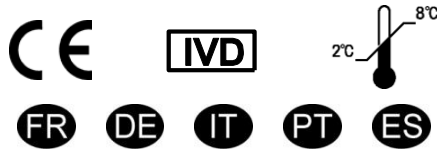



Enzym-Immunoassay zur Quantitativen Bestimmung
von Lp-PLA₂ im Humanplasma und Serum








www.plactest.com

diaDexus

 diaDexus, Inc.
349 Oyster Point Blvd.
South San Francisco, CA 94080 USA
Tel: 1-650-246-6400
Fax: 1-650-246-6499
www.plactest.com

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

Symbolschlüssel

REF	Katalognummer	IVD	<i>In vitro</i> Diagnostikum
PLATE	Antikörper-beschichtete Platte	LOT	Charge
CAL	Kalibrator		Verfallsdatum
CONTROL LOW	Kontrolle niedrig		Lagerung bei 2 bis 8°C
CONTROL HIGH	Kontrolle hoch		Reizende Substanz
WASH	Waschpuffer		Siehe Gebrauchsanweisung
CONJ	Konjugat		Hersteller
TMB	TMB-Substrat	EC REP	Autorisierter Repräsentant in der EG
STOP	Stopplösung	CE	Europäische Konformität

Lesen Sie diese Packungsbeilage ganz durch, bevor Sie das Produkt verwenden. Befolgen Sie die Anweisungen sorgfältig beim Durchführen von Tests. Das Nichteinhalten der Anweisungen kann zu ungenauen Ergebnissen führen.

Dieses Produkt fällt unter die US-Patentnummern 5532152, 5641669, 5698403, 5847088, 5968818, 5981252, 6177257, 7045329, 7416853 und die Europäischen Patentnummern 658205 und 673426. Weitere Patente schwebend.

PLAC und PLAC sind Handelsmarken von diaDexus, Inc. Registriert in den Vereinigten Staaten.

VERWENDUNGSZWECK

Der diaDexus PLAC[®] Test ELISA Kit ist ein Enzym-Immunoassay zur quantitativen Bestimmung von Lp-PLA₂ (Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A₂) in Humanplasma und Serum, der in Verbindung mit der klinischen Bewertung und Patientenrisikoeinschätzung unterstützend zur Risikoprognose bei mit Atherosklerose assoziierter koronarer Herzkrankheit und ischämischem Schlaganfall eingesetzt werden soll.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Lp-PLA₂ ist eine Kalzium-unabhängige Serinlipase, die sowohl mit dem erniedrigten Lipoprotein (LDL) als auch in geringerem Umfang mit dem erhöhten Lipoprotein (HDL) in menschlichem Plasma und Serum [1] assoziiert ist und sich von anderen Phospholipasen wie cPLA₂ und sPLA₂ unterscheidet [2]. Lp-PLA₂ wird von Makrophagen und anderen entzündlichen Zellen produziert und in höheren Konzentrationen bei fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen als bei Läsionen im Frühstadium exprimiert [3,4]. Mehrere Beweislinien legen nahe, dass die Oxidation von LDL eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Progression von Atherosklerose spielt [5,6]. Lp-PLA₂ ist an der oxidativen Modifizierung von LDL beteiligt durch die Hydrolyse von oxidiertem Phosphatidylcholin, wobei Lysophosphatidylcholin und oxidierte freie Fettsäuren entstehen, beides stark proentzündliche Substanzen, die zur Bildung von atherosklerotischen Plaques beitragen [7,8,9]. Lp-PLA₂ weist mäßige intra- und interindividuelle Variationen auf, proportional zu anderen kardiovaskulären Lipidmarkern und substantiell weniger als C-reaktives Protein (CRP). Zusätzlich ist Lp-PLA₂ bei systemischen entzündlichen Erkrankungen nicht erhöht und könnte ein spezifischerer Marker bei vaskulären Entzündungen sein. Die relativ geringe biologische Variation von Lp-PLA₂ und ihre Spezifität sind bei der Diagnose und Überwachung des kardiovaskulären Risikos von Bedeutung [10,11].

Erhöhte Lp-PLA₂-Spiegel, wie im Immunoassay bewertet, wurden bei Patienten mit angiographisch nachgewiesener koronarer Herzkrankheit (KHK) diagnostiziert, verglichen mit Kontrollpersonen desselben Alters [1]. Bei einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie, in der Proben von Männern mit Hypercholesterinämie (n=1740) aus der West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) verwendet wurden, wurde ein zweifach höheres Risiko einer koronaren Herzkrankheit bei Patienten in der höchsten Quintile des Lp-PLA₂-Spiegels beobachtet, verglichen mit denen der niedrigsten Quintile [12]. Des Weiteren erwies sich die Assoziation von Lp-PLA₂ mit einem KHK-Risiko als unabhängig von LDL und anderen Entzündungsmarkern: C-reaktives Protein, Anzahl der weißen Blutkörperchen im Blut und Fibrinogen. Die Autoren der Studie führten in ihren Schlussfolgerungen aus, dass "erhöhte Spiegel an Lipoprotein-assoziierte Phospholipase A₂ ein hoher Risikofaktor für koronare Herzkrankheit zu sein scheinen, ein Befund, der Auswirkungen auf die Atherogenese und die Risikobewertung hat". In einer anderen Studie, in der Proben der Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)-Studie verwendet wurden und die 12.819 offensichtlich gesunde Männer und Frauen mittleren Alters (45 bis 64 Jahre) sechs bis acht Jahre lang untersuchte, erwies sich Lp-PLA₂ als ein wichtiger Prädiktor für das KHK-Risiko. Bei Individuen mit weniger als 130 mg/dl LDL war Lp-PLA₂ signifikant und unabhängig mit einem zweifach höheren Risiko für KHK-Ereignisse assoziiert, einschließlich der Notwendigkeit der Revaskularisation, Myokardinfarkt und Tod infolge einer Herzerkrankung [13].

Die ARIC- Studie wurde erneut analysiert, um das mit erhöhten Lp-PLA₂-Spiegeln assoziierte Schlaganfallrisiko zu bestimmen. Es wurden insgesamt 223 Schlaganfallereignisse in der Probandengruppe identifiziert; davon handelte es sich bei 194 (87 %) um mit Atherosklerose assoziierten ischämischen Schlaganfall, wie von den ARIC-Versuchsleitern klassifiziert wurde. Dieser Anteil ischämischer Schlaganfälle im Verhältnis zur Gesamtzahl ist mit der Prozentzahl in der Allgemeinbevölkerung konsistent [14]. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass Lp-PLA₂ ein aussagekräftiger Prädiktor für Schlaganfälle war, mit einem nahezu zweifach erhöhten Risiko auch nach Adjustierung der Daten für Blutdruck, Lipide, Diabetes, Body-Mass-Index und andere Entzündungsmarker [15].

TESTMETHODE

Das diaDexus PLAC Test ELISA Kit ist ein Sandwich-Enzym-Immunoassay, der zwei hoch spezifische monoklonale Antikörper zur direkten Messung der Lp-PLA₂-Konzentration in Humanplasma und Serum verwendet. Das Assaysystem verwendet einen monoklonalen Anti-Lp-PLA₂ Antikörper (2C10), gerichtet gegen Lp-PLA₂, der in der soliden Phase auf der Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Die Probe wird der Platte hinzugefügt und 10 Minuten lang bei 20 bis 26 °C inkubiert. Ein zweiter monoklonaler Anti-Lp-PLA₂ Antikörper (4B4), der mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) markiert ist, wird sodann hinzugefügt und reagiert bei 20 bis 26 °C 180 Minuten lang mit dem immobilisierten Antigen, so dass die Lp-PLA₂-Moleküle zwischen der soliden Phase und den Enzym-markierten Antikörpern gewonnen werden. Die Vertiefungen werden mit einem mitgelieferten Puffer gereinigt, um ungebundene Antigene zu entfernen. Dann wird das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugefügt und bei 20 bis 26 °C 20 Minuten lang inkubiert, wobei eine blaue Farbe entsteht. Unter Hinzufügung der Stopplösung wird die Blaufärbung gestoppt und es entsteht eine gelbe Farbe. Die Absorption der enzymatischen Umwandlung des Substrats wird spektrophotometrisch bei 450 nm bestimmt und ist direkt proportional zu der vorliegenden Lp-PLA₂-Konzentration. Es wird ein Set von Lp-PLA₂-Kalibratoren verwendet, um eine Standardkurve für die Absorption aufzuzeichnen im Vergleich zur Lp-PLA₂-Konzentration, mittels derer die Lp-PLA₂-Konzentration in der Testprobe bestimmt werden kann. Es stehen zwei Kontrollstufen zur Überwachung der Assayleistung innerhalb des klinischen Assaybereichs zur Verfügung.

REAGENZEN UND AUSRÜSTUNG

Mit dem Kit gelieferte Ausrüstung: (Ausreichend für 96 Vertiefungen)

TEILENUMMER	SYMBOL	KOMPONENTENBESCHREIBUNG	MENGE
60001	PLATE	Antikörper-beschichtete Platte Maus-monoklonale Anti-Lp-PLA ₂ (2C10) Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte	1
60006	CAL	Kalibratoren (0, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml) diaDexus rekombinantes Lp-PLA ₂ Antigen (DDX-RA) in einem Protein stabilisierenden Verdünnungsmittel	1 Set
60007			zu je 0,25
60008			ml
60009			
60010 60011			
60002	WASH	20X Waschpuffer Nichtionisches Detergens in einer Pufferlösung	50 ml
60003	CONJ	Konjugat Maus-monoklonaler Anti-Lp-PLA ₂ (4B4) Antikörper zu Meerrettichperoxidase konjugiert in einem Pufferreagenz mit Trägerproteinen von Rindern und Mäusen	23 ml
60004	TMB	TMB Reagenz 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in einem milden Säurepuffer	11 ml
60005	STOP	Stopplösung 1N HCl	11 ml
65009	CONTROL LOW	Kontrolle niedrig (~150 ng/ml) diaDexus rekombinantes Lp-PLA ₂ Antigen (DDX-RA) in einer flüssigen Protein (BSA) gepufferten Matrix	1 Flasche, 0,5 ml
65010	CONTROL HIGH	Kontrolle hoch (~350 ng/ml) diaDexus rekombinantes Lp-PLA ₂ Antigen (DDX-RA) in einer flüssigen Protein (BSA) gepufferten Matrix	1 Flasche, 0,5 ml
FMD-01-026		Analysezertifikat – Kontrollbereich Die Kontrollbereiche für die Charge sind auf dem Analysezertifikat angegeben	je 1

Benötigte, jedoch nicht gelieferte Ausrüstung:

- Einkanal- und Mehrkanal-Präzisionspipettoren: 0,02, 0,10, 0,20 ml
- Einweg-Pipettenspitzen (während des Assayverfahrens muss für jedes Hinzukommen anderer Proben oder Reagenzien eine neue Pipettenspitze verwendet werden)
- Vortex Mixer oder ähnliches
- Entionisiertes Wasser
- Ein Mikrotiterplatten-Leser mit einer Bandbreite von 10 nm oder weniger und einem optischen Dichtebereich (O.D.) von 3 oder größer bei 450 nm
- Zur Punkt-zu-Punkt-Kurvenanpassung fähige Computersoftware für die Berechnung der Konzentration des Analyts aus der optischen Dichte (optional)

WARNUNGEN UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Für den *In Vitro* Diagnostischen Gebrauch.
- Behandeln Sie alle Blutproben als potenziell biologisches Risikomaterial.
- Das Aussetzen von Proben der Zimmertemperatur sollte auf weniger als 6 Stunden minimiert werden (einschließlich Dauer der Blutentnahme, Verarbeitung, Transport und Laborprobenanalyse). Dies schließt nicht die Inkubation auf der ELISA-Platte ein.
- Die Lagerung der Proben bei -20 °C länger als 24 Stunden wird nicht empfohlen.
- Manche Komponenten verfügen über Etiketten mit Sicherheitsmaßnahmen. Siehe den Abschnitt Produktsicherheitsinformationen.
- Entsorgen Sie die Reagenzien in Einklang mit den entsprechenden Vorschriften.
- Verwenden Sie die Reagenzien nicht nach Ablauf ihres Verfallsdatums.
- Vermischen Sie nicht die Reagenzien verschiedener Kit-Chargen-Nummern.
- Bei Nachweis einer Kontaminierung nicht mehr verwenden.
- Eine Hämolyse kann die Ergebnisse beeinflussen. Testen Sie keine hämolysierten Proben.
- Es wird empfohlen, bei jedem Durchlauf sowohl Niedrige als auch Hohe Kontrollen durchzuführen. Falls sich die Kontrollwerte nicht innerhalb der Akzeptanzgrenzen befinden, den Assay wiederholen. Zusätzliche Qualitätskontrolltests könnten je nach den staatlichen oder örtlichen Auflagen erforderlich sein.
- Lagern Sie das Material gemäß den Anweisungen, um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden.
- Die vorgesehenen Kontrollbereiche wurden durch Replikattests der spezifischen Kontrollchargen unter Verwendung des PLAC Test ELISA Kits erhalten und sollten als Richtwerte verwendet werden. Individuelle Laborwerte können von den aufgelisteten Werten abweichen. Variationen von Labor zu Labor können durch technische Unterschiede oder unterschiedliche Reagenzien verursacht werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Akzeptanzbereiche festlegt.

REAGENZVORBEREITUNG UND LAGERUNG

Lagern Sie die Test-Kits nach Erhalt bei 2 bis 8 °C. Lassen Sie die Mikrotiterplatte zudem in dem versiegelten Folienbeutel mit Trockenmittel, um eine Feuchtigkeitsexposition zu minimieren. Geöffnete Test-Kits sind bis Erreichen des angezeigten Verfallsdatums haltbar, vorausgesetzt sie werden gemäß der Anweisung gelagert.

Bereiten Sie den 1X Waschpuffer durch die Verdünnung des 20X Waschpuffers mit entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 zu. Mischen Sie 1 Teil Waschpuffer mit 19 Teilen entionisiertem Wasser. Lagerung bei Zimmertemperatur (20 bis 26 °C). Verwenden Sie den 1X Waschpuffer innerhalb von vier Wochen nach der Zubereitung. Bei Beobachtung von mikrobiellem Wachstum entsorgen.

PROBENSAMMLUNG UND LAGERUNG

- Nüchternheit ist nicht erforderlich.
- Sammeln Sie die Blutproben in
 - Röhrchen zur Serum- oder Plasmageltrennung
 - EDTA- oder Heparinplasma-Röhrchen
 - sonstigen Serumröhrchen.

- Verarbeiten Sie die Proben unter Verwendung von Standard-Separationsverfahren.
 - Proben sollten innerhalb von vier Stunden nach Venenpunktion gemäß guter Laborpraktiken zentrifugiert und getrennt werden, jedoch nicht mehr nach 36 Stunden nach Blutentnahme. Die Proben müssen gekühlt (2 bis 8 °C) gelagert werden.
- Unverarbeitete Blutproben:
 - Lagerung und Transport auf Kühlpäckchen (bei 2 bis 8 °C) und Verarbeitung innerhalb von 36 Stunden nach Entnahme.
- Verarbeitete Proben:
 - Die Proben müssen gekühlt bei 2 bis 8 °C für mindestens 24 Stunden nach Entnahme der Probe gelagert werden, bevor man mit den Tests anfangen kann.
 - Die Proben können bis zu 7 Tage nach Entnahme der Probe getestet werden, wenn sie bei 2 bis 8 °C gelagert werden.
 - Für eine langfristige Lagerung müssen die Serum-/Plasmaproben bei oder unter -70 °C gelagert werden. Sobald sie aufgetaut sind, können sie bei einer Lagerung bei 2 bis 8 °C bis zu 7 Tage lang getestet werden. Die Proben dürfen zweimal eingefroren und aufgetaut werden ohne die Bestimmung der Lp-PLA₂ zu beeinträchtigen.

TESTVERFAHREN

Kalibrierung

Jeder Durchlauf einer Platte oder eines Streifens muss unter Verwendung einer vollen Kalibrierungs (6-Punkte)-Kurve kalibriert werden. Mittels der Punkt-zu-Punkt-Kurvenanpassungsmethode wird eine Standardkurve erzeugt. Verifizieren Sie die Kalibrierungskurve mit mindestens zwei Kontrollstufen gemäß den Laboranforderungen. Kalibrieren Sie und führen Sie für jeden Durchlauf einer Platte einen Kontrolllauf durch.

Qualitätskontrolle

Testen Sie bei jedem Durchlauf die Hohen und Niedrigen Kontrollen. Falls sich die Kontrollwerte nicht innerhalb der Akzeptanzgrenzen befinden, den Assay wiederholen. Zusätzliche Qualitätskontrolltests können gemäß der örtlichen, staatlichen bzw. bundesstaatlichen Vorschriften oder Akkreditierungsanforderungen notwendig sein.

Vorbereitungen

1. Bringen Sie Mikrotiterplatte, Konjugat, Waschpuffer und TMB vor Gebrauch auf Zimmertemperatur (20 bis 26 °C) .
2. Nehmen Sie den Plattenrahmen und die erforderliche Anzahl beschichteter Mikrotiterstreifen aus dem Folienbeutel. Versiegeln Sie den Folienbeutel mit den unbenutzten Streifen wieder mit dem im Beutel mitgelieferten Trockenmittel und lagern Sie ihn bei 2 bis 8 °C.
3. Bereiten Sie den 1X Waschpuffer durch die Verdünnung des 20X Waschpuffers mit entionisiertem Wasser im Verhältnis 1:20 zu (1 Teil Waschpuffer und 19 Teile entionisiertes Wasser). Lagerung bei Zimmertemperatur (20 bis 26 °C). Verwenden Sie den 1X Waschpuffer innerhalb von vier Wochen nach der Zubereitung.
4. Lassen Sie die Patientenproben bei 2 bis 8 °C auftauen, wenn sie gebraucht werden, und legen Sie sie auf Eis oder lagern Sie sie bei 2 bis 8 °C, sobald sie aufgetaut sind.
5. Lagern Sie die Kontrollen bei 2 bis 8 °C oder auf Eis, bis Sie verwendet werden.
6. Verwirbeln Sie die Proben und Kontrollen, um sie sorgfältig zu mischen. Vermeiden Sie Schaumbildung.

Probeninkubation

1. Dispensieren Sie mittels einer für niedrige Volumina ausreichend präzisen Pipette und Spitze nach dem Verwirbeln 20 µl of Kalibratoren, Proben und Kontrollen in die entsprechenden Vertiefungen. Verwenden Sie für jeden Kalibrator, für jede Kontrolle oder jede Probe eine kalibrierte Pipette und eine neue Pipettenspitze.
2. Lassen Sie die Proben auf der Platte für 10 ± 2 Minuten inkubieren, bevor Sie das Konjugat hinzufügen.

- Pipettieren Sie 200 µl Konjugat mit Raumtemperatur in die entsprechenden Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte. Vermeiden Sie eine Kontamination, indem Sie das Konjugat ohne die Proben mit den Pipettenspitzen zu berühren hinzufügen. Im Fall eines Kontakts wechseln Sie die Spitzen und fahren Sie damit fort, das Konjugat in die Vertiefungen zu geben.
- Inkubieren Sie für 3 Stunden bei Raumtemperatur.
- Am Ende der Inkubationszeit waschen Sie die Vertiefungen vier (4) Mal mit mindestens 300 µl des mitgelieferten 1X Waschpuffers, der Raumtemperatur haben muss. (KEIN LEITUNGS- oder DESTILLIERTES WASSER VERWENDEN.)
- Klopfen Sie die Platte nach dem letzten Waschschrift auf absorbierendem Papier aus. Fahren Sie unverzüglich (in weniger als 2 Minuten) mit dem nächsten Schritt fort. Lassen Sie die Mikrotiterplatte nicht trocknen.

Substratinkubation

- Pipettieren Sie in jede Vertiefung 100 µl des Raumtemperatur aufweisenden TMB Reagenzes.
- Bewegen Sie die Platte sanft 10 bis 15 Sekunden lang auf einer flachen Oberfläche hin und her, um eine gute Vermischung zu gewährleisten.
- Inkubieren Sie die Platte bei Raumtemperatur 20 Minuten lang im Dunkeln.
- Stoppen Sie die Reaktion durch die Zugabe von 100 µl Raumtemperatur aufweisender Stopplösung in jede Vertiefung.
- Bewegen Sie die Platte sanft 20 bis 30 Sekunden lang auf einer flachen Oberfläche hin und her, um eine gute Vermischung zu gewährleisten. Es ist wichtig, sicherzustellen, dass sich die blaue Lösung komplett gelb färbt.
- Trocknen Sie die Unterseite der Platte mit einem Papiertuch.
- Lesen Sie innerhalb 15 Minuten nach Zugabe der Stopplösung die optische Dichte (O.D.) bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Leser.

HINWEISE ZUM VERFAHREN

- Lagern Sie alle Testreagenzien bei 2 bis 8 °C. Lassen Sie die Reagenzien, mit Ausnahme der Kalibratoren und Kontrollen, Raumtemperatur erreichen, bevor Sie sie verwenden. Eine 23 ml Reagenzflasche kann eine Stunde oder länger benötigen, um Raumtemperatur zu erreichen. Lagern Sie die Kalibratoren und Kontrollen bei 2 bis 8 °C oder auf Eis, bis sie verwendet werden.
- Lassen Sie die Mikrotiterplatte Raumtemperatur erreichen, bevor Sie die Tasche öffnen. Lagern Sie die Streifen in dem Folienbeutel mit Trockenmittel, um eine Feuchtigkeitsexposition zu minimieren. Lassen Sie die unbenutzten Mikrotiterstreifen stets in dem Folienbeutel mit Trockenmittel.
- Halten Sie das Reagenz für den nächsten Schritt stets 2 bis 3 Minuten vor dem nächsten Waschschrift bereit.
- Die Zugabe der Proben, Kalibratoren und Kontrollen muss präzise sein, um genaue Probenmessungen zu erhalten. Pipettieren Sie vorsichtig und nur mit kalibrierter Ausrüstung.
- Dieser Assay kann mittels jeder validierten Waschmethode durchgeführt werden.
- Verwenden Sie bei der Durchführung der Inkubationen keine Plattenversiegler.
- Verwenden Sie keinen Schüttler für die Inkubationsschritte.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

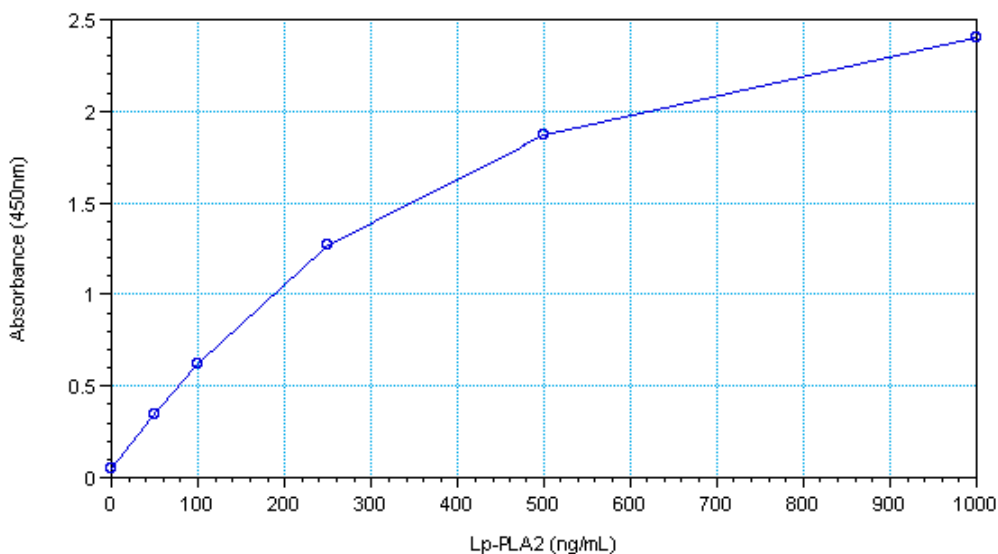
- Erstellen Sie eine Standardkalibrierungskurve, indem Sie die für jeden Kalibrator erhaltene Absorption auf der y-Achse aufzeichnen im Vergleich zur Lp-PLA₂-Konzentration in ng/ml auf der x-Achse. Verwenden Sie die Punkt-zu-Punkt-Kurvenanpassungsmethode mittels einer entsprechenden Computersoftware, um die Standardkalibrierungskurve zu erstellen.
- Bestimmen Sie unter Verwendung des Absorptionswerts für jede Probe und Kontrolle die entsprechende Lp-PLA₂-Konzentration in ng/ml aus der Kalibrierungskurve.

BEISPIEL FÜR EINE KALIBRIERUNGSKURVE

Die Ergebnisse einer typischen Standardkalibrierungskurve mit O.D.-Ableseungen bei 450 nm werden auf der y-Achse gegenüber den Lp-PLA₂-Konzentrationen (ng/ml) auf der x-Achse angezeigt. Diese

Kalibrierungskurve dient nur dem Zweck der Veranschaulichung. Der Benutzer sollte bei jeder Assaydurchführung eine Standardkalibrierungskurve erstellen.

Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Absorption (O.D. bei 450 nm)
0	0.048
50	0.348
100	0.623
250	1.269
500	1.868
1000	2.402



BESCHRÄNKUNGEN

Verfahren

- Als Voraussetzung für zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse soll das Assayverfahren erst nach vollständigem Durchlesen und Verstehen der Packungsbeilagen und in Befolgung guter Laborpraktiken durchgeführt werden.
- Die Waschverfahren sind entscheidend. Unzureichendes Waschen führt zu einer geringeren Präzision und falsch erhöhten Absorptionsablesungen.
- Wie bei jedem Assaysystem, besonders bei denen, die Maus-monoklonale Antikörper verwenden, besteht die Möglichkeit der Interferenz durch in der Probe existierende Human-Anti-Maus-Antikörper (HAMA) oder andere heterophile Störungen, was falsch erhöhte oder erniedrigte Werte verursachen könnte.
- Wie bei jeder analytischen Methode besteht die Möglichkeit, dass nicht getestete Substanzen bzw. Faktoren (z. B. technisch oder verfahrenstechnisch) den Test beeinträchtigen und zu falschen Ergebnissen führen können. Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und analytischen Methoden betrachtet werden.

Klinische Interpretation

- Die Lp-PLA₂-Spiegel sollten in Verbindung mit den klinischen Befunden und anderen diagnostischen Tests interpretiert werden.
- Dieser Test ersetzt keine Tests für das Blutcholesterin oder andere traditionelle Risikofaktoren für koronare Herzkrankheit oder ischämischen Schlaganfall.

ERWARTETE WERTE

Es wurden Proben von offensichtlich gesunden männlichen Probanden (n=251) und offensichtlich gesunden weiblichen Probanden (n=174) im klinisch relevanten Alter zwischen 40 und 70 Jahren mit dem diaDexus PLAC Test ELISA Kit ausgewertet. Die Referenzpopulation bestand aus folgenden ethnischen Gruppen: Afroamerikanisch n=26, Kaukasisch n=390, Hispanisch n=8 und nicht spezifiziert n=1. Die Verteilung der Lp-PLA₂-Werte quer durch die ganze Population und nach Geschlecht aufgespalten ist in der folgenden Tabelle aufgeführt:

	Lp-PLA ₂ ng/ml		
Perzentile	Gesamt (n=425)	Weiblich (n=174)	Männlich (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

Diese Referenzbereiche werden nur als Richtlinien bereitgestellt und sind nicht dafür vorgesehen, "kritische Werte" oder medizinische Entscheidungsgrenzen zu besprechen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzintervalle festlegen. Richtwerte zur Festlegung von Referenzintervallen finden sich im CLSI Standard C28-A2 (*How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition*). Basierend auf der durchschnittlichen Population Lp-PLA₂ Konzentration von 235 ng/ml wurde empfohlen, den Wert als klinischen Entscheidungsgrenzwert zu verwenden [16]. Kürzlich hat eine Expertengruppe empfohlen, einen Entscheidungsgrenzwert von 200 ng/ml anzuwenden, dies auf Grundlage einer signifikanten Menge an Veröffentlichungen zur Lp-PLA₂ Risikobewertung [17].

LEISTUNGSDATEN

Sensitivität

Die minimale Detektionsgrenze ist 0,34 ng/ml, wie berechnet durch Interpolation des Mittelwerts plus zwei Standardabweichungen von 20 Replikaten des 0 ng/ml Lp-PLA₂-Kalibrators.

Assaygenauigkeit

Die Intraassayvarianz und Interassayvarianz wurden bestimmt durch Testen von vier Humanserumpools mit Lp-PLA₂-Konzentrationen, die über den gesamten Kalibrierungsbereich des Assays gestreut wurden. Die Serumpools wurden im Duplikat getestet unter Verwendung einer Einzelcharge von Reagenzien auf zwei separaten Streifen pro Tag über 5 Tage mit vier Platten pro Tag. Die Daten sind im Folgenden zusammengefasst:

Serumpool	Mittlere Konzentration Lp-PLA ₂ (ng/ml)	Intraassay % CV n=80	Interassay % CV n=20	Gesamt % 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

In einer Reproduzierbarkeitsstudie, die mit 108 Serumproben durchgeführt wurde, wurden die für die ersten Vertiefungen bestimmten Assayergebnisse (Einzelassay) mit den durchschnittlichen Ergebnissen aus zwei aufeinanderfolgenden Messungen (Duplikatvertiefungen) verglichen. Die Lp-PLA₂-Spiegel der Proben reichten von 87 bis 575 ng/ml und % CV zwischen den Replikaten betrug durchschnittlich 2,3%. In einer linearen Regressionsanalyse waren einzelne Ergebnisse hoch korreliert, um durchschnittliche Ergebnisse zu duplizieren: Korrelationskoeffizient r=0,997 (Neigung 1,0 und Abschnitt -1,3 ng/ml).

Linearität

Sechs Serumproben mit bekannten hohen Lp-PLA₂-Spiegeln wurden mit sechs Serumproben mit bekannten niedrigen Lp-PLA₂-Spiegeln vermischt. Die Wiederfindungsrate wurde festgelegt als gemessener Wert geteilt durch den erwarteten Wert, multipliziert mit 100. Die durchschnittliche Wiederfindung betrug 93 %, was eine Linearität der verdünnten Proben über einen Bereich von 151 bis 810 ng/ml Lp-PLA₂ demonstriert.

Interferierende Substanzen

In Blut nachgewiesene endogene Substanzen und exogene Substanzen (gebräuchliche und verschreibungspflichtige Arzneimittel) wurden hinsichtlich einer Interferenz in dem Assay evaluiert. Fünf individuelle Serumproben mit Lp-PLA₂-Werten von 163 bis 908 ng/ml wurden mit potenziell interferierenden Substanzen versehen. Es wurden keine bemerkenswerten Interferenzen bei den folgenden Substanzen festgestellt.

<u>Potenziell interferierende Substanz</u>	<u>Endogen Testkonzentration</u>	<u>Potenziell interferierende Substanz</u>	<u>Exogen (OTC-Drogen, etc.) Testkonzentration</u>
Bilirubin	20 mg/dl	Acetaminophen	1,66 µmol/l
Cholesterin	500 mg/dl	Aspirin	3300 µmol/l
Hämoglobin	1250 mg/dl	Atorvastatin	20 µmol/l
Triglyceride	3000 mg/dl	Clopidogrel Bisulfat	140 µmol/l
Gesamt Albumin*	~6500 mg/dl	Diphenhydramin	19,6 µmol/l
		Fenofibrat	125 µmol/l
		Lisinopril	0,74 µmol/l
		Metformin	310 µmol/l
		Niacin	6500 µmol/l
		Pravastatin	10 µmol/l
		Tolbutamid	2400 µmol/l
		Vitamin C	227 µmol/l
		Warfarin	64,9 µmol/l

* 2,5 g/dl Albumin hinzugefügt zu
Plasmapool von vermutlich 4 g/dl Albumin

KLINISCHE STUDIEN

Koronare Herzkrankheit

Zur Bestimmung der Wirksamkeit des diaDexus PLAC Test ELISA Kits als Risikoprädiktor für koronare Herzkrankheit (KHK) wurden die Lp-PLA₂-Spiegel von 1348 auf der Blutbank aufbewahrten EDTA-Plasmaproben einer groß angelegten, multizentrischen epidemiologischen Studie, der Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Studie, gemessen, welche von den National Institutes of Health's National Heart, Lung, and Blood Institute gesponsert wurde. Die Teilnehmer wurden über sechs bis acht Jahre auf die Entwicklung von KHK hin untersucht. Die für den PLAC Test verwendeten Proben kamen von Probanden im Alter von 47 bis 69 Jahren, die zum Zeitpunkt der Blutabnahme keine KHK aufwiesen. Hierbei handelte es sich um eine Fall-Kohorten-Studie, in der Proben aller KHK-Fälle (607) zusammen mit 741 geeigneten Probanden ohne KHK zum Zeitpunkt der Überprüfung (Kontrollen) getestet wurden.*

Es wurden Cox-Regressionsmodelle verwendet, um die Assoziierung von Lp-PLA₂ mit KHK in einer univariaten Analyse (Modell 1), einer für demographische Zwecke adjustierten univariaten Analyse (Modell 2) und einem für demographische Zwecke und andere prognostische Faktoren adjustierten multivariaten Modell (Modell 3) zu bewerten. Unter Verwendung der Cutpoints der oberen und unteren Terzile von Lp-PLA₂, hervorgehend aus dem ARIC-Datenset (420 und 310 ng/ml, 67. bzw. 33. Perzentile), zeigten die Risikoverhältnisse der Cox-Regressionsanalysen, dass Lp-PLA₂ ein signifikanter

Prädiktor für das KHK-Risiko, für den höchsten und den mittleren im Vergleich zum niedrigsten Lp-PLA₂-Spiegel für alle Probanden war (siehe Tabelle 1). Es sollte darauf hingewiesen werden, dass sich für verschiedene klinische Populationen verschiedene Cutpoints eignen könnten.

* *HINWEIS: 86 Ergebnisse (5,5 %) befanden sich außerhalb der Akzeptanzkriterien des Assays und wurden aus der Datenanalyse ausgeschlossen.*

Tabelle 1. Risikoverhältnisse bei KHK für Probanden aller LDL-Spiegel

Lp-PLA ₂	Lp-PLA ₂ Risikoverhältnis (95% KI, p-Wert)*		
	1. Terzile	2. Terzile	3. Terzile
#KHK-Fälle/Probanden gesamt in Kategorie	127/366 (34.7%)	192/444 (43.2%)	288/538 (53.5%)
Modell 1	1.0	1.49 (1,11 bis 1,99, p=0,008)	2.50 (1,89 bis 3,31, p<0,001)
Modell 2	1.0	1.24 (0,92 bis 1,66, p=0,154)	1.76 (1,32 bis 2,36, p<0,001)
Modell 3	1.0	1.71 (1,06 bis 2,75, p=0,029)	2.12 (1,29 bis 3,48, p=0,003)

*Die unterste Terzile mit Lp-PLA₂-Werten von <310 ng/ml wurde als Referenzgruppe herangezogen.

Modell 1: univariate Analyse

Modell 2: adjustiert für Alter, Rasse und Geschlecht

Modell 3: Modell 2, plus Adjustierung für den aktuellen Raucherstatus, Blutdruck, Diabetes, HDL, LDL, CRP und Lp-PLA₂ - LDL Wechselwirkung

Eine statistische Wechselwirkung wurde zwischen Lp-PLA₂ und LDL festgestellt. Daher war es angebracht, die Lp-PLA₂-Risikoverhältnisse in den Untergruppen mit hohem und niedrigem LDL zu bewerten. Der Mittelwert für LDL in der Kohortenpopulation betrug 130 mg/dl. Dies definierte die Untergruppen mit hohem und niedrigem LDL. Die Tabellen 2a und 2b zeigen die univariate Analyse der Risikoverhältnisse in den Untergruppen mit hohem und niedrigem LDL. Die Risikoverhältnisse wurden mittels Cox-Regression unter Verwendung der gewichteten Fall-Kohorten-Methode mit Barlow-Adjustierung berechnet, n=1348.

Tabelle 2a. Risikoverhältnisse bei KHK für Probanden mit LDL <130 mg/dl

Lp-PLA ₂ [†]	Lp-PLA ₂ Risikoverhältnis (95% KI)*		
	1. Terzile	2. Terzile	3. Terzile
Risikoverhältnis	1.0	2.17 (1,41 bis 3,36)	3.52 (2,25 bis 5,49)
#KHK-Fälle/Probanden gesamt in Kategorie	51/215 (23.7%)	75/195 (38.5%)	77/163 (47.2%)

*Die unterste Terzile mit Lp-PLA₂-Werten von <310 ng/ml wurde als Referenzgruppe herangezogen.

[†]Lp-PLA₂ Cutpoints basierend auf der ARIC-Studienpopulation mit allen LDL-Spiegeln.

Tabelle 2b. Risikoverhältnisse bei KHK für Probanden mit LDL \geq 130 mg/dl

Lp-PLA ₂ [†]	Lp-PLA ₂ Risikoverhältnis (95% KI)*		
	1. Terzile	2. Terzile	3. Terzile
Risikoverhältnis	3.15 (2,08 bis 4,77)	3.66 (2,43 bis 5,51)	5.10 (3,43 bis 7,57)
#KHK-Fälle/Probanden gesamt in Kategorie	110/234 (47.0%)	126/247 (51.0%)	169/294 (57.5%)

*Die unterste Terzile für die Untergruppe mit LDL <130, mit Lp-PLA₂-Werten von <310 ng/ml wurde als Referenzgruppe herangezogen.

[†]Lp-PLA₂ Cutpoints basierend auf der ARIC-Studienpopulation mit LDL \geq 130 mg/dl.

In der Untergruppe mit hohem LDL ergaben die untergruppenspezifischen Terzilgruppen Cutpoints von 350 bzw. 460 ng/ml; das Risikoverhältnis erhöhte sich mit höheren Lp-PLA₂-Werten. Daher sollte für Individuen mit hohem LDL ein höherer Lp-PLA₂-Cutpoint in Betracht gezogen werden. Weitere Untersuchungen sind gerechtfertigt, um die Wechselwirkung zwischen Lp-PLA₂ und LDL in der Untergruppe mit hohem LDL zu bewerten. Für die Gesamtpopulation war Lp-PLA₂ ein signifikanter KHK-Risikoprädiktor in den Gruppen mit hohen und mittleren Spiegeln gegenüber der (Referenz-) Gruppe mit niedriger Lp-PLA₂.

Ischämischer Schlaganfall

Die Lp-PLA₂-Spiegel wurden in der ARIC-Studie bewertet, um ihre Wirksamkeit als Risikoprädiktor für Schlaganfall zu bestimmen. Es wurden insgesamt 223 Schlaganfallereignisse in der Probandengruppe identifiziert; davon handelte es sich bei 194 (87 %) um mit Atherosklerose assoziierten ischämischen Schlaganfall, wie von den ARIC-Versuchsleitern klassifiziert wurde. Es wurde eine ähnliche Fall-Kohorten-Studie konzipiert, in der Proben aller verfügbaren Fälle von ischämischem Schlaganfall (194) zusammen mit 762 geeigneten Probanden ohne KHK oder Schlaganfall zum Zeitpunkt der Überprüfung (Kontrollen) getestet wurden.

Wie bei der Studie zum KHK-Risiko wurden Cox-Regressionsmodelle verwendet, um die Assoziierung von Lp-PLA₂ mit Schlaganfall in einer univariaten Analyse (Modell 1), einer für demographische Zwecke adjustierten univariaten Analyse (Modell 2) und einem für demographische Zwecke und andere prognostische Faktoren adjustierten multivariaten Modell (Modell 3) und unter Berücksichtigung aller Faktoren in Zusammenhang mit dem KHK-Status (Modell 4) zu evaluieren. Auf diese Studie wurden dieselben Cutpoints der Terzile (420 und 310 ng/ml, 67. bzw. 33. Perzentile) wie in früheren Analysen angewendet. Der KHK-Status selbst erwies sich als ein Risikoprädiktor mit einem Risikoverhältnis von 2,26 in einem voll adjustierten Modell. Die Risikoverhältnisse der Cox-Regressionsanalysen zeigten, dass Lp-PLA₂ ein signifikanter und unabhängiger Risikoprädiktor für ischämischen Schlaganfall für die höchste Terzile war, verglichen mit der niedrigsten Terzile von Lp-PLA₂, für alle Probanden, mit einer nahezu zweifachen Erhöhung, sogar nach Adjustierung der Daten für Diabetes, Lipide, Blutdruck, Raucherstatus, Body-Mass-Index (BMI), andere Entzündungsmarker und den KHK-Status (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Risikoverhältnisse bei Ischämischem Schlaganfall für Alle Probanden

Lp-PLA ₂	Lp-PLA ₂ Risikoverhältnis (95% KI, p-Wert)*		
	1. Terzile	2. Terzile	3. Terzile
# Fälle Ischämischer Schlaganfall/Probanden gesamt	47/283 (16.6%)	44/305 (14.4%)	103/368 (28.0%)
Modell 1	1.0	0.85 (0,57 bis 1,29, p=0,45)	1.79 (1,27 bis 2,52, p=0,0010)
Modell 2	1.0	0.89 (0,59 bis 1,35, p=0,58)	2.09 (1,46 bis 3,01, p=0,0001)
Modell 3	1.0	0.89 (0,58 bis 1,36, p=0,59)	1.81 (1,22 bis 2,69, p=0,0034)
Modell 4	1.0	0.86 (0,56 bis 1,31, p=0,48)	1.75 (1,18 bis 2,60, p=0,0057)

*Die unterste Terzile mit Lp-PLA₂-Werten von <310 ng/ml wurde als Referenzgruppe herangezogen.

Modell 1: univariate Analyse

Modell 2: adjustiert für Alter, Rasse und Geschlecht

Modell 3: Modell 2, plus Adjustierung für Diabetes, LDL, HDL, Blutdruck, Rauchen, BMI und CRP

Modell 4: Modell 3, plus Adjustierung für KHK

Weitere Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu bestimmen, ob Lp-PLA₂ prädiktiv für ischämischen Schlaganfall für die gesamte Bandbreite des systolischen Blutdrucks (SBD) in der Bevölkerung war und um zu bestimmen, ob Blutdruck und Lp-PLA₂ bei der Bewertung des Risikos für ischämischen Schlaganfall additiv waren. Die Cutpoints der Terzile für systolischen Blutdruck wurden durch die 33. und 67. Perzentile der Population zugeteilt (113 bzw. 130 mm Hg). Die Studienpopulation wurde in einen niedrigen, mittleren und hohen SBD-Bereich aufgeteilt (1., 2. und 3. Terzile) und einen niedrigen und hohen Lp-PLA₂-Bereich (unter und über dem Mittelwert, 377 ng/ml in der ARIC-Studie). Das relative Risiko jeder Gruppe wurde mit dem Risiko für Ereignisse verglichen, die mit der Gruppe in der 1. Terzile von SBD und der Gruppe unter dem Mittelwert von Lp-PLA₂ assoziiert wurden (Tabelle 4).





Tabelle 4. Risikoverhältnisse bei Ischämischem Schlaganfall: Additive Effekte von Lp-PLA₂ und Systolischem Blutdruck

		Lp-PLA ₂	
		Unter Mittelwert	Über Mittelwert
SBD (mm Hg)	# Fälle Ischämischer Schlaganfall/Probanden gesamt in Kategorie	68/478 (14.2%)	126/478 (26.4%)
<113	29/270 (10.7%)	1.00	2.29 (p=0,03)
113 bis 130	60/337 (17.8%)	2.05 (p=0,06)	3.53 (p=0,0004)
>130	105/349 (30.1%)	3.52 (p=0,0005)	6.75 (p<0,0001)

Die Individuen über dem Mittelwert der Lp-PLA₂-Konzentration in der ARIC-Studie und mit systolischem Blutdruck in der obersten Terzile (>130 mm Hg) wiesen ein Risikoverhältnis von 6,75 auf (p<0,0001), verglichen mit jenen Individuen unter dem Mittelwert von Lp-PLA₂ und mit Blutdruck in der untersten Terzile. Diese Ergebnisse zeigten, dass Lp-PLA₂ und Blutdruck bei der Risikobestimmung additiv waren

und dass Individuen in den höchsten Gruppen beider Variablen dem höchsten Risiko ausgesetzt waren, einen mit Atherosklerose assoziierten ischämischen Schlaganfall zu erleiden.

PRODUKTSICHERHEITSINFORMATIONEN

Kalibratorenset (1-6), Kontrolle Niedrig und Hoch  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	20X Waschpuffer  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	Stopplösung  [Xi] R34/41 S26/36/37/39	Konjugat, TMB Reagenz  [Xi]
--	--	--	---

R34	Verursacht Brandwunden
R36	Reizt die Augen
R38	Reizt die Haut
F41	Ernsthafte Gefahr für die Augen
S26	Bei Augenkontakt, spülen Sie die Augen umgehend mit ausreichend Wasser aus und suchen Sie einen Arzt auf
S36/37/39	Tragen Sie passende Schutzkleidung, Handschuhe, Auge und Gesichtschutz

LITERATURVERZEICHNIS

- [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.