CAL	Calibres	1 jeu,
60007		(0, 50, 100, 250, 500 et 1 000 ng/ml)	0,25 ml
60008		antigène Lp-PLA ₂ recombiné de	dans
60009		diaDexus (DDX-RA) dans un diluant	chaque
60010		stabilisateur de protéines	
60011			
60002	WASH	Tampon de lavage 20X Détergent non-ionique dans une solution tampon	50 ml
60003	CONJ	Conjugué Anticorps monoclonal anti-Lp-PLA ₂ murin (4B4) conjugué à de la peroxydase de raifort dans un réactif tampon avec des protéines-support bovines et murines	23 ml
60004	TMB	Réactif TMB 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine dans un tampon légèrement acide	11 ml
60005	STOP	Solution d'arrêt 1N HCl	11 ml
65009	CONTROL LOW	Contrôle bas (~150 ng/ml) antigène Lp-PLA ₂ recombiné diaDexus (DDX-RA) dans une matrice tampon liquide de protéines (BSA)	1 flacon, 0,5 ml
65010	CONTROL HIGH	Contrôle haut (~350 ng/ml) antigène Lp-PLA ₂ recombiné diaDexus (DDX-RA) dans une matrice tampon liquide de protéines (BSA)	1 flacon, 0,5 ml
FMD-01-026		Certificat d'analyse – Plage de contrôle Les plages de contrôle pour le lot sont indiquées sur le Certificat d'analyse	1 de chaque

Matériaux nécessaires mais non fournis :

- Pipettes de précision mono-canal et multi-canaux : 0,02, 0,10, 0,20 ml
- Embouts de pipette jetables (un nouvel embout de pipette doit être utilisé pour chaque ajout d'échantillons ou de réactifs différents durant la procédure de dosage)
- Agitateur vortex ou équivalent
- Eau désionisée
- Lecteur de microplaque à bande passante de 10 nm ou moins, et une plage de densité optique (D.O.) de 3 ou plus à 450 nm
- Logiciel capable d'un ajustement de courbe point à point pour calculer la concentration de la substance à analyser à partir de la densité optique (optionnel)

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

- Réservé au diagnostic *In Vitro*.
- Manipuler les échantillons de sang comme des substances présentant un risque biologique potentiel.
- Les échantillons peuvent rester à température ambiante pendant 6 heures maximum (en comptant le délai requis pour effectuer la prise de sang, traiter, transporter et analyser l'échantillon en laboratoire). Ceci ne comprend pas l'incubation sur la plaque ELISA.
- La conservation des échantillons à une température de -20 °C pendant plus de 24 heures est déconseillée.
- Des précautions d'emploi sont indiquées sur certains éléments. Voir la section des informations relatives à la sécurité du produit.
- Eliminer les réactifs conformément à la réglementation en vigueur.
- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.
- Ne pas mélanger avec des réactifs provenant d'autres kits de numéro de lot différents.
- Si présence de contamination, ne pas utiliser.
- Les résultats peuvent être affectés par l'hémolyse. Ne pas tester des échantillons hémolysés.
- Il est recommandé d'inclure des contrôles haut et bas dans chaque essai. Si les valeurs de contrôle ne se situent pas dans la plage recommandée, refaire le dosage. Un contrôle qualité supplémentaire peut s'avérer nécessaire selon la réglementation nationale ou les procédures locales.
- Pour éviter des résultats erronés, respecter les consignes de conservation.
- Les plages de contrôle fournies proviennent d'essais effectués en double sur des lots de contrôle spécifiques au moyen des kits ELISA de PLAC® test. Les moyennes obtenues dans un laboratoire donné peuvent varier par rapport aux valeurs indiquées. Les variations entre laboratoires peuvent être liées aux différentes techniques employées ou à la variabilité des réactifs. Il est conseillé que chaque laboratoire établit ses propres spécifications.

PREPARATION ET CONSERVATION DU REACTIF

Conserver les kits de test fermés entre 2 et 8 °C dès leur réception. De plus, conserver la microplaque dans sa pochette en aluminium avec déshydratant pour minimiser l'exposition à l'humidité. Les kits ouverts restent stables jusqu'à la date d'expiration indiquée, si les consignes de conservation ci-dessus sont respectées.

Préparer 1X tampon de lavage en diluant 20X tampon de lavage à 1:20 avec de l'eau désionisée. Mélanger 1 volume de tampon de lavage avec 19 volumes d'eau désionisée. Conserver à température ambiante (20 à 26 °C). Utiliser 1X tampon de lavage dans les quatre semaines qui suivent sa préparation. En présence de croissance microbienne, jeter le tampon.

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES SPECIMENS

- Il n'est pas nécessaire que le sujet soit à jeun.
- Prélever les échantillons de sang
 - dans des tubes contenant du gel de séparation du sérum ou du plasma
 - dans des tubes de collecte de plasma hépariné ou EDTA
 - dans des tubes de collecte de sérum.
- Traiter les échantillons à l'aide des procédures de séparation standard
 - Les échantillons devraient être centrifugés et séparés dans les quatre heures consécutives à la ponction veineuse conformément aux bonnes pratiques de laboratoire ; ce délai ne doit pas dépasser 36 heures après le prélèvement sanguin. Les échantillons doivent être conservés dans un endroit réfrigéré (entre 2 et 8 °C).

- Échantillons de sang non traités :
 - Conserver et transporter sur des blocs réfrigérants (entre 2 et 8 °C) et traiter dans un délai de 36 heures après le prélèvement.
- Échantillons traités :
 - Les échantillons doivent être conservés dans un compartiment réfrigéré entre 2 et 8 °C pendant au moins 24 heures après la prise de sang avant de procéder au test.
 - Les échantillons peuvent être testés dans un délai de 7 jours à compter du prélèvement et s'ils ont été conservés entre 2 et 8 °C.
 - Les échantillons de sérum/plasma peuvent être conservés plus longtemps s'ils sont stockés à une température inférieure ou égale à -70 °C. Une fois décongelé, l'échantillon peut être testé dans les 7 jours s'il est conservé entre 2 et 8 °C. Les échantillons peuvent être congelés et décongelés deux fois sans compromettre la quantification de la Lp-PLA₂.

PROCEDURE DE DOSAGE

Étalonnage

Chaque microplaque ou barrette doit être calibrée à l'aide d'une courbe d'étalonnage complète (6 points). Une courbe standard est générée à l'aide d'un modèle d'ajustement de courbe point à point. Vérifier la courbe d'étalonnage en utilisant deux niveaux de contrôle au minimum conformément aux exigences du laboratoire. Étalonner et exécuter les contrôles pour chaque plaque.

Contrôle qualité

Tester les contrôles haut et bas à chaque essai. Si les valeurs de contrôle ne se situent pas dans la plage recommandée, refaire le dosage. Un contrôle qualité supplémentaire peut s'avérer nécessaire selon la réglementation nationale ou les procédures d'accréditation.

Étapes préparatoires

1. Porter la microplaque, le conjugué, le tampon de lavage et le TMB à température ambiante (20 à 26 °C) avant utilisation.
2. Oter le film protecteur de la plaque et le nombre requis de barrettes de la pochette en aluminium. Refermer complètement la pochette en aluminium contenant les barrettes non utilisées avec le déshydratant se trouvant à l'intérieur et conserver le tout entre 2 et 8 °C.
3. Préparer 1X tampon de lavage en diluant 20X tampon de lavage à 1:20 avec de l'eau désionisée (1 volume de tampon de lavage et 19 volumes d'eau désionisée). Conserver à température ambiante (20 à 26 °C). Utiliser 1X tampon de lavage dans les quatre semaines qui suivent sa préparation.
4. Si nécessaire, laisser les échantillons décongeler entre 2 et 8 °C, puis les conserver entre 2 et 8 °C ou les placer sur de la glace.
5. Conserver les contrôles entre 2 et 8 °C, ou sur de la glace, jusqu'à utilisation.
6. Vortexer les échantillons et les contrôles pour obtenir un mélange homogène. Éviter la formation de mousse.

Incubation de l'échantillon

1. En utilisant une pipette avec une précision adaptée pour petit volume et son embout, distribuer 20 µL de calibres, échantillons et contrôles vortexés dans les puits,. Utiliser une pipette étalonnée et un nouvel embout pour chaque calibre, contrôle ou échantillon.
2. Laisser les échantillons incuber sur la microplaque pendant 10 ± 2 minutes avant de rajouter le conjugué.
3. Avec une pipette, distribuer 200 µL de conjugué à température ambiante dans chaque puits approprié de la microplaque. Pour éviter toute contamination, ajouter le conjugué sans toucher les échantillons avec l'embout de la pipette. Si cela se produit, changer l'embout et continuer l'application du conjugué dans les puits.
4. Incuber pendant 3 heures à température ambiante.
5. À la fin de la période d'incubation, laver les micropuits quatre (4) fois avec au moins 300 µL du 1X tampon de lavage fourni, à température ambiante. (NE PAS UTILISER D'EAU DU ROBINET ni D'EAU DISTILLÉE.)
6. Éponger la plaque sur du papier absorbant après le lavage final. Passer immédiatement (en moins de 2 minutes) à l'étape suivante. Ne pas laisser sécher la microplaque.

Incubation du substrat

1. A l'aide d'une pipette, distribuer 100 µL de réactif TMB à température ambiante dans chaque puits.
2. Remuer délicatement la plaque sur une surface plane pendant 10 à 15 secondes pour garantir une bonne homogénéisation.

3. Incuber la microplaque à température ambiante pendant 20 minutes à l'obscurité.
4. Stopper la réaction en ajoutant 100 µL de solution d'arrêt à température ambiante dans chaque puits.
5. Remuer délicatement la plaque sur une surface plane pendant 20 à 30 secondes pour garantir un bon mélange. Il est important de s'assurer que la couleur bleue devienne complètement jaune.
6. Essuyer l'humidité au fond de la plaque à l'aide d'une serviette en papier.
7. Dans les 15 minutes qui suivent l'application de la solution d'arrêt, lire la densité optique (D.O.) à 450 nm en utilisant le lecteur à microplaque.

NOTES RELATIVES A LA PROCEDURE

- Conserver tous les réactifs de test entre 2 et 8 °C. À l'exception des calibreurs et des contrôles, laisser les réactifs atteindre la température ambiante avant utilisation. Une bouteille de réactif de 23 ml peut nécessiter une heure ou plus pour atteindre la température ambiante. Conserver les calibreurs et les contrôles entre 2 et 8 °C, ou sur de la glace, jusqu'à utilisation.
- Porter la microplaque à température ambiante avant d'ouvrir le sac. Conserver les barrettes dans la pochette en aluminium pour minimiser l'exposition à l'humidité. Toujours conserver les barrettes non utilisées dans la pochette en aluminium avec le déshydratant.
- Toujours s'assurer que le réactif de l'étape suivante est prêt 2 à 3 minutes avant l'étape du lavage.
- Pour garantir une mesure exacte des échantillons, l'ajout d'échantillons, calibreurs et contrôles doit être effectué de manière précise. Utiliser uniquement des pipettes correctement calibrées.
- Ce dosage peut être effectué en utilisant une méthode de lavage validée.
- Ne pas recouvrir la microplaque d'un film quelconque durant les incubations.
- Ne pas utiliser d'agitateur de microplaque durant les étapes d'incubation.

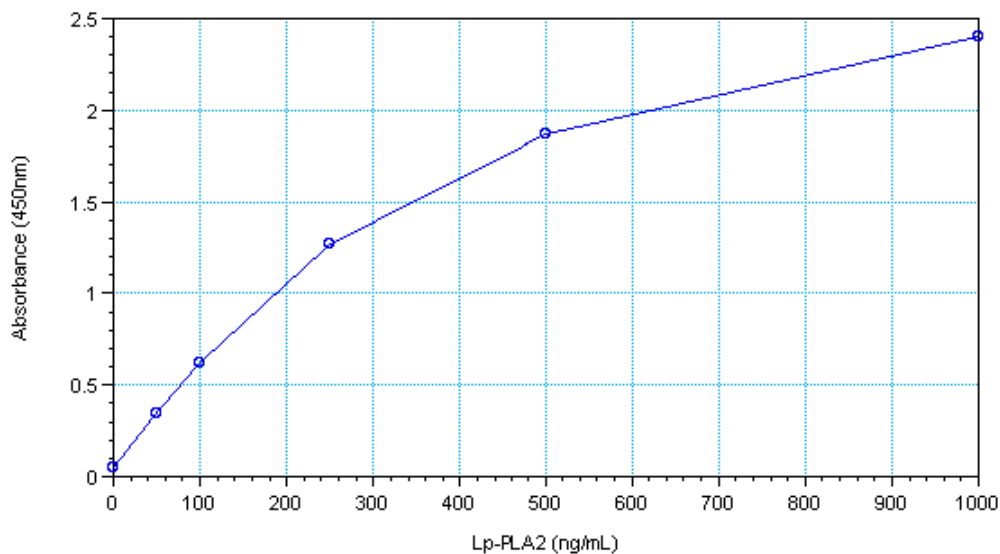
CALCUL DES RESULTATS

1. Construire une courbe d'étalonnage standard en plaçant les points de l'absorbance obtenue pour chaque calibreur sur l'axe des ordonnées, en mettant la concentration de la Lp-PLA₂ en ng/ml sur l'axe des abscisses. Utiliser un ajustement de courbe point à point avec un logiciel approprié pour construire la courbe d'étalonnage standard.
2. En utilisant la valeur d'absorbance pour chaque échantillon et contrôle, déterminer la concentration correspondante de Lp-PLA₂ en ng/ml à partir de la courbe d'étalonnage.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE

Les résultats d'une courbe d'étalonnage standard type avec des lectures de densité optique à 450 nm sur l'axe des ordonnées et les concentrations de Lp-PLA₂ (ng/ml) sont représentés sur l'axe des abscisses. Cette courbe d'étalonnage est fournie à titre d'illustration uniquement. Une courbe d'étalonnage standard doit être générée par l'utilisateur pour chaque dosage réalisé.

Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Absorbance (D.O. à 450 nm)
0	0,048
50	0,348
100	0,623
250	1,269
500	1,868
1000	2,402



LIMITES

Procédure

- Des résultats fiables et reproductibles seront obtenus si la procédure de dosage est effectuée après avoir correctement assimilé les instructions de la notice du kit et si les bonnes pratiques de laboratoire sont respectées.
- Les procédures de lavage sont cruciales. Un lavage insuffisant donnera une précision médiocre et des lectures d'absorbance faussement élevées.
- Comme cela est le cas avec tous les systèmes de dosage immunologique, notamment ceux utilisant des anticorps monoclonaux murins, une éventuelle interférence due à des anticorps anti-souris humains (HAMA) ou d'autres interactions hétérophiliques dans l'échantillon peuvent générer des valeurs anormalement élevées ou faibles.
- Comme avec toute méthode analytique, il existe la possibilité que des substances et/ou des facteurs non testés (techniques ou méthodologiques) interfèrent sur le bon déroulement du test et provoquent de faux résultats. Les résultats doivent être pris en compte en conjonction avec d'autres méthodes cliniques et analytiques.

Interprétation clinique

- Les taux de Lp-PLA₂ doivent être interprétés en tenant compte des bilans cliniques et des autres tests de diagnostic.
- Ce test ne remplace pas les dosages de cholestérol sanguin ou d'autres facteurs de risque classiques identifiés pour les maladies coronariennes ou les accidents cérébrovasculaires ischémiques.

VALEURS ATTENDUES

Les échantillons de sujets masculins (n=251) et féminins (n=174) en bonne santé apparemment, se trouvant dans la tranche d'âge clinique appropriée de 40 à 70 ans, ont été évalués à l'aide du kit ELISA de test PLAC de diaDexus. La population de référence a été représentée avec les origines ethniques suivantes : Afro-Américaine n=26, Caucasienne n=390, Hispanique n=8 et non spécifié n=1. Le tableau suivant reflète la distribution des valeurs de Lp-PLA₂ au sein de la population globale et la répartition par sexe :

	Lp-PLA ₂ ng/ml		
Centile	Tous (n=425)	Femmes (n=174)	Hommes (n=251)
5	126	120	131
20	174	169	179
33	201	188	205
50	235	228	244
67	262	252	268
80	289	285	293
95	369	342	376

Ces intervalles de référence sont fournis à titre indicatif uniquement et ne sont pas destinés à définir des “valeurs critiques” ou des seuils à utiliser lors de décisions médicales. Chaque laboratoire doit définir ses propres intervalles de référence. Le document CLSI Standard C28-A2 (*How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition*) fournit des lignes directrices permettant de définir des intervalles de référence. S'appuyant sur la valeur médiane de la concentration de Lp-PLA₂ de la population, il a été avancé que la valeur de 235 ng/ml pourrait être utilisée comme valeur seuil pour les décisions cliniques [16]. Plus récemment, en s'appuyant sur l'ensemble des données publiées sur l'évaluation du risque associé à la Lp-PLA₂, un groupe d'experts a suggéré d'abaisser le seuil de décision à 200 ng/ml [17].

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité

La limite minimale de détection est de 0,34 ng/ml, telle que calculée par interpolation de la moyenne plus deux déviations standard de 20 mesures du calibrateur Lp-PLA₂ à 0 ng/ml.

Précision du dosage

La variabilité intra et inter dosage a été déterminée en testant quatre pools d'échantillons de sérum humain avec des concentrations de Lp-PLA₂ réparties dans l'ensemble de la plage d'étalonnage du dosage. Les pools de sérum ont été dosés en utilisant un seul lot de réactifs, en double, sur deux barrettes séparées par jour, pendant 5 jours, à raison de quatre microplaques par jour. Les résultats obtenus sont indiqués ci-dessous :

Pool de sérum	Concentration moyenne de Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Intra dosage % CV n=80	Inter dosage % CV n=20	Total % CV n=80
1	143	6,2	4,6	7,7
2	211	4,1	5,1	6,6
3	368	5,1	8,5	9,9
4	830	9,5	8,7	12,8

Dans une étude de reproductibilité réalisée avec un ensemble de 108 échantillons de sérum, les résultats de dosage déterminés à partir des premiers puits (dose unique) ont été comparés aux résultats moyens à partir de deux mesures successives (puits doubles). Les niveaux de Lp-PLA₂ des échantillons allaient de 87 à 575 ng/ml, et le %CV moyen entre les réplicas était de 2,3%. Dans une analyse de régression linéaire, les résultats uniques avaient une corrélation élevée avec les résultats moyens de duplication : coefficient de corrélation r=0,997 (pente 1,0 et interception -1,3 ng/ml).

Linéarité

Six échantillons de sérum avec des niveaux élevés de Lp-PLA₂ connus ont été mélangés avec six échantillons de sérum avec des niveaux bas de Lp-PLA₂ connus. Le pourcentage de récupération a été déterminé comme étant la valeur mesurée divisée par la valeur attendue, multipliée par 100. La récupération moyenne était de 93%, montrant la linéarité des échantillons dilués dans une plage comprise entre 151 et 810 ng/ml de Lp-PLA₂.

Substances interférentes

L'interférence des substances endogènes identifiées dans le sang et des substances exogènes (médicaments courants et délivrés sur ordonnance) a été évaluée dans le dosage. Cinq échantillons de sérum individuels avec des valeurs de Lp-PLA₂ comprises entre 163 et 908 ng/ml ont été dopés avec des substances interférentes potentielles. Aucune interférence significative n'a été observée pour les substances suivantes aux niveaux de dopage testés.

Substances endogènes		Substances exogènes (médicaments en vente libre, etc.)	
<u>Potentiellement interférente</u>	<u>Concentration de test</u>	<u>Potentiellement interférente</u>	<u>Concentration de test</u>
Bilirubine	20 mg/dl	Acétaminophène	1,66 µmol/l
Cholestérol	500 mg/dl	Aspirine	3 300 µmol/l
Hémoglobine	1250 mg/dl	Atorvastatine	20 µmol/l
Triglycérides	3 000 mg/dl	Bisulfate de clopidogrel	140 µmol/l
Albumine totale*	~6 500 mg/dl	Diphenhydramine	19,6 µmol/l
		Fénofibrate	125 µmol/l
		Lisinopril	0,74 µmol/l
		Metformine	310 µmol/l
		Niacine	6 500 µmol/l
		Pravastatine	10 µmol/l
		Tolbutamide	2 400 µmol/l
		Vitamine C	227 µmol/l
		Warfarine	64,9 µmol/l

* 2,5 g/dl d'albumine ajouté au pool de plasma de 4 g/dl d'albumine de manière présomptive

ÉTUDES CLINIQUES

Maladie coronarienne

Pour évaluer l'efficacité du kit ELISA de test diaDexus PLAC comme prédicteur du risque de maladie coronarienne, les niveaux de Lp-PLA₂ ont été mesurés dans 1 348 échantillons de plasma EDTA conservés dans le cadre d'une importante étude épidémiologique multicentrique, l'étude ARIC (Atherosclerosis Risk In Communities), commanditée par la division NHLBI (National Heart, Lung, and Blood Institute) du National Institutes of Health. Le développement d'une maladie coronarienne a été suivi chez les participants pendant six à huit ans. Les échantillons utilisés pour le test PLAC ont été prélevés chez les participants âgés de 47 à 69 ans qui n'étaient pas atteints d'une maladie coronarienne lors de la prise de sang. Il s'agissait d'une étude de cas de cohorte dans laquelle les échantillons provenant de tous les cas de maladie coronarienne (607) ont été testés avec des échantillons prélevés chez 741 participants présentant des caractéristiques comparables sans maladie coronarienne diagnostiquée au moment de la réalisation de cette étude (témoins).*

Des modèles de régression de Cox ont été utilisés pour évaluer l'association de la Lp-PLA₂ et d'une maladie coronarienne dans une analyse à une seule variable (modèle 1), dans une analyse à une seule variable ajustée à la démographie (modèle 2) et dans un modèle à plusieurs variables ajusté à la démographie et à d'autres facteurs pronostiques (modèle 3). En s'appuyant sur les points de coupure des tertiles supérieur et inférieur de la Lp-PLA₂, générés à partir de l'ensemble de données ARIC (420 et 310 ng/ml, les 67^{ème} et 33^{ème} centiles, respectivement), les ratios de risque des analyses de régression de Cox ont révélé que la concentration de Lp-PLA₂ était un important prédicteur de risque de maladie coronarienne, pour les concentrations les plus élevées et intermédiaires par rapport aux concentrations les plus faibles de Lp-PLA₂, chez l'ensemble des participants (se reporter au tableau 1). Il convient de noter que des points de coupure différents peuvent s'avérer appropriés pour d'autres populations cliniques.

**REMARQUE : 86 résultats (5,5 %) se situaient en dehors des critères d'acceptabilité du dosage et n'ont pas été pris en compte dans les analyses de données.*

Tableau 1. Ratios de risque de maladie coronarienne chez les sujets indépendamment du taux de LDL

Lp-PLA ₂	Ratio de risque de la Lp-PLA ₂ (IC de 95 %, valeur p)*		
	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Nb. de cas de maladie coronarienne/sujets au total dans la catégorie	127/366 (34,7%)	192/444 (43,2%)	288/538 (53,5%)
Modèle 1	1,0	1,49 (1,11 à 1,99, p=0,008)	2,50 (1,89 à 3,31, p<0,001)
Modèle 2	1,0	1,24 (0,92 à 1,66, p=0,154)	1,76 (1,32 à 2,36, p<0,001)
Modèle 3	1,0	1,71 (1,06 à 2,75, p=0,029)	2,12 (1,29 à 3,48, p=0,003)

*Le tertile le plus bas avec des valeurs de Lp-PLA₂ <310 ng/ml a été utilisé comme groupe de référence.

Modèle 1 : analyse à une seule variable

Modèle 2 : réalisation d'un ajustement selon l'âge, la race et le sexe

Modèle 3 : Modèle 2 avec un ajustement par rapport au tabagisme, à la pression artérielle, au diabète, aux taux de HDL, LDL, CRP et d'interaction Lp-PLA₂ - LDL

Une interaction statistique a été observée entre la Lp-PLA₂ et les LDL. L'évaluation des ratios de risque de la Lp-PLA₂ dans les sous-groupes présentant des taux de LDL élevés et bas s'est donc avérée appropriée. Le taux moyen de LDL pour la population cohorte était de 130 mg/dl.

Cette valeur a permis de définir les sous-groupes présentant de taux de LDL élevés et bas. Les tableaux 2a et 2b présentent l'analyse à une seule variable des ratios de risque dans les sous-groupes présentant des taux de LDL élevés et bas. Les ratios de risque ont été calculés au moyen d'une régression de Cox en utilisant la méthode de cohorte pondérée avec un ajustement de Barlow, n=1348.

Tableau 2a. Ratios de risque de maladie coronarienne chez les sujets présentant un taux de LDL <130 mg/dl

Lp-PLA ₂ [†]	Ratio de risque de la Lp-PLA ₂ (IC de 95 %)*		
	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Ratio de risque	1,0	2,17 (1,41 à 3,36)	3,52 (2,25 à 5,49)
Nb. de cas de maladie coronarienne/sujets au total dans la catégorie	51/215 (23,7%)	75/195 (38,5%)	77/163 (47,2%)

*Le tertile le plus bas avec des valeurs de Lp-PLA₂ <310 ng/ml a été utilisé comme groupe de référence.

†Les points de coupure de la Lp-PLA₂ s'appuient sur la population de l'étude ARIC indépendamment du taux de LDL.

Tableau 2b. Ratios de risque de maladie coronarienne chez les sujets présentant un taux de LDL \geq 130 mg/dl

	Ratio de risque de la Lp-PLA ₂ (IC de 95 %)*		
Lp-PLA ₂ [†]	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Ratio de risque	3,15 (2,08 à 4,77)	3,66 (2,43 à 5,51)	5,10 (3,43 à 7,57)
Nb. de cas de maladie coronarienne/sujets au total dans la catégorie	110/234 (47,0%)	126/247 (51,0%)	169/294 (57,5%)

* Le tertile le plus bas du sous-groupe présentant un taux de LDL <130 avec des valeurs de Lp-PLA₂ <310 ng/mL, a été utilisé comme groupe de référence.

[†] Les points de coupure de la Lp-PLA₂ s'appuient sur la population de l'étude ARIC présentant un taux de LDL \geq 130 mg/dl.

Dans le sous-groupe présentant un taux de LDL élevé, les groupes de tertile spécifique au sous-groupe ont fourni des points de coupure de 350 et 460 ng/ml. Une augmentation du ratio de risque a été observée avec les valeurs de Lp-PLA₂ supérieures. Par conséquent, chez les sujets présentant un taux de LDL élevée, un point de coupure de la Lp-PLA₂ supérieur doit être pris en compte. D'autres recherches vont être effectuées afin d'évaluer l'interaction Lp-PLA₂ - LDL dans le sous-groupe présentant un taux de LDL élevé. Chez la population totale, la Lp-PLA₂ s'est avérée être un important prédicteur de risque de maladie coronarienne chez les groupes présentant des taux élevés et intermédiaires de Lp-PLA₂ par rapport au groupe qui présentait un taux faible (groupe de référence).

Accident cérébrovasculaire ischémique

Les taux de Lp-PLA₂ ont été évalués dans le cadre de l'étude ARIC afin de déterminer son efficacité comme prédicteur du risque d'accident cérébrovasculaire. Un total de 223 accidents cérébrovasculaires a été identifié dans le groupe d'étude, dont 194 (87 %) accidents cérébrovasculaires ischémiques associés à une athérosclérose, selon la classification adoptée par les investigateurs de l'étude ARIC. Une étude de cas de cohorte similaire a été menée dans laquelle les échantillons provenant de tous les cas d'accidents cérébrovasculaires ischémiques (194) ont été testés avec des échantillons prélevés chez 762 participants présentant des caractéristiques comparables sans maladie coronarienne ou accident cérébrovasculaire diagnostiqué au moment de la réalisation de cette étude (témoins).

Comme dans l'étude d'évaluation du risque de maladie coronarienne, des modèles de régression de Cox ont été utilisés pour évaluer l'association de la Lp-PLA₂ et d'un accident cérébrovasculaire dans une analyse à une seule variable (modèle 1), dans une analyse à une seule variable ajustée à la démographie (modèle 2) et dans un modèle à plusieurs variables ajusté à la démographie et à d'autres facteurs pronostiques (modèle 3) et dans une analyse incluant tous les facteurs y compris celui de maladie coronarienne (modèle 4). Les points de coupure des tertiles identiques (420 et 310 ng/ml, les 67^{ème} et 33^{ème} centiles, respectivement) ont été appliqués à cette étude comme dans les précédentes analyses. Le statut de maladie coronarienne s'est également avéré être un prédicteur de risque avec un ratio de risque de 2,26 dans un modèle totalement ajusté. Les ratios de risque des analyses de régression de Cox ont révélé que la Lp-PLA₂ était un prédicteur important et indépendant du risque d'accident cérébrovasculaire pour le tertile le plus élevé par rapport au tertile le plus bas de Lp-PLA₂, chez tous les participants, avec une augmentation pratiquement multipliée par deux, même après l'ajustement du diabète, des lipides, de la pression artérielle, du tabagisme, de l'indice de masse corporelle (IMC) et des autres marqueurs inflammatoires et du statut de maladie coronarienne (se reporter au tableau 3).

Tableau 3. Ratios de risque d'accident cérébro-vasculaire ischémique chez tous les sujets

Lp-PLA ₂	Ratio de risque de la Lp-PLA ₂ (IC de 95 %, valeur p)*		
	Tertile 1	Tertile 2	Tertile 3
Nb. cas d'accidents cérébrovasculaires / sujets au total	47/283 (16,6%)	44/305 (14,4%)	103/368 (28,0%)
Modèle 1	1,0	0,85 (0,57 à 1,29, p=0,45)	1,79 (1,27 à 2,52, p=0,0010)
Modèle 2	1,0	0,89 (0,59 à 1,35, p=0,58)	2,09 (1,46 à 3,01, p=0,0001)
Modèle 3	1,0	0,89 (0,58 à 1,36, p=0,59)	1,81 (1,22 à 2,69, p=0,0034)
Modèle 4	1,0	0,86 (0,56 à 1,31, p=0,48)	1,75 (1,18 à 2,60, p=0,0057)

* Le tertile le plus bas avec des valeurs de Lp-PLA₂ <310 ng/ml a été utilisé comme groupe de référence.

Modèle 1 : analyse à une seule variable

Modèle 2 : réalisation d'un ajustement selon l'âge, la race et le sexe

Modèle 3 : Modèle 2 avec un ajustement du diabète, du taux de LDL et de HDL, de la pression artérielle, du tabagisme, de l'IMC et de la CRP

Modèle 4 : Modèle 3 avec un ajustement de l'état de maladie coronarienne





Des analyses complémentaires ont été effectuées afin d'évaluer le caractère prédictif de la Lp-PLA₂ pour les accidents cérébrovasculaires ischémiques dans l'ensemble de la plage de pression artérielle systolique chez les sujets et de déterminer si la pression artérielle et la Lp-PLA₂ avaient un rôle complémentaire dans l'évaluation du risque d'accident cérébrovasculaire ischémique. Des points de coupure des tertiles de pression artérielle systolique ont été attribués aux 33^{ème} et 67^{ème} centiles de la population (113 et 130 mm Hg, respectivement). La population de l'étude a été répartie dans la plage élevée, moyenne et basse (1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} tertile) de pression artérielle systolique et dans la plage élevée et basse de Lp-PLA₂ (en dessous et au-dessus de la moyenne, 377 ng/ml dans l'étude ARIC). Le risque relatif de chaque groupe a été comparé au risque d'évènements associés au groupe situé dans le 1^{er} tertile de pression artérielle systolique et au groupe situé sous la moyenne de Lp-PLA₂ (tableau 4).

Tableau 4. Ratios de risque d'accident cérébro-vasculaire ischémique : effets complémentaires de la Lp-PLA₂ et de la pression artérielle systolique

		Lp-PLA ₂	
		Sous la moyenne	Au-dessus de la moyenne
Pression artérielle systolique (mm Hg)	Nb. cas d'accidents cérébrovasculaires / sujets au total dans la catégorie	68/478 (14,2%)	126/478 (26,4%)
	<113	1,00	2,29 (p=0,03)
	113 à 130	2,05 (p=0,06)	3,53 (p=0,0004)
	>130	3,52 (p=0,0005)	6,75 (p<0,0001)

Les sujets situés au-dessus de la moyenne de concentration de Lp-PLA₂ dans l'étude ARIC et dans le tertile supérieur de pression artérielle systolique (>130 mm Hg) présentaient un ratio de risque de 6,75 (p<0,0001) par rapport aux sujets situés sous la moyenne de Lp-PLA₂ et dans le tertile inférieur de pression artérielle. Ces résultats ont montré que la Lp-PLA₂ et la pression artérielle avaient un rôle complémentaire dans la prédiction du risque. Il est également apparu que les sujets situés dans les groupes les plus élevés des deux variables étaient les plus exposés au risque d'accident cérébrovasculaire ischémique associé à l'athérosclérose.

INFORMATIONS RELATIVES A LA SECURITE DU PRODUIT

Lot de calibreur (1-6), Contrôle bas et haut  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	Tampon de lavage 20X  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	Solution d'arrêt  [Xi] R34/41 S26/36/37/39	Conjugué, Réactif TMB  [Xi]
--	---	---	---

R34	Les causes brûlent
R36	Irritant pour les yeux
R38	Irritant pour la peau
R41	Le risqué de danger sérieux pour les yeux
S26	En cas de contact avec les yeux, rincer immédiatement et abondamment avec de l'eau et demander conseil à un médecin
S36/37/39	Portez des vêtements protecteurs convenables, des gants, les yeux et la protection de visage

REFERENCES

- [1] Caslake MJ, Packard CJ, et al. (2000). Atherosclerosis 150: 413-9.
- [2] Kudo I and Murakami M. (2002). Prostaglandins Other Lipid Mediat 68-69: 3-58.
- [3] Hakkinen T, Luoma JS, et al. (1999). Arterioscler Thromb Vasc Biol 19: 2909-17.
- [4] Kolodgie FD, Burke AP, et al. (2006). Arterioscler Thromb Vasc Biol 26: 2523-9.
- [5] Chisolm GM and Steinberg D. (2000). Free Radical Biol Med 28: 1815-26.
- [6] Witztum JL. (1994). Lancet 344: 793-5.
- [7] Macphee CH, Moores KE, et al. (1999). Biochem J 338: 479-87.
- [8] Macphee CH. (2001). Curr Opin Pharmacol 1: 121-5.
- [9] Macphee CH and Suckling KE. (2002). Expert Opin Ther Targets 6: 309-14.
- [10] Wolfert RL, Kim NW, et al. (2004). Circulation 110: Suppl 3: 309.
- [11] Lerman A and McConnell JP (2008). Am J Cardiol 101 (Suppl): 11F-22F.
- [12] Packard CJ, O'Reilly DS, et al. (2000). N Engl J Med 343: 1148-55.
- [13] Ballantyne CM, Hoogeveen RC, et al. (2004). Circulation 109: 837-842.
- [14] Heart Disease and Stroke Statistics – 2006 Update, American Heart Association.
- [15] Ballantyne CM, Hoogeveen RC, et al. (2005). Arch Intern Med 165: 2479-84.
- [16] Lanman RB, Wolfert RL, et al. (2006). Prev Cardiol 9(3):138-43.
- [17] Davidson MH, Corson MA, et al. (2008). Am J Cardiol 101 (Suppl): 51F-57F.