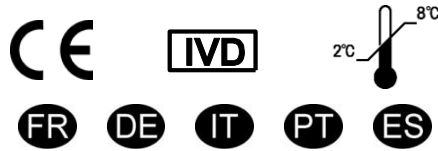


Test immunologico per la determinazione quantitativa della
Lp-PLA₂ nel siero e nel plasma umani



www.plactest.com

diaDexus



diaDexus, Inc.

349 Oyster Point Blvd.

South San Francisco, CA 94080 USA

Tel: 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, Germany

Legenda dei simboli

REF	Numero di catalogo	IVD	Dispositivo diagnostico <i>in vitro</i>
PLATE	Piastra rivestita di anticorpo	LOT	Lotte
CAL	Calibratore		Data di scadenza
CONTROL LOW	Controllo basso		Conservare ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C
CONTROL HIGH	Controllo alto		Irritante
WASH	Tampone di lavaggio		Consultare le Istruzioni per l'uso
CONJ	Coniugato		Produttore
TMB	Substrato TMB	EC REP	Responsabile autorizzato per la Comunità Europea
STOP	Soluzione di stop	CE	Conformità Europea

Leggere interamente il presente foglio illustrativo prima di usare il prodotto.
Seguire attentamente le istruzioni durante l'esecuzione delle analisi. La mancata
osservanza delle istruzioni può determinare risultati non precisi.

Questo prodotto è coperto dai brevetti USA n. 5532152, 5641669, 5698403, 5847088, 5968818,
5981252, 6177257, 7045329 e 7416853, e dai brevetti europei n. 658205 e 673426. Altri brevetti in attesa
di approvazione.

PLAC e PLAC sono marchi registrati di diaDexus, Inc., registrati negli Stati Uniti.

USO PREVISTO

Il kit ELISA per analisi PLAC[®] di diaDexus è un saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della Lp-PLA₂ (fosfolipasi A₂ associata alla lipoproteina) nel plasma e nel sangue umani, che può essere usato insieme alla valutazione clinica e all'analisi del livello di rischio del paziente come ausilio nella prevenzione della cardiopatia coronarica e dell'infarto ischemico associati ad arteriosclerosi.

RIEPILOGO E DESCRIZIONE

La Lp-PLA₂ è una serina lipasi calcio-indipendente associata alla lipoproteina a bassa densità (LDL) e, in misura minore, alla lipoproteina ad alta densità (HDL) presente nel plasma e nel siero umano [1] che differisce dalle altre fosfolipasi come cPLA₂ e sPLA₂ [2]. Lp-PLA₂ è prodotta dai macrofagi e da altre cellule infiammatorie e si esprime manifestando concentrazioni più forti nelle lesioni aterosclerotiche avanzate rispetto a quelle in stadio iniziale [3,4]. Molte attestazioni suggeriscono che l'ossidazione della LDL ha un ruolo critico nello sviluppo e nella progressione dell'arteriosclerosi [5,6]. La Lp-PLA₂ partecipa alla modificazione ossidativa delle LDL provocando l'idrolisi della fosfatidilcolina ossidata che genera la lisofosfatidilcolina e acidi grassi liberi ossidati, entrambi prodotti pro-infiammatori che contribuiscono alla formazione di placche arteriosclerotiche [7,8,9]. La Lp-PLA₂ ha dimostrato una variazione intra- e inter-individuale modesta rispetto ad altri marker lipidici delle malattie cardiovascolari e una variazione decisamente minore rispetto alla proteina C reattiva (CRP). Inoltre, la Lp-PLA₂ non incrementa in condizioni infiammatorie sistemiche e può essere considerata un marker più specifico delle infiammazioni vascolari. La variazione biologica relativamente ridotta della Lp-PLA₂ e la sua specificità sono importanti per la rilevazione e il monitoraggio del rischio di malattia cardiovascolare [10,11].

Livelli elevati di Lp-PLA₂, misurati mediante esame immunologico, sono stati rilevati in pazienti con malattia cardiaca coronarica (CHD) comprovata da angiografia rispetto ai gruppi di controllo di età equivalente [1]. In uno studio di controllo retrospettivo sui casi, effettuato utilizzando campioni di pazienti maschi affetti da ipercolesterolemia (n=1740) dello studio scozzese di prevenzione coronarica WOSCOPS (West of Scotland Coronary Prevention Study), il rischio di cardiopatia coronarica osservato è risultato pari al doppio nei soggetti con livelli di Lp-PLA₂ più alti rispetto a quelli con livelli più bassi. Inoltre, è stato dimostrato che l'associazione del rischio di malattia cardiaca coronarica alla Lp-PLA₂ è indipendente dalla LDL e dagli altri marker infiammatori come la proteina C reattiva e il fibrogene. Nelle loro conclusioni gli autori dello studio hanno affermato che "livelli elevati di fosfolipasi A₂ associata alla lipoproteina sembrano essere associati ad un fattore di rischio elevato di cardiopatia coronarica, con conseguenti implicazioni per l'aterogenesi e la valutazione del rischio". Un altro rapporto, riferito a campioni dello studio ARIC sul rischio di aterosclerosi nelle comunità (Atherosclerosis Risk in Communities), in cui sono stati esaminati 12819 uomini e donne di mezza età apparentemente sani (di età compresa tra 45 e 64 anni) per sei - otto anni, la Lp-PLA₂ è risultata essere un forte predittore del rischio di malattia cardiaca coronarica. Per i pazienti con un livello di LDL inferiore a 130 mg/dL, la Lp-PLA₂ è risultata significativamente e indipendentemente associata ad un rischio due volte maggiore di eventi di malattia cardiaca coronarica, compresi la necessità di rivascolarizzazione, l'infarto miocardico e il decesso a seguito di malattia cardiaca [13].

Lo studio ARIC è stato nuovamente analizzato allo scopo di determinare il rischio di infarto associato a livelli alti di Lp-PLA₂. Nel gruppo di studio sono stati identificati un totale di 223 eventi di infarto, di cui 194 (87%) riconducibili a infarto ischemico associato ad arteriosclerosi, stando alla classificazione dei ricercatori dello studio ARIC. Questa proporzione di infarto ischemico rispetto al totale è in linea con la percentuale rilevata nella popolazione generale [14]. I risultati di questo studio indicano che la Lp-PLA₂ è un forte predittore del rischio di infarto, con un livello di rischio pari a circa il doppio, anche dopo la correzione della pressione sanguigna, dei lipidi, del diabete, dell'indice della massa corporea e di altri marker infiammatori [15].

PRINCIPIO ANALITICO

Il kit ELISA per analisi PLAC della società diaDexus è un saggio immunoenzimatico a sandwich che utilizza due anticorpi monoclonali specifici per la misurazione diretta della concentrazione della Lp-PLA₂ nel plasma e nel sangue umani. Il sistema di analisi utilizza un anticorpo monoclonale anti-Lp-PLA₂ (2C10) nei confronti della Lp-PLA₂ per l'immobilizzazione della fase solida sulla piastra microtiter. Il campione è aggiunto alla piastra e incubato per 10 minuti a 20 - 26°C. Un secondo anticorpo

monoclonale anti-Lp-PLA₂ (4B4) marcato con l'enzima perossidasi di rafano (HRP) viene quindi aggiunto e reagisce con l'antigene immobilizzato a 20 - 26°C per 180 minuti, determinando la cattura delle molecole Lp-PLA₂ fra la fase solida e gli anticorpi etichettati con enzimi. Il substrato, tetrametilbenzidina (TMB), viene poi aggiunto e incubato a 20 - 26°C per 20 minuti, sviluppando un colore blu. Lo sviluppo di colore viene arrestato con l'aggiunta di soluzione di stop che cambia il colore in giallo. Si misura l'assorbanza della reazione a 450 nm ed è direttamente proporzionale alla concentrazione della Lp-PLA₂ presente. Viene usato un set di calibratori della Lp-PLA₂ per tracciare la curva standard dell'assorbanza rispetto alla concentrazione della Lp-PLA₂, usata per determinare la concentrazione della Lp-PLA₂ nel campione del paziente. Vengono forniti due livelli di controllo per monitorare la performance all'interno dell'intervallo clinico del test.

REAGENTI E MATERIALI

Materiali forniti con il kit: (sufficienti per 96 pozzetti)

COD.	SIMBOLO	DESCRIZIONE DEI COMPONENTI	QUANTITÀ
60001	PLATE	Piastra rivestita di anticorpo piastra microtiter rivestita di anticorpo monoclonale murino anti-Lp-PLA ₂ (2C10)	1
60006	CAL	Calibratori (0, 50, 100, 250, 500 e 1000 ng/mL)	1 set, 0,25 mL cadauno
60007		antigene ricombinante Lp-PLA ₂ diaDexus (DDX-RA) in un solvente stabilizzante per proteine	
60008			
60009			
60010			
60011			
60002	WASH	20X Tampone di lavaggio Detergente non-ionico in soluzione tampone	50 mL
60003	CONJ	Coniugato Anticorpo monoclonale murino anti-Lp-PLA ₂ (4B4) coniugato con enzima perossidasi di rafano in un reagente tamponato con proteine di trasporto di tipo bovino e murino	23 mL
60004	TMB	Reagente TMB 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina in una soluzione tampone leggermente acida	11 mL
60005	STOP	Soluzione di Stop 1N HCl	11 mL
65009	CONTROL LOW	Controllo basso (~150 ng/mL) antigene ricombinante Lp-PLA ₂ diaDexus (DDX-RA) in una matrice proteica (BSA) tamponata liquida	1 flacone, 0,5 mL
65010	CONTROL HIGH	Controllo alto (~350 ng/mL) antigene ricombinante Lp-PLA ₂ diaDexus (DDX-RA) in una matrice proteica (BSA) tamponata liquida	1 flacone, 0,5 mL
FMD-01-026		Certificato di analisi – Intervallo di controllo Gli intervalli di controllo per il lotto sono indicati sul Certificato di analisi	1 cadauno

Materiali richiesti ma non forniti:

- Pipette di precisione a canale singolo e multiplo: 0,02; 0,10; 0,20 mL
- Punte per pipette monouso (una pipetta nuova deve essere utilizzata per ogni aggiunta di campioni o reagenti diversi durante il saggio)
- Agitatore Vortex o equivalente
- Acqua deionizzata
- Un lettore di piastra microtiter con ampiezza di banda uguale o inferiore a 10 nm e una densità ottica (D.O.) uguale o superiore a 3 a 450 nm
- Software per computer in grado di adattare la curva punto a punto per calcolare la concentrazione di analita dalla densità ottica (opzionale)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Considerare tutti i campioni di sangue come potenzialmente infetti.
- Non lasciare i campioni esposti a temperatura ambiente per oltre 6 ore (questo intervallo di tempo comprende il tempo necessario per il prelievo dei campioni, l'elaborazione, il trasporto e per effettuare l'analisi in laboratorio). Questo tempo non include l'incubazione sulla piastra ELISA.
- La conservazione dei campioni ad una temperatura di -20°C per oltre 24 ore è sconsigliata.
- Alcuni componenti sono etichettati con precauzioni di sicurezza. Vedere la sezione Informazioni sulla sicurezza dei prodotti.
- Smaltire i reagenti in conformità ai regolamenti applicabili.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non miscelare reagenti di kit e con numeri di lotto diversi.
- Non utilizzare in caso di contaminazione visibile.
- L'emolisi può influire sui risultati. Non analizzare campioni emolizzati.
- È consigliabile includere in ciascuna analisi sia un controllo alto che uno basso. Se i valori di controllo sono esterni ai limiti accettabili, ripetere l'analisi. Ulteriori test di controllo della qualità possono essere necessari, a seconda delle esigenze locali e statali.
- Per evitare risultati inesatti, conservare il materiale come indicato.
- Gli intervalli di controllo forniti sono stati derivati da analisi ripetute di lotti di controllo specifici utilizzando i kit ELISA per analisi PLAC e devono essere utilizzati come guide. Le medie di ciascun laboratorio possono variare dai valori indicati. Le variazioni tra i laboratori possono essere causate da differenze nella tecnica o dalla variabilità dei reagenti. Si raccomanda ad ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli accettabili.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Conservare i kit di analisi non aperti tra 2 e 8°C al momento del ricevimento. Inoltre, mantenere la piastra microtiter sigillata nel sacchetto di alluminio con essiccante per ridurre al minimo l'esposizione all'umidità. I kit di analisi aperti rimarranno stabili fino alla data di scadenza riportata, a condizione di essere conservati come descritto in precedenza.

Preparare la soluzione tampone di lavaggio 1X diluendo la soluzione tampone di lavaggio 20X con acqua deionizzata 1:20. Miscelare 1 parte di soluzione tampone di lavaggio a 19 parti di acqua deionizzata. Conservare a temperatura ambiente (20 - 26°C). Usare la soluzione tampone di lavaggio 1X entro quattro settimane dalla preparazione. Se viene osservata una crescita microbica, gettare.

RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Non è necessario tenere a digiuno il paziente.
- Raccogliere i campioni di sangue in
 - provette di separazione con gel di siero o plasma
 - provette di raccolta con EDTA o plasma eparinizzato
 - qualsiasi provetta di raccolta di siero.
- Analizzare i campioni utilizzando procedure di separazione standard.
 - È consigliabile centrifugare e separare i campioni entro quattro ore dal prelievo venoso, in conformità con le buone pratiche di laboratorio, ma non oltre 36 ore dal prelievo del campione di sangue. I campioni devono essere conservati refrigerati ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C.
- Campioni di sangue non analizzati:
 - Conservare e trasportare i campioni ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C ed analizzarli entro 36 ore dalla raccolta.
- Campioni analizzati:
 - I campioni devono essere conservati refrigerati ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C per almeno 24 ore dopo il prelievo e prima dell'esecuzione dell'analisi.
 - I campioni possono essere analizzati entro un massimo di 7 giorni dopo il prelievo, se conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C.
 - Per un periodo di stoccaggio più lungo, i campioni di siero / plasma devono essere conservati ad una temperatura pari o inferiore a -70°C. Una volta scongelato, il campione può essere testato fino a 7 giorni se conservato ad una temperatura compresa entro 2 e 8°C. I campioni possono essere congelati e scongelati due volte senza compromettere la quantificazione della Lp-PLA₂.

PROCEDURA DI ANALISI

Calibrazione

Ogni piastra o striscia di analisi deve essere calibrata con una curva di calibrazione piena (6 punti). Una curva standard è generata con un modello di adattamento della curva punto a punto. Controllare la curva di calibrazione utilizzando almeno due livelli di controlli in conformità con i requisiti del proprio laboratorio. Calibrare i controlli per ogni piastra di analisi.

Controllo qualità

Provare i controlli alti e bassi con ogni analisi. Se i valori di controllo sono esterni ai limiti accettabili, ripetere l'analisi. Ulteriori test di controllo della qualità possono essere necessari, a seconda delle regolamentazioni o dei requisiti di accreditamento locali e statali e/o federali.

Passaggi preparatori

1. Portare la piastra microtiter, il coniugato, il tampone di lavaggio e la TMB a temperatura ambiente (da 20 a 26 °C) prima dell'uso.
2. Rimuovere la cornice della piastra e il numero necessario di strisce rivestite dal sacchetto di alluminio. Risigillare completamente la busta contenente le strisce inutilizzate con l'essiccante fornito nella busta e conservare tra 2 e 8°C.
3. Preparare 1X soluzione tampone di lavaggio diluendo la soluzione tampone di lavaggio 20X con acqua deionizzata 1:20 (1 parte di soluzione tampone di lavaggio e 19 parti di acqua deionizzata). Conservare a temperatura ambiente (20 - 26°C). Usare 1X soluzione tampone di lavaggio entro quattro settimane dalla preparazione.
4. Lasciare scongelare i campioni paziente tra 2 e 8°C, se necessario, quindi, non appena sono scongelati, collocarli su del ghiaccio ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C.
5. Conservare i controlli ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C o su del ghiaccio fino all'uso.
6. Miscelare bene i campioni e i controlli nel Vortex. Evitare la formazione di schiuma.

Incubazione del campione

1. Utilizzando una pipetta calibrata e una punta di precisione appropriata a basso volume, dispensare 20 µL di calibratori, campioni e controlli nei pozzetti appropriati dopo avere mescolato col vortex. Utilizzare una nuova punta per ogni calibratore, controllo o campione.
2. Lasciare i campioni incubare sulla piastra per 10 ± 2 minuti prima di aggiungere il coniugato.
3. Pipettare 200 µL di coniugato a temperatura ambiente nei pozzetti appropriati delle piastre microtiter rivestite. Evitare la contaminazione aggiungendo il coniugato senza toccare i campioni con la punta della pipetta. Se vi è contaminazione crociata, cambiare la punta e continuare ad aggiungere il coniugato nei pozzetti.
4. Incubare per 3 ore a temperatura ambiente.
5. Al termine del periodo di incubazione, lavare i micropozzetti quattro (4) volte con almeno 300 µL della soluzione tampone di lavaggio 1X in dotazione a temperatura ambiente. (NON USARE ACQUA DEL RUBINETTO O ACQUA DISTILLATA.)
6. Asciugare la piastra su carta assorbente dopo il lavaggio finale. Procedere immediatamente (in meno di 2 minuti) alla fase successiva. Non lasciare che la piastra microtiter si secchi.

Incubazione del substrato

1. Pipettare 100 µL di reagente TMB a temperatura ambiente in ogni pozzetto.
2. Fare ruotare delicatamente la piastra su una superficie piana per 10 - 15 secondi per garantire la miscelazione.
3. Incubare la piastra al buio, per 20 minuti, a temperatura ambiente.
4. Bloccare la reazione aggiungendo 100 µL di soluzione di stop a temperatura ambiente in ogni pozzetto.
5. Fare ruotare delicatamente la piastra su una superficie piana per 20 - 30 secondi per garantire la miscelazione. È importante assicurarsi che il colore blu diventi completamente giallo.
6. Asciugare l'umidità dal fondo della piastra con un panno di carta.
7. Entro 15 minuti dall'aggiunta della soluzione di stop, leggere la densità ottica (D.O.) a 450 nm utilizzando un lettore di piastra microtiter.

NOTE SULLA PROCEDURA

- Conservare tutti i reagenti del test ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C. Fatta eccezione per i calibratori e i controlli, lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente prima dell'uso. Un flacone di reagente di 23 mL può richiedere una o più ore per raggiungere la temperatura ambiente. Conservare i calibratori e i controlli ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C o su del ghiaccio fino all'uso.
- Portare la piastra microtiter a temperatura ambiente (da 20 a 26 °C) prima di aprire la busta. Conservare le strisce nel sacchetto di alluminio con l'essiccante per ridurre al minimo l'esposizione all'umidità. Conservare sempre i pozzetti inutilizzati nel sacchetto di alluminio con essiccante.
- Tenere sempre pronto il reagente della fase successiva 2 a 3 minuti prima della fase di lavaggio.
- Per una misurazione accurata dei campioni, l'aggiunta di campioni, calibratori e controlli deve essere precisa. Pipettare con cura utilizzando solo apparecchiature calibrate.
- L'analisi può essere effettuata con qualsiasi metodo di lavaggio convalidato.
- Non usare adesivo copripiastra durante l'incubazione.
- Non utilizzare un agitatore per piastra per le fasi di incubazione.

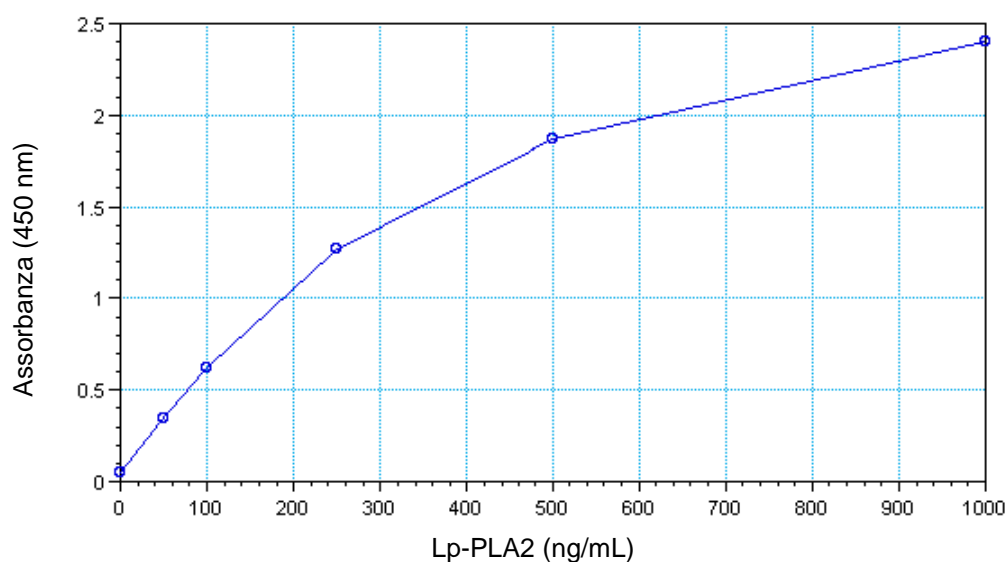
CALCOLO DEI RISULTATI

1. Costruire una curva di calibrazione standard tracciando l'assorbanza ottenuta per ogni calibratore sull'asse delle ordinate (Y) contro la concentrazione di Lp-PLA₂ in ng/mL per l'asse delle ascisse (X). Utilizzare un software per computer appropriato per adattare la curva punto a punto per costruire la curva di calibrazione standard.
2. Utilizzando il valore dell'assorbanza per ogni campione e controllo, determinare le corrispondenti concentrazioni di Lp-PLA₂ in ng/mL dalla curva di calibrazione.

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE

I risultati di una tipica curva di calibrazione standard con letture di D.O. a 450 nm sono mostrate sull'asse Y contro le concentrazioni di Lp-PLA₂ (ng/mL) riportate sull'asse X. Questa curva di calibrazione va intesa a solo scopo illustrativo. Una curva di calibrazione standard deve essere generata dall'utente per ciascun analisi eseguita.

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



LIMITAZIONI

Procedura

- Per ottenere risultati affidabili e riproducibili, è indispensabile effettuare la procedura di analisi dopo aver compreso integralmente le istruzioni contenute nel foglio illustrativo e in conformità con le buone pratiche di laboratorio.
- Le procedure di lavaggio sono critiche. Un lavaggio insufficiente si tradurrà in una scarsa precisione e in letture dell'assorbanza erroneamente elevate.
- Come con tutti gli esami che utilizzano anticorpi monoclonali murini, non è possibile escludere l'interferenza con gli anticorpi umani antimurini (HAMA) o altre interferenze eterofile presenti nel campione, che possono talvolta produrre valori erroneamente alti o bassi.
- Come con tutti gli altri metodi analitici, non è possibile escludere che le sostanze e/o i fattori non analizzati (ad esempio di natura tecnica o procedurale) possano interferire con i risultati dell'analisi e produrre risultati fittizi. I risultati devono essere interpretati insieme ad altri risultati clinici e metodi analitici.

Interpretazione clinica

- I livelli della Lp-PLA₂ devono essere interpretati insieme agli altri esiti clinici e ai risultati degli altri esami diagnostici.
- Questo esame non sostituisce l'esame del colesterolo nel sangue o altri fattori di rischio tradizionali identificati per la cardiopatia coronarica o l'infarto ischemico.

VALORI ATTESI

Il kit ELISA per l'analisi PLAC di diaDexus è stato utilizzato per analizzare campioni di uomini apparentemente sani (n=251) e di donne apparentemente sane (n=174) compresi nella fascia di età clinicamente rilevante di 40-70 anni. La popolazione di riferimento era rappresentata dai seguenti gruppi etnici: etnia afro-americana n=26, caucasica n=390, ispanica n=8 ed etnia non specificata n=1. La distribuzione dei valori della Lp-PLA₂ nell'intera popolazione, suddivisa per sesso, è riportata nella seguente tabella:

Percentile	Lp-PLA ₂ ng/mL		
	Tutti (n=425)	Femmine (n=174)	Maschi (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

Questi intervalli di riferimento vengono indicati esclusivamente come linee guida e non intendono definire "valori critici" o limiti decisionali medici. Pertanto, ciascun laboratorio dovrà determinare i propri intervalli di riferimento. Per informazioni su come definire gli intervalli di riferimento, consultare la normativa CLSI C28-A2 (*How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition*). In base alla concentrazione di Lp-PLA₂ di 235 ng/mL riscontrata nella popolazione media, si propone l'utilizzo di tale valore quale soglia per la decisione clinica [16]. Più di recente, un consensus panel di esperti ha avanzato l'ipotesi che si possa applicare una soglia decisionale di 200 ng/mL, in base ad un corpo significativo di pubblicazioni sulla valutazione del rischio di Lp-PLA₂ [17].

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Sensibilità

Il limite minimo di rilevazione è pari a 0,34 ng/mL, calcolato per interpolazione della media più due deviazioni standard di 20 repliche del calibratore Lp-PLA₂ 0 ng/mL.

Precisione dell'analisi

La variabilità intra-saggio ed inter-saggio sono state determinate analizzando quattro pool di siero umano con concentrazioni di Lp-PLA₂ distribuite sull'intero intervallo di calibrazione del saggio. I pool di siero sono stati analizzati utilizzando un singolo lotto di reagenti, in duplicato, su due distinte strisce di pozzetti al giorno, per 5 giorni, quattro piastre al giorno. I dati sono riepilogati nella seguente tabella:

Pool di siero	Concentrazione media della Lp-PLA ₂ (ng/mL)	% CV intra-saggio n=80	% CV inter-saggio n=20	% CV Totale 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 uno studio di ripetibilità condotto con un set di 108 campioni di siero, i risultati del saggio determinati dai primi pozzetti (saggio a punto singolo) sono stati confrontati con i risultati medi di due misurazioni successive (pozzetti duplicati). I livelli della Lp-PLA₂ dei campioni variavano da 87 a 575 ng/mL, e la % CV media tra le repliche è stata del 2,3%. In un'analisi di regressione lineare, i risultati dei singoli punti sono stati strettamente correlati ai risultati medi duplicati: coefficiente di correlazione $r = 0,997$ (pendenza 1,0 e intercetta -1,3 ng/mL).

Linearità

Sei campioni di siero con livelli elevati noti di Lp-PLA₂ sono stati mescolati con sei campioni di siero con livelli bassi noti di Lp-PLA₂. La percentuale di recupero è stata determinata come il valore misurato diviso per il valore previsto, moltiplicato per 100. Il recupero medio è stato del 93%, dimostrando la linearità dei campioni diluiti in un intervallo di Lp-PLA₂ tra 151 e 810 ng/mL.

Sostanze interferenti

Le sostanze endogene trovate nel sangue e le sostanze esogene (farmaci comuni e da prescrizione) sono state valutate ai fini della determinazione delle possibili interferenze con l'analisi. Cinque singoli campioni di siero con valori di Lp-PLA₂ compresi tra 163 e 908 ng/mL sono stati iniettati con possibili sostanze interferenti. Non sono state osservate interferenze apprezzabili per le seguenti sostanze ai livelli iniettati testati.

Sostanze endogene		Sostanze esogene (farmaci da banco, ecc.)	
<u>Possibile sostanza interferente</u>	<u>Concentrazione usata per l'analisi</u>	<u>Possibile sostanza interferente</u>	<u>Concentrazione usata per l'analisi</u>
Bilirubina	20 mg/dL	Acetaminofene	1,66 µmol/L
Colesterolo	500 mg/dL	Aspirina	3300 µmol/L
Emoglobina	1250 mg/dL	Atorvastatina	20 µmol/L
Trigliceridi	3000 mg/dL	Bisolfato di Clopidogrel	140 µmol/L
Albumina totale*	~6500 mg/dL	Difenidrammina	19,6 µmol/L
		Fenofibrato	125 µmol/L
		Lisinopril	0,74 µmol/L
		Metformina	310 µmol/L
		Niacina	6500 µmol/L
		Pravastatina	10 µmol/L
		Tolbutamide	2400 µmol/L
		Vitamina C	227 µmol/L
		Warfarin	64,9 µmol/L

* 2,5 g/dL di albumina aggiunti al pool di plasma di presuntivamente 4 g/dl di albumina

STUDI CLINICI

Malattia cardiaca coronarica

Per determinare l'efficacia del kit ELISA per l'analisi PLAC di diaDexus come predittore della malattia cardiaca coronarica (CHD), sono stati misurati i livelli della Lp-PLA₂ in 1348 campioni di plasma EDTA, contenuti in banche del sangue e provenienti da un ampio studio epidemiologico multicentrico, ossia dallo studio sul rischio di aterosclerosi nelle comunità (ARIC, Atherosclerosis Risk In Communities), finanziato dall'Istituto Nazionale per lo studio di cuore, polmoni e sangue (National Heart, Lung, and Blood Institute). Lo sviluppo della cardiopatia coronarica è stato monitorato nei pazienti per un periodo dai sei a otto anni. I campioni usati per l'analisi PLAC provenivano da partecipanti di età compresa tra 47 e 69 anni, che non presentavano sintomi di cardiopatia coronarica al momento del prelievo del campione. Si è trattato di uno studio di coorte, in cui i campioni di tutti i casi CHD (607) sono stati esaminati insieme a quelli di 741 partecipanti che non presentavano sintomi di CHD al momento del censimento (esami di controllo), abbinati in modo appropriato.*

Sono stati utilizzati modelli di regressione di Cox per valutare l'associazione della Lp-PLA₂ alla malattia cardiaca coronarica mediante un'analisi univariata (modello 1), un'analisi univariata corretta in base ai dati demografici (modello 2) e altri fattori prognostici (modello 3). I rapporti di rischio delle analisi di regressione di Cox, ottenuti utilizzando i valori soglia dei terzili alti e bassi della Lp-PLA₂ generati dal set di dati dello studio ARIC (420 e 310 ng/mL, corrispondenti rispettivamente al 67° e 33° percentile), hanno dimostrato che la Lp-PLA₂ era un forte predittore del rischio di malattia cardiaca coronarica per i livelli più alti e intermedi, rispetto ai livelli più bassi della Lp-PLA₂, per tutti i partecipanti (vedere la Tabella 1). Si noti che può essere opportuno usare altri valori soglia per popolazioni cliniche diverse.

* *NOTA: 86 risultati (5,5%) erano esterni ai criteri di accettazione e sono stati pertanto esclusi dall'analisi dei dati.*

Tabella 1. Rapporti di rischio di malattia cardiaca coronarica (CHD) per pazienti con tutti i livelli di LDL

Lp-PLA ₂	Rapporto di rischio Lp-PLA ₂ (95% CI, valore di p)*		
	Terzile 1	Terzile 2	Terzile 3
N. di casi di CHD/ totale pazienti in ciascuna categoria	127/366 (34,7%)	192/444 (43,2%)	288/538 (53,5%)
Modello 1	1,0	1,49 (da 1,11 a 1,99; p=0,008)	2,50 (da 1,89 a 3,31; p<0,001)
Modello 2	1,0	1,24 (da 0,92 a 1,66; p=0,154)	1,76 (da 1,32 a 2,36; p<0,001)
Modello 3	1,0	1,71 (da 1,06 a 2,75; p=0,029)	2,12 (da 1,29 a 3,48; p=0,003)

*Il terzile più basso con valori Lp-PLA₂ <310 ng/mL è stato usato come gruppo di riferimento.

Modello 1: analisi univariata

Modello 2: correzione per età, etnia e sesso

Modello 3: modello 2 più correzione per pazienti fumatori, pressione sanguigna, diabete, HDL, LDL, CRP e interazione Lp-PLA₂ – LDL

È stata rilevata un'interazione statistica tra la Lp-PLA₂ e la LDL. Pertanto, è stato ritenuto appropriato valutare i fattori di rischio Lp-PLA₂ nei sottogruppi con valori LDL alti e bassi. Il valore medio della LDL per la popolazione di coorte era di 130 mg/dL. Questo valore è stato usato per definire i sottogruppi con valori LDL alti e bassi. Le tabelle 2a e 2b rappresentano l'analisi univariata dei rapporti di rischio per i sottogruppi con valori LDL alti e bassi. I rapporti di rischio sono stati calcolati utilizzando la regressione di Cox e un metodo di coorte per caso ponderato con correzione di Barlow, n=1348.

Tabella 2a. Rapporti di rischio di malattia cardiaca coronarica per pazienti con LDL <130 mg/dL

	Rapporto di rischio Lp-PLA ₂ (95% CI)*		
Lp-PLA ₂ [†]	Terzile 1	Terzile 2	Terzile 3
Rapporto di rischio	1,0	2,17 (da 1,41 a 3,36)	3,52 (da 2,25 a 5,49)
N. di casi di CHD/totale pazienti in ciascuna categoria	51/215 (23,7%)	75/195 (38,5%)	77/163 (47,2%)

*Il terzile più basso con valori Lp-PLA₂ <310 ng/mL è stato usato come gruppo di riferimento.

[†]Valori soglia della Lp-PLA₂ basati sulla popolazione dello studio ARIC e riferiti a tutti i livelli della LDL.

Tabella 2b. Rapporti di rischio di malattia cardiaca coronarica per pazienti con LDL ≥130 mg/dL

	Rapporto di rischio Lp-PLA ₂ (95% CI)*		
Lp-PLA ₂ [†]	Terzile 1	Terzile 2	Terzile 3
Rapporto di rischio	3,15 (da 2,08 a 4,77)	3,66 (da 2,43 a 5,51)	5,10 (da 3,43 a 7,57)
N. di casi di CHD/totale pazienti in ciascuna categoria	110/234 (47,0%)	126/247 (51,0%)	169/294 (57,5%)

*Il terzile più basso per il sottogruppo con valori LDL <130, con valori Lp-PLA₂ <310 ng/mL, è stato usato come gruppo di riferimento.

[†]Valori soglia della Lp-PLA₂ basati sulla popolazione dello studio ARIC con LDL ≥130 mg/dL.

Nel sottogruppo con valore di LDL alto, i gruppi dei terzili specifici dei sottogruppi hanno riportato valori soglia compresi tra 350 e 460 ng/mL; il rapporto di rischio aumentava in presenza di valori della Lp-PLA₂ più alti. Quindi, per i pazienti con un valore di LDL alto, è opportuno considerare un valore soglia della Lp-PLA₂ più elevato. In futuro verranno effettuate ulteriori ricerche per valutare l'interazione tra la Lp-PLA₂ e la LDL nel sottogruppo con valori LDL alti. Relativamente alla popolazione complessiva, la Lp-PLA₂ si è rilevato un forte predittore di malattia cardiaca coronarica per i gruppi con valori alti e intermedi rispetto a quelli con valori Lp-PLA₂ bassi (gruppo di riferimento).

Infarto ischemico

Sono stati valutati i livelli della Lp-PLA₂ nello studio ARIC allo scopo di determinare la sua efficacia come predittore del rischio di infarto. Nel gruppo di studio sono stati identificati un totale di 223 eventi di infarto, di cui 194 (87%) riconducibili a infarto ischemico associato ad arteriosclerosi, stando alla classificazione dei ricercatori dello studio ARIC. È stato sviluppato uno studio di coorte simile, in cui i campioni di tutti i casi di infarto ischemico (194) sono stati esaminati insieme a quelli di 762 partecipanti che non presentavano sintomi di malattia cardiaca coronarica o infarto ischemico al momento del censimento (esami di controllo), abbinati in modo appropriato.

Come per lo studio relativo al rischio di malattia cardiaca coronarica (CHD), sono stati usati modelli di regressione di Cox per valutare l'associazione tra la Lp-PLA₂ e l'infarto mediante un'analisi univariata (modello 1), un'analisi univariata corretta in base ai dati demografici (modello 2) e un modello multivariato corretto in base ai dati demografici ed altri fattori prognostici (modello 3), nonché tutti i fattori che comprendessero lo stato di malattia cardiaca coronarica (modello 4). Allo studio sono stati applicati gli stessi valori soglia (420 e 310 ng/mL, corrispondenti rispettivamente al 67° e 33° percentile) come per le analisi precedenti. Lo stato di cardiopatia coronarica è stato identificato come predittore del rischio con un rapporto di rischio pari al 2,26 in un modello completo corretto. I rapporti di rischio delle analisi della regressione di Cox hanno dimostrato che la Lp-PLA₂ era un predittore di rischio significativo e indipendente del rischio di infarto ischemico per il terzile più alto rispetto al terzile più basso della Lp-PLA₂, per tutti i partecipanti, con un incremento pari a quasi il doppio dopo la correzione per il diabete, i lipidi, la pressione sanguigna, l'abitudine al fumo, l'indice di massa corporea (BMI), altri marker infiammatori e lo stato di malattia cardiaca coronarica (vedere la tabella 3).

Tabella 3. Rapporti di rischio di infarto ischemico per tutti i pazienti

Lp-PLA ₂	Rapporto di rischio Lp-PLA ₂ (95% CI, valore di p)*		
	Terzile 1	Terzile 2	Terzile 3
N. di casi di infarto ischemico/totale soggetti	47/283 (16,6%)	44/305 (14,4%)	103/368 (28,0%)
Modello 1	1,0	0,85 (da 0,57 a 1,29; p=0,45)	1,79 (da 1,27 a 2,52; p=0,0010)
Modello 2	1,0	0,89 (da 0,59 a 1,35; p=0,58)	2,09 (da 1,46 a 3,01; p=0,0001)
Modello 3	1,0	0,89 (da 0,58 a 1,36; p=0,59)	1,81 (da 1,22 a 2,69; p=0,0034)
Modello 4	1,0	0,86 (da 0,56 a 1,31; p=0,48)	1,75 (da 1,18 a 2,60; p=0,0057)

*Il terzile più basso con valori Lp-PLA₂ <310 ng/mL è stato usato come gruppo di riferimento.

Modello 1: analisi univariata

Modello 2: correzione per età, etnia e sesso

Modello 3: modello 2 corretto per diabete, LDL, HDL, pressione sanguigna, pazienti fumatori, indice di massa corporea e CRP

Modello 4: modello 3 corretto per malattia cardiaca coronarica





Sono quindi state effettuate ulteriori analisi per determinare se la Lp-PLA₂ potesse essere considerata un predittore di infarto ischemico nell'intervallo completo della pressione sanguigna sistolica (SBP) e per determinare se la pressione sanguigna e la Lp-PLA₂ potessero essere usate come elementi aggiuntivi per la valutazione del rischio di infarto ischemico. I valori soglia dei terzili per la pressione sanguigna sistolica sono stati assegnati utilizzando il 33° e 67° percentile della popolazione (pari rispettivamente a 113 e 130 mm Hg). La popolazione oggetto dello studio è stata divisa in sottogruppi con pressione sanguigna sistolica bassa, media e alta (primo, secondo e terzo sestile) e con valori Lp-PLA₂ alti e bassi (inferiori e superiori al valore medio, pari a 377 ng/mL nello studio ARIC). Il rischio relativo di ciascun gruppo è stato confrontato con il rischio di eventi associati con il gruppo nel primo terzile della pressione sanguigna sistolica e con il gruppo con valore Lp-PLA₂ inferiore alla media (Tabella 4).

Tabella 4. Rapporti di rischio di infarto ischemico: effetti additivi della Lp-PLA₂ e pressione sistolica

		Lp-PLA ₂	
		Inferiore alla media	Superiore alla media
SBP (mm Hg)	N. di casi di infarto ischemico/totale soggetti in ciascuna categoria	68/478 (14,2%)	126/478 (26,4%)
<113	29/270 (10,7%)	1,00	2,29 (p=0,03)
da 113 a 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)

I pazienti con concentrazioni di Lp-PLA₂ superiori alla media nello studio ARIC e facenti parte del terzile più alto per la pressione sanguigna sistolica (>130 mm Hg) presentavano un rischio di 6,75 (p<0,0001) rispetto a quelli con una concentrazione di Lp-PLA₂ inferiore alla media e facenti parte del terzile più basso per la pressione sanguigna sistolica. Questi risultati indicano che la Lp-PLA₂ e la pressione sanguigna possono essere usate come elementi aggiuntivi per predire il rischio e che i pazienti che facevano parte dei gruppi con valori più alti per le variabili erano a maggiore rischio di infarto ischemico associato ad arteriosclerosi.

INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA DEI PRODOTTI

Set calibratore (1-6), Controllo basso e alto  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	20X Tampone di lavaggio  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	Soluzione di Stop  [Xi] R34/41 S26/36/37/39	Coniugato, Reagente TMB  [Xi]
--	---	---	--

R34	Provoca ustioni
R36	Irritante per gli occhi
R38	Irritante per la pelle
R41	Rischio di gravi lesioni oculari
S26	In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente ed abbondantemente con acqua e consultare un medico
S36/37/39	Indossare indumenti di protezione adeguati, guanti e un dispositivo di protezione degli occhi e del viso

BIBLIOGRAFIA

- [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.