



# Kit ELISA para Teste PLAC<sup>®</sup>

**REF**  
90123

Imunoensaio enzimático para a determinação quantitativa de Lp-PLA<sub>2</sub> em plasma e soro humanos



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



mdi Europa GmbH

Langenhagener Str. 71

30855 Hannover-Langenhagen, Germany

## Tabela de símbolos

<b>REF</b>	Número de catálogo	<b>IVD</b>	Dispositivo médico de diagnóstico <i>in vitro</i>
<b>PLATE</b>	Placa revestida com anticorpos	<b>LOT</b>	Lote
<b>CAL</b>	Calibrador		Data de validade
<b>CONTROL LOW</b>	Controle baixo		Armazenar entre 2 °C e 8 °C
<b>CONTROL HIGH</b>	Controle alto		Irritante
<b>WASH</b>	Solução-tampão de lavagem		Consultar as instruções de uso
<b>CONJ</b>	Conjugado		Fabricante
<b>TMB</b>	Substrato de TMB	<b>ECIREP</b>	Representante autorizado na Comunidade Europeia
<b>STOP</b>	Solução de parada	<b>CE</b>	Conformidade europeia

Leia este encarte inteiramente antes de usar o produto. Siga as instruções atentamente ao realizar os testes. A inobservância das instruções pode produzir resultados inexactos.

*Este produto está protegido pelas patentes norte-americanas de número 5532152, 5641669, 5698403, 5847088, 5968818, 5981252, 6177257, 7045329, 7416853 e pelas patentes europeias de número 658205 e 673426. Outras patentes pendentes.*

**PLAC** e PLAC são marcas comerciais da diaDexus, Inc., Registrado nos Estados Unidos.

Copyright © 2011 diaDexus, Inc. Todos os direitos reservados.

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

## USO PREVISTO

O Kit ELISA para Teste PLAC<sup>®</sup> da diaDexus é um imunoenensaio enzimático para a determinação quantitativa de Lp-PLA<sub>2</sub> (fosfolipase A<sub>2</sub> associada à lipoproteína) em plasma e soro humanos, para uso em conjunto com avaliação clínica e avaliação de risco do paciente, bem como material de apoio à previsão de risco de doença cardíaca coronária e AVC isquêmico associado à aterosclerose.

## RESUMO E EXPLICAÇÃO

A Lp-PLA<sub>2</sub> é uma lipase sérica associada à lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, em menor grau, à lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma e no soro humanos [1], distinguindo-se de outras fosfolipases, como cPLA<sub>2</sub> e sPLA<sub>2</sub> [2]. A Lp-PLA<sub>2</sub> é produzida por macrófagos e outras células inflamatórias e se expressa em concentrações mais altas em lesões ateroscleróticas avançadas do que em lesões em estágio inicial [3,4]. Diversas linhas de evidência sugerem que a oxidação da LDL é uma etapa crucial para o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose [5,6]. A Lp-PLA<sub>2</sub> participa da modificação oxidativa da LDL hidrolizando a fosfatidilcolina oxidada, gerando lisofosfatidilcolina e ácidos graxos livres oxidados, ambos os quais são produtos antiinflamatórios potentes que contribuem para a formação de placas ateroscleróticas [7,8,9]. A Lp-PLA<sub>2</sub> tem demonstrado modesta variação intra e inter-indivíduos, comensurável a outros marcadores lipídicos cardiovasculares e substancialmente menor do que a proteína C-reativa (PCR). Além disso, a Lp-PLA<sub>2</sub> não se eleva em condições inflamatórias sistêmicas e pode ser um marcador mais específico de inflamação vascular. A variação biológica relativamente pequena da Lp-PLA<sub>2</sub> e sua especificidade são valiosas para a detecção e monitorização do risco cardiovascular [10,11].

Níveis elevados de Lp-PLA<sub>2</sub>, conforme medidos pelo imunoenensaio, foram encontrados em pacientes com doença cardíaca coronária (DCC) comprovada angiograficamente, quando comparados com controles de mesma idade [1]. Em um estudo de controle de caso retrospectivo, usando amostras de homens hipercolesterolêmicos (n = 1740) do Estudo de Prevenção Coronária da Escócia Ocidental (West of Scotland Coronary Prevention Study, WOSCOPS), observou-se um risco 2 vezes maior de doença cardíaca coronária em pacientes no quintil mais alto dos níveis de Lp-PLA<sub>2</sub>, na comparação com o quintil mais baixo [12]. Ademais, a associação de risco de DCC da Lp-PLA<sub>2</sub> mostrou-se independente da LDL e de outros marcadores de inflamação: proteína C-reativa, contagem de leucócitos e fibrinogênio. Os autores do estudo afirmaram, em suas conclusões, que “níveis elevados de fosfolipase A<sub>2</sub> associada à lipoproteína parecem ser um grande fator de risco para doença cardíaca coronária, um achado que tem implicações para a aterogênese e a avaliação do risco”. Em outro relatório, usando amostras do estudo Risco de Aterosclerose nas Comunidades (Atherosclerosis Risk in Communities, ARIC), que acompanhou 12.819 homens e mulheres de meia idade (45 a 64 anos) aparentemente saudáveis por seis a oito anos, a Lp-PLA<sub>2</sub> foi considerada um preditor importante de risco de DCC. Em indivíduos com LDL inferior a 130 mg/dl, a Lp-PLA<sub>2</sub> esteve associada, de maneira significativa e independente, com um risco 2 vezes maior de eventos de DCC, inclusive a necessidade de revascularização, infarto do miocárdio e morte por doença cardíaca [13].

O estudo ARIC foi reanalisado para determinar o risco associado a níveis elevados de Lp-PLA<sub>2</sub>. Um total de 223 eventos de AVC foi identificado no grupo do estudo, dos quais 194 (87%) eram AVC isquêmico associado à aterosclerose, conforme classificados pelos investigadores do ARIC. Essa proporção de AVC isquêmico em relação ao total é consistente com o percentual encontrado na população geral [14]. Os resultados desse estudo indicaram que a Lp-PLA<sub>2</sub> foi um forte preditor de AVCs isquêmicos, com um risco quase 2 vezes mais elevado, mesmo após o ajuste em vista da pressão arterial, lipídios, diabetes, massa corporal e outros marcadores inflamatórios [15].

## PRINCÍPIO DO TESTE

O Kit ELISA para Teste PLAC da diaDexus é um imunoenensaio enzimático tipo "sanduíche", que usa dois anticorpos monoclonais altamente específicos para a medição direta da concentração de Lp-PLA<sub>2</sub> em plasma e soro humanos. O sistema de ensaio utiliza anticorpos monoclonais anti-Lp-PLA<sub>2</sub> (2C10) diretamente contra a Lp-PLA<sub>2</sub> para imobilização da fase sólida na placa de micropoços. A amostra é adicionada à placa e incubada por 10 minutos entre 20 e 26 °C. Um segundo anticorpo monoclonal anti-Lp-PLA<sub>2</sub> (4B4), rotulado com a enzima peroxidase de raiz forte (HRP), é adicionado em seguida,

reagindo com o antígeno imobilizado, entre 20 e 26 °C, por 180 minutos, o que faz com que as moléculas de Lp-PLA<sub>2</sub> sejam capturadas entre a fase sólida e os anticorpos rotulados com a enzima. Os poços são lavados com uma solução-tampão fornecida para remoção dos anticorpos que não se ligaram. O substrato tetrametilbenzidina (TMB) é, então, adicionado e incubado entre 20 e 26 °C por 20 minutos, o que resulta no desenvolvimento de uma cor azul. O desenvolvimento da cor é interrompido com a adição da Solução de Parada, que faz a cor mudar para amarelo. A absorvância da alteração enzimática do substrato é determinada por espectrofotometria a 450 nm e é diretamente proporcional à concentração de Lp-PLA<sub>2</sub> presente. Um conjunto de Calibradores de Lp-PLA<sub>2</sub> é usado para traçar uma curva padrão de absorvância em relação à concentração de Lp-PLA<sub>2</sub>, a partir da qual é possível determinar a concentração de Lp-PLA<sub>2</sub> da amostra em teste. Dois níveis de Controles são fornecidos para monitorar o desempenho do ensaio dentro de sua faixa clínica.

## REAGENTES E MATERIAIS

**Materiais fornecidos com o kit: (suficientes para 96 poços)**

NÚMERO DE PEÇA	SÍMBOLO	DESCRIÇÃO DO COMPONENTE	QUANTIDADE
60001	<b>PLATE</b>	<b>Placa Revestida com Anticorpos</b> Placa de micropoços revestida com anticorpos monoclonais anti-Lp-PLA <sub>2</sub> (2C10) de camundongo	1
60006	<b>CAL</b>	<b>Calibradores</b> (0, 50, 100, 250, 500 e 1.000 ng/ml)	<b>1 conjunto,</b> <b>0,25 ml cada</b>
60007		Antígeno recombinante de diaDexus	
60008		Lp-PLA <sub>2</sub> (DDX-RA) em um diluente	
60009		estabilizador de proteína	
60010			
60002	<b>WASH</b>	<b>Solução-Tampão de Lavagem 20X</b> Detergente não iônico em uma solução-tampão	50 ml
60003	<b>CONJ</b>	<b>Conjugado</b> Anticorpo monoclonal anti-Lp-PLA <sub>2</sub> (4B4) de camundongo conjugado com peroxidase de raiz forte em um reagente-tampão com proteínas de transporte bovinas e murinas	23 ml
60004	<b>TMB</b>	<b>Reagente TMB</b> 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina em solução-tampão levemente acidífera	11 ml
60005	<b>STOP</b>	<b>Solução de Parada</b> 1N HCl	11 ml
65009	<b>CONTROL</b> <b>LOW</b>	<b>Controle Baixo</b> (~150 ng/ml) Antígeno recombinante de diaDexus Lp-PLA <sub>2</sub> (DDX-RA) em matriz-tampão líquida protéica (BSA)	<b>1 garrafa,</b> <b>0,5 ml</b>
65010	<b>CONTROL</b> <b>HIGH</b>	<b>Controle Alto</b> (~350 ng/ml) Antígeno recombinante de diaDexus Lp-PLA <sub>2</sub> (DDX-RA) em matriz-tampão líquida protéica (BSA)	<b>1 garrafa,</b> <b>0,5 ml</b>
FMD-01-026		<b>Certificado de Análise – Faixa de Controle</b> As faixas de controle do lote estão indicadas no Certificado de Análise	1 cada

### **Materiais necessários, mas não fornecidos:**

- Pipetador de precisão monocanal e multicanal: 0,02, 0,10, 0,20 ml
- Pontas de pipeta descartáveis (uma ponta de pipeta nova deve ser usada para cada adição de amostras ou reagentes diferentes durante o procedimento de ensaio)
- Misturador de vórtice ou equivalente
- Água deionizada
- Um leitor de placa de micropoços com largura de banda de 10 nm ou menos e faixa de densidade ótica (D.O.) de 3 ou mais a 450 nm
- Software de computador capaz de ajustar curva ponto a ponto para calcular a concentração de analito a partir da densidade ótica (opcional)

### **ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**

- Para uso diagnóstico *in vitro*.
- Trate todas as amostras de sangue como material de potencial risco biológico.
- A exposição das amostras à temperatura ambiente deve ser minimizada a menos de 6 horas (incluindo coleta, processamento, tempo de transporte e análise laboratorial da amostra de sangue). Isto não inclui a incubação na placa ELISA.
- Não se recomenda armazenar amostras a -20 °C por mais de 24 horas.
- Alguns componentes estão rotulados com precauções de segurança. Consulte a seção "Informações de segurança do produto".
- Descarte os reagentes de maneira compatível com as regulamentações relevantes.
- Não use reagentes com data de validade vencida.
- Não misture reagentes de kits com números de lote diferentes.
- Se houver evidência de contaminação, não use.
- Hemólise pode afetar os resultados. Não teste amostras hemolisadas.
- É recomendável incluir ambos os Controles, alto e baixo, em cada ciclo. Se os valores de controle não estiverem dentro dos limites de aceitação, repita o ensaio. Pode ser necessário teste adicional de controle de qualidade, de acordo com as exigências estaduais e locais.
- Para evitar resultados errôneos, armazene o material como indicado.
- As faixas de controle fornecidas se derivam de testes de replicação dos lotes de controle específicos, usando os Kits ELISA para Teste PLAC, e devem ser usados como guias. As médias laboratoriais individuais podem variar em relação aos valores discriminados. Variações entre laboratórios podem ser causadas por diferenças técnicas ou variabilidade dos reagentes. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça suas próprias faixas aceitáveis.

### **PREPARAÇÃO E ARMAZENAGEM DOS REAGENTES**

Armazene os kits de teste fechados entre 2 e 8 °C assim que os receber. Além disso, mantenha a placa de micropoços vedada no saco laminado com dessecante, para minimizar a exposição à umidade. Kits de teste abertos devem permanecer estáveis até a data de validade indicada, desde que sejam armazenadas conforme o descrito acima.

Prepare 1X de Solução-Tampão de Lavagem, diluindo Solução-Tampão de Lavagem 20X em água deionizada, na proporção 1:20. Misture 1 parte da Solução-Tampão de Lavagem em 19 partes de água deionizada. Armazene à temperatura ambiente (20 a 26 °C). Use 1X de Solução-Tampão de Lavagem em até quatro semanas após a preparação. Se for visto crescimento microbiano, descarte.

## COLETA E ARMAZENAGEM DE ESPÉCIMES

- Jejum não é necessário.
- Colete amostras de sangue em:
  - tubos de separação para soro ou plasma com gel;
  - tubos de coleta de plasma com heparina ou EDTA;
  - qualquer tubo de coleta de soro.
- Processe as amostras usando procedimentos de separação padrão.
  - As amostras devem ser centrifugadas e separadas em até quatro horas da venopunção, de acordo com as boas práticas laboratoriais, mas não mais do que 36 horas após a coleta do sangue. As amostras devem ser armazenadas sob refrigeração (2 a 8 °C).
- Amostras de sangue não processadas:
  - Armazene e transporte em bolsas térmicas (entre 2 e 8 °C) e processe em até 36 horas da coleta.
- Amostras processadas:
  - As amostras devem ser armazenadas sob refrigeração entre 2 e 8 °C por, no mínimo, 24 horas após a coleta antes de se fazer o teste.
  - As amostras podem ser testadas até 7 dias após a coleta, quando armazenadas entre 2 e 8 °C.
  - Em caso de prazo de armazenagem mais longo, as amostras de soro/plasma devem ser armazenadas a -70 °C ou menos. Uma vez degelada, a amostra pode ser testada em até 7 dias, quando armazenada entre 2 e 8 °C. As amostras podem ser congeladas e degeladas duas vezes sem prejuízo da quantificação de Lp-PLA<sub>2</sub>.

## PROCEDIMENTO DE ENSAIO

### Calibração

Cada ciclo de placa ou lâmina deve ser calibrado com o uso de uma curva completa de calibração (de 6 pontos). Uma curva padrão é gerada por meio de um modelo de ajuste de curva ponto a ponto. Verifique a curva de calibração com, pelo menos, dois níveis de Controles, de acordo com as exigências do laboratório. Calibre e execute os Controles para cada ciclo de placa.

### Controle de qualidade

Teste os Controles Alto e Baixo em cada ciclo. Se os valores de controle não estiverem dentro dos limites de aceitação, repita o ensaio. Pode ser necessário teste adicional de controle de qualidade, de acordo com as regulamentações locais, estaduais e/ou federais ou por exigências de credenciamento.

### Etapas preparatórias

1. Traga a placa de micropoços, o Conjugado, a Solução-Tampão de Lavagem e o TMB à temperatura ambiente (20 a 26 °C) antes de usar.
2. Remova a moldura da placa e o número necessário de tiras de micropoço do saco laminado. Vede totalmente outra vez o saco laminado, se ainda contiver tiras não utilizadas, com o dessecante fornecido com o saco, e armazene-o entre 2 e 8 °C.
3. Prepare 1X de Solução-Tampão de Lavagem, diluindo Solução-Tampão de Lavagem 20X em água deionizada, na proporção 1:20 (1 parte de Solução-Tampão de Lavagem e 19 partes de água deionizada). Armazene à temperatura ambiente (20 a 26 °C). Use 1X de Solução-Tampão de Lavagem em até quatro semanas após a preparação.
4. Permita que as amostras do paciente degelem até entre 2 e 8 °C, se necessário, e coloque-as em gelo ou entre 2 e 8 °C tão logo degelem.
5. Armazene os Controles entre 2 e 8 °C ou em gelo até sua utilização.
6. Turbilhione as amostras e os Controles para misturar bem. Evite fazer espuma.

## Incubação das amostras

1. Usando um pipetador e uma ponta com a precisão de baixo volume adequada, sirva 20 µl de Calibradores, amostras e Controles nos poços correspondentes após turbilhonar. Use uma pipeta calibrada e uma ponta de pipeta nova para cada Calibrador, Controle ou amostra.
2. Aguarde 10 ± 2 minutos para que as amostras incubem na placa, antes de adicionar o Conjugado.
3. Pipete 200 µl de Conjugado à temperatura ambiente nos poços correspondentes da placa de micropoços revestida. Evite contaminação, adicionando o Conjugado sem tocar as amostras com as pontas de pipeta. Se houver cruzamento, troque as pontas e continue adicionando Conjugado aos poços.
4. Incube por 3 horas, à temperatura ambiente.
5. Ao final do período de incubação, lave os micropoços 4 (quatro) vezes com, no mínimo, 300 µl da Solução-Tampão de Lavagem 1X fornecida, à temperatura ambiente. (NÃO USE ÁGUA ENCANADA ou DESTILADA.)
6. Encubra a placa com papel absorvente após a última lavagem. Imediatamente (em menos de 2 minutos), proceda à etapa seguinte. Não permita que a placa de micropoços se seque.

## Incubação do substrato

1. Pipete 100 µl de Reagente TMB à temperatura ambiente, para dentro de cada poço.
2. Rodopie a placa delicadamente sobre uma superfície plana por 10 a 15 segundos, para garantir a misturação.
3. Incube a placa à temperatura ambiente por 20 minutos, no escuro.
4. Interrompa a reação, adicionando 100 µl de Solução de Parada, à temperatura ambiente, em cada poço.
5. Rodopie a placa delicadamente sobre uma superfície plana por 20 a 30 segundos, para garantir a misturação. É importante se certificar de que a cor azul mude totalmente para amarelo.
6. Seque a umidade da parte de baixo da placa usando uma toalha de papel.
7. Em 15 minutos da adição da Solução de Parada, leia a densidade ótica (D.O.) a 450 nm, usando um leitor de placa de micropoços.

## NOTAS PROCEDIMENTAIS

- Armazene todos os reagentes de teste entre 2 e 8 °C. Exceto para os Calibradores e Controles, aguarde os reagentes se equilibrarem à temperatura ambiente antes de usar. Uma garrafa de 23 ml de reagente pode exigir uma hora ou mais para atingir a temperatura ambiente. Mantenha os Calibradores e Controles entre 2 e 8 °C ou em gelo até sua utilização.
- Traga a placa de micropoços à temperatura ambiente antes de abrir a bolsa. Armazene as tiras no saco laminado com dessecante, para minimizar a exposição à umidade. Sempre conserve as tiras de micropoço não utilizadas no saco laminado, com o dessecante.
- Tenha sempre o reagente da etapa seguinte já pronto 2 a 3 minutos antes da etapa de lavagem.
- Para a medição precisa das amostras, a adição de amostras, Calibradores e Controles deve ser precisa. Pipete cuidadosamente, usando apenas equipamento calibrado.
- Este ensaio pode ser realizado por meio de qualquer método de lavagem validado.
- Não use selantes de placa durante as incubações.
- Não use um agitador de placa nas etapas de incubação.

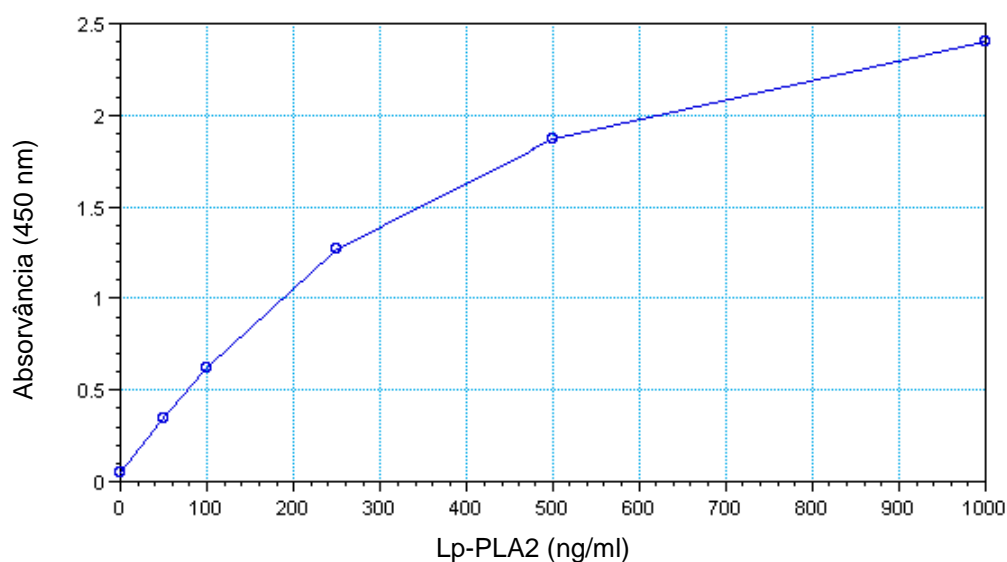
## CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Monte uma curva de calibração padrão, traçando a absorvância obtida em cada Calibrador no eixo y em relação à concentração de Lp-PLA<sub>2</sub>, em ng/ml, no eixo x. Use um ajuste de curva ponto a ponto do software de computador apropriado para montar a curva de calibração padrão.
2. Usando o valor de absorvância de cada amostra e Controle, determine a concentração correspondente de Lp-PLA<sub>2</sub>, em ng/ml, a partir da curva de calibração.

## EXEMPLO DE CURVA DO CALIBRADOR

Os resultados de uma curva de calibração padrão típica, com leituras de D.O. a 450 nm, são mostrados no eixo y em relação às concentrações de Lp-PLA<sub>2</sub> (ng/ml) mostradas no eixo x. Esta curva de calibração tem fins meramente ilustrativos. Uma curva de calibração padrão deve ser gerada pelo usuário para cada ensaio realizado.

Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/ml)	Absorvância (D.O. a 450 nm)
0	0,048
50	0,348
100	0,623
250	1,269
500	1,868
1.000	2,402



## LIMITAÇÕES

### Procedimento

- Resultados confiáveis e reprodutíveis serão obtidos quando o procedimento de ensaio for realizado com total compreensão das instruções no encarte e a observação das boas práticas laboratoriais.
- Os procedimentos de lavagem são cruciais. Lavagem insuficiente ocasionará má precisão e leituras de absorvância falsamente elevadas.
- Como em qualquer sistema de imunoenensaio, particularmente os que empregam anticorpos monoclonais de camundongo, existe a possibilidade de interferência por anticorpos humanos anticamundongo (HAMA) ou outras interferências heterofílicas presentes na amostra, que podem causar valores falsamente altos ou baixos.
- Como em qualquer método analítico, existe a possibilidade de que substâncias e/ou fatores não testados (p.ex., técnicos ou procedimentais) possam interferir no teste e causar resultados falsos. Os resultados devem ser considerados em conjunto com outros métodos clínicos e analíticos.

## Interpretação clínica

- Os níveis de Lp-PLA<sub>2</sub> devem ser interpretados em conjunto com os achados clínicos e outros testes diagnósticos.
- Este teste não substitui os testes de colesterol sanguíneo ou outros fatores de risco tradicionais identificados para doença cardíaca coronária ou AVC isquêmico.

## VALORES ESPERADOS

Amostras de homens (n = 251) e mulheres (n = 174) aparentemente saudáveis, na faixa etária clinicamente relevante de 40 a 70 anos, foram avaliadas com o Kit ELISA para Teste PLAC da diaDexus. A população de referência foi representada pelos seguintes perfis étnicos: afro-americanos n = 26; caucasianos n = 390; hispânicos n = 8; e não especificados n = 1. As distribuições dos valores de Lp-PLA<sub>2</sub> entre a população como um todo e dividida por sexo são dadas no final da tabela a seguir:

Percentil	Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/ml)		
	Todos (n = 425)	Mulheres (n = 174)	Homens (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

Estas faixas de referência são fornecidas como meros parâmetros de orientação e não se pretendem “valores críticos” ou limites para decisão médica. Cada laboratório deve estabelecer seus próprios intervalos de referência. Orientações para estabelecer intervalos de referência encontram-se no Padrão CLSI C28-A2 (*How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition - "Como definir e determinar intervalos de referência no laboratório clínico; diretriz aprovada - segunda edição"*). Com base na concentração de Lp-PLA<sub>2</sub> de 235 ng/ml da população mediana, sugeriu-se usar esse valor como limiar para decisão clínica [16]. Mais recentemente, um quadro de especialistas em consenso sugeriu aplicar um limiar de decisão de 200 ng/ml, tendo por base um *corpus* significativo de literatura publicada sobre a avaliação do risco pela Lp-PLA<sub>2</sub> [17].

## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Sensibilidade

O limite mínimo de detecção é de 0,34 ng/ml, conforme calculado pela interpolação da média mais dois desvios padrão de 20 réplicas do calibrador de 0 ng/ml de Lp-PLA<sub>2</sub>.

## Precisão do ensaio

A variabilidade intraensaio e entre ensaios foi determinada testando-se quatro "pools" séricos humanos com concentrações de Lp-PLA<sub>2</sub> distribuídas por toda a faixa de calibração do ensaio. Os "pools" séricos foram testados com o uso de um único lote de reagentes, em duplicata, em dois poços separados por dia, durante 5 dias, à razão de quatro placas por dia. Os dados são resumidos abaixo:

"Pool" sérico	Concentração média de Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/ml)	CV intraensaio (%) n = 80	CV entre ensaios (%) n = 20	CV total (%) 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

Em um estudo de repetibilidade conduzido com uma série de 108 amostras séricas, os resultados do ensaio determinados pelos primeiros poços (ensaio de ponto único) foram comparados com os resultados médios de duas medições sucessivas (poços duplicados). Os níveis de Lp-PLA<sub>2</sub> das amostras variaram de 87 a 575 ng/ml, e o CV (%) médio entre as réplicas foi de 2,3%. Em análise de regressão linear, os resultados do ponto único revelaram-se altamente correlacionados aos resultados da média duplicada: coeficiente de correlação  $r = 0,997$  (inclinação 1,0 e interceptação -1,3 ng/ml).

## Linearidade

Seis amostras de soro com altos níveis conhecidos de Lp-PLA<sub>2</sub> foram misturadas a seis amostras de soro com baixos níveis conhecidos de Lp-PLA<sub>2</sub>. A recuperação percentual foi determinada como o valor medido, dividido pelo valor esperado, multiplicado por 100. A recuperação média foi de 93%, demonstrando linearidade das amostras diluídas em uma faixa de 151 a 810 ng/ml de Lp-PLA<sub>2</sub>.

## Substâncias interferentes

Substâncias endógenas encontradas no sangue e substâncias exógenas (medicamentos comuns e de prescrição médica) foram avaliadas quanto à interferência no ensaio. Cinco amostras de soro individuais, com valores de Lp-PLA<sub>2</sub> variando de 163 a 908 ng/ml, foram injetadas com possíveis interferentes. Nenhuma interferência discernível foi observada, nos níveis injetados testados, no que se refere às substâncias a seguir.

Endógenas		Exógenas (medicamentos isentos de receita, etc.)	
<u>Possível interferente</u>	<u>Concentração de teste</u>	<u>Possível interferente</u>	<u>Concentração de teste</u>
Bilirrubina	20 mg/dl	Acetaminofeno	1,66 µmol/l
Colesterol	500 mg/dl	Aspirina	3.300 µmol/l
Hemoglobina	1.250 mg/dl	Atorvastatina	20 µmol/l
Triglicérides	3.000 mg/dl	Bissulfato de clopidogrel	140 µmol/l
Albumina total*	~6.500 mg/dl	Difenidramina	19,6 µmol/l
		Fenofibrato	125 µmol/l
		Lisinopril	0,74 µmol/l
		Metformina	310 µmol/l
		Niacina	6.500 µmol/l
		Pravastatina	10 µmol/l
		Tolbutamida	2.400 µmol/l
		Vitamina C	227 µmol/l
		Varfarina	64,9 µmol/l

\* 2,5 g/dl de albumina adicionada ao "pool" plasmático de, presumivelmente, 4 g/dl de albumina

## ESTUDOS CLÍNICOS

### Doença cardíaca coronária

Para determinar a eficácia do Kit ELISA para Teste PLAC da diaDexus como preditor do risco de doença cardíaca coronária (DCC), foram medidos os níveis de Lp-PLA<sub>2</sub> em 1.348 amostras de plasma em EDTA armazenadas em banco de sangue de um grande estudo epidemiológico multicêntrico, o estudo Risco de Aterosclerose em Comunidades (Atherosclerosis Risk in Communities, ARIC), patrocinado pelo Instituto Nacional do Coração, Sangue e Pulmão dos Institutos Nacionais de Saúde (National Institutes of Health's National Heart, Lung, and Blood Institute) dos Estados Unidos. Os participantes foram acompanhados quanto ao desenvolvimento de DCC por seis a oito anos. As amostras usadas no Teste PLAC provinham de participantes com idade entre 47 e 69 anos, sem DCC no momento da coleta do sangue. Trata-se de um estudo de caso-coorte no qual as amostras de todos os casos de DCC (607) foram testadas juntas com 741 participantes adequadamente selecionados sem DCC no momento do censor (controles)\*.

Os modelos de regressão de Cox foram usados para avaliar a associação entre Lp-PLA<sub>2</sub> e DCC em uma análise univariada (Modelo 1), uma análise univariada ajustada à demografia (Modelo 2) e um modelo multivariado ajustado à demografia e outros fatores prognósticos (Modelo 3). Usando pontos de corte por tercis de Lp-PLA<sub>2</sub> altos e baixos, gerados a partir do conjunto de dados do ARIC (420 e 310 ng/ml, os 67<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> percentis, respectivamente), as razões de risco das análises de regressão de Cox demonstraram que a Lp-PLA<sub>2</sub> foi um preditor significativo do risco de DCC, para os níveis mais altos e intermediários, quando comparados com o nível mais baixo de Lp-PLA<sub>2</sub>, para todos os participantes (vide Tabela 1). Deve-se notar que pontos de corte diferentes podem ser apropriados para populações clínicas distintas.

\* NOTA: 86 resultados (5,5%) ficaram fora dos critérios de aceitação do ensaio e foram excluídos das análises de dados.

**Tabela 1. Razões de risco de DCC para pacientes em todos os níveis de LDL**

Lp-PLA <sub>2</sub>	Razão de risco da Lp-PLA <sub>2</sub> (IC 95%, valor p)*		
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
<b>Nº casos DCC/total de pacientes na categoria</b>	127/366 <b>(34,7%)</b>	192/444 <b>(43,2%)</b>	288/538 <b>(53,5%)</b>
<b>Modelo 1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,49</b> (1,11 a 1,99, p = 0,008)	<b>2,50</b> (1,89 a 3,31, p < 0,001)
<b>Modelo 2</b>	<b>1,0</b>	<b>1,24</b> (0,92 a 1,66, p = 0,154)	<b>1,76</b> (1,32 a 2,36, p < 0,001)
<b>Modelo 3</b>	<b>1,0</b>	<b>1,71</b> (1,06 a 2,75, p = 0,029)	<b>2,12</b> (1,29 a 3,48, p = 0,003)

\* O tercil mais baixo com valores de Lp-PLA<sub>2</sub> < 310 ng/ml foi usado como grupo de referência.

Modelo 1: análise univariada

Modelo 2: ajustado para idade, raça e sexo

Modelo 3: Modelo 2, mais ajuste para condição de fumante/não fumante atual, pressão arterial, diabetes, HDL, LDL, PCR e interação Lp-PLA<sub>2</sub> - LDL

Uma interação estatística foi encontrada entre a Lp-PLA<sub>2</sub> e a LDL. Portanto, era apropriado avaliar as razões de risco da Lp-PLA<sub>2</sub> nos subgrupos com LDL alta e baixa. O valor médio de LDL da população e coorte era de 130 mg/dl. Isto definiu os subgrupos com LDL baixa e alta. As Tabelas 2a e 2b representam a análise univariada das razões de risco nos subgrupos com LDL alta e baixa. As razões de risco foram calculadas pela regressão de Cox, empregando-se o método de caso-coorte ponderado com ajuste de Barlow, n = 1.348.

**Tabela 2a. Razões de risco de DCC para pacientes com LDL < 130 mg/dl**

	Razão de risco da Lp-PLA <sub>2</sub> (CI 95%)*		
Lp-PLA <sub>2</sub> <sup>†</sup>	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
Razão de risco	1,0	2,17 (1,41 a 3,36)	3,52 (2,25 a 5,49)
Nº casos DCC/total de pacientes na categoria	51/215 (23,7%)	75/195 (38,5%)	77/163 (47,2%)

\*O tercil mais baixo com valores de Lp-PLA<sub>2</sub> < 310 ng/ml foi usado como grupo de referência.

<sup>†</sup>Pontos de corte da Lp-PLA<sub>2</sub> baseados na população do estudo ARIC com todos os níveis de LDL.

**Tabela 2b. Razões de risco de DCC para pacientes com LDL ≥ 130 mg/dl**

	Razão de risco da Lp-PLA <sub>2</sub> (CI 95%)*		
Lp-PLA <sub>2</sub> <sup>†</sup>	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
Razão de risco	3,15 (2,08 a 4,77)	3,66 (2,43 a 5,51)	5,10 (3,43 a 7,57)
Nº casos DCC/total de pacientes na categoria	110/234 (47,0%)	126/247 (51,0%)	169/294 (57,5%)

\*O tercil mais baixo do subgrupo com LDL < 130, com valores de Lp-PLA<sub>2</sub> < 310 ng/ml, foi usado como grupo de referência.

<sup>†</sup>Pontos de corte de Lp-PLA<sub>2</sub> baseados na população do estudo ARIC com LDL ≥ 130 mg/dl.

No subgrupo com LDL alta, os grupos de tercis específicos aos subgrupos geraram pontos de corte de 350 e 460 ng/ml; a razão de risco aumentou com valores mais altos de Lp-PLA<sub>2</sub>. Logo, para indivíduos com LDL alta, deve-se considerar um ponto de corte de Lp-PLA<sub>2</sub> mais alto. Justifica-se pesquisa adicional para avaliar a interação Lp-PLA<sub>2</sub> - LDL no subgrupo com LDL alta. Para a população total, a Lp-PLA<sub>2</sub> foi um preditor significativo do risco de DCC para os grupos de Lp-PLA<sub>2</sub> alta e intermediária, em comparação com o grupo de baixa Lp-PLA<sub>2</sub> (grupo de referência).

### AVC isquêmico

Os níveis de Lp-PLA<sub>2</sub> foram avaliados no estudo ARIC para determinar sua eficácia como preditor do risco de AVC. Um total de 223 eventos de AVC foi identificado no grupo do estudo, dos quais 194 (87%) eram AVC isquêmico associado à aterosclerose, conforme classificados pelos investigadores do ARIC. Um estudo de caso-coorte similar foi concebido, no qual as amostras de todos os casos de AVC isquêmico disponíveis (194) foram testadas junto com 762 participantes adequadamente selecionados sem DCC ou AVC no momento do censor (controles).

Assim como no estudo de risco de DCC, os modelos de regressão de Cox foram usados para avaliar a associação entre Lp-PLA<sub>2</sub> e AVC em uma análise univariada (Modelo 1), uma análise univariada ajustada à demografia (Modelo 2), um modelo multivariado ajustado à demografia e outros fatores prognósticos (Modelo 3) e todos os fatores incluindo a condição de DCC (Modelo 4). Os mesmos pontos de corte por tercis (420 e 310 ng/ml, os 67<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> percentis, respectivamente) foram aplicados ao estudo, assim como nas análises precedentes. A própria condição de DCC se revelou um preditor do risco, com razão de risco de 2,26 em um modelo totalmente ajustado. As razões de risco das análises de regressão de Cox demonstraram que a Lp-PLA<sub>2</sub> foi um preditor significativo e independente do risco de AVC isquêmico para o tercil mais alto, quando comparado ao tercil mais baixo de Lp-PLA<sub>2</sub>, para todos os participantes, com um aumento de até quase 2 vezes, mesmo após o ajuste para diabetes, lipídios, pressão arterial, condição de fumante/não fumante, índice de massa corporal (IMC) e outros marcadores inflamatórios e condição de DCC (vide Tabela 3).

**Tabela 3. Razões de risco de AVC isquêmico para todos os pacientes**

Lp-PLA <sub>2</sub>	Razão de risco da Lp-PLA <sub>2</sub> (IC 95%, valor p)*		
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
Nº casos AVC isquêmico/total de pacientes	47/283 <b>(16,6%)</b>	44/305 <b>(14,4%)</b>	103/368 <b>(28,0%)</b>
Modelo 1	<b>1,0</b>	<b>0,85</b> (0,57 a 1,29, p = 0,45)	<b>1,79</b> (1,27 a 2,52, p = 0,0010)
Modelo 2	<b>1,0</b>	<b>0,89</b> (0,59 a 1,35, p = 0,58)	<b>2,09</b> (1,46 a 3,01, p = 0,0001)
Modelo 3	<b>1,0</b>	<b>0,89</b> (0,58 a 1,36, p = 0,59)	<b>1,81</b> (1,22 a 2,69, p = 0,0034)
Modelo 4	<b>1,0</b>	<b>0,86</b> (0,56 a 1,31, p = 0,48)	<b>1,75</b> (1,18 a 2,60, p = 0,0057)

\*O tercil mais baixo com valores de Lp-PLA<sub>2</sub> < 310 ng/ml foi usado como grupo de referência.

Modelo 1: análise univariada

Modelo 2: ajustado para idade, raça e sexo

Modelo 3: Modelo 2, mais ajuste para diabetes, LDL, HDL, pressão arterial, fumante/não fumante, IMC e PCR

Modelo 4: Modelo 3, mais ajuste para DCC





Análises adicionais foram realizadas para determinar se a Lp-PLA<sub>2</sub> era preditiva de AVC isquêmico em toda a faixa de pressão arterial (PAS) da população, bem como para determinar se a pressão arterial e a Lp-PLA<sub>2</sub> seriam cumulativas na avaliação do risco de AVC isquêmico. Os pontos de corte por tercis de pressão arterial sistólica foram atribuídos pelos 33<sup>o</sup> e 67<sup>o</sup> percentis da população (113 e 130 mmHg, respectivamente). A população do estudo foi dividida nas faixas baixa, intermediária e alta (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> tercis) de PAS e nas faixas baixa e alta de Lp-PLA<sub>2</sub> (abaixo e acima da média de 377 ng/ml do estudo ARIC). O risco relativo de cada grupo foi comparado com o risco de eventos associados ao grupo no 1<sup>o</sup> tercil de PAS e ao grupo abaixo da média de Lp-PLA<sub>2</sub> (Tabela 4).

**Tabela 4. Razões de risco de AVC isquêmico: efeitos cumulativos de Lp-PLA<sub>2</sub> e pressão arterial sistólica**

		Lp-PLA <sub>2</sub>	
		Abaixo da média	Acima da média
PAS (mmHg)	Nº casos AVC isquêmico/total de pacientes na categoria	68/478 <b>(14,2%)</b>	126/478 <b>(26,4%)</b>
< 113	29/270 <b>(10,7%)</b>	<b>1,00</b>	<b>2,29</b> (p = 0,03)
113 a 130	60/337 <b>(17,8%)</b>	<b>2,05</b> (p = 0,06)	<b>3,53</b> (p = 0,0004)
> 130	105/349 <b>(30,1%)</b>	<b>3,52</b> (p = 0,0005)	<b>6,75</b> (p < 0,0001)

Os indivíduos acima da média de concentração de Lp-PLA<sub>2</sub> no estudo ARIC e no tercil superior de pressão arterial sistólica (> 130 mmHg) tiveram razão de risco de 6,75 (p < 0,0001), em comparação com os indivíduos abaixo da média de Lp-PLA<sub>2</sub> e no tercil mais baixo de pressão arterial. Tais resultados indicam que a Lp-PLA<sub>2</sub> e a pressão arterial foram cumulativas na capacidade de prever o risco e que os indivíduos nos grupos mais altos de ambas as variáveis tiveram o risco mais alto de sofrer um AVC isquêmico associado à aterosclerose.

## INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA DO PRODUTO

Conjunto de Calibradores (1 a 6), Controles Baixo e Alto  [Xi] R36/38 S26/36/37/39	Solução-Tampão de Lavagem 20X R36/38 S26/36/37/39  [Xi]	Solução de Parada R34/41 S26/36/37/39  [Xi]	Conjugado, Reagente TMB  [Xi]
---	---	---	---

R34	Causa queimaduras
R36	Irritante para os olhos
R38	Irritante para a pele
R41	Risco de lesões graves aos olhos
S26	Em caso de contato com os olhos, enxágue imediatamente com água abundante e consulte um médico
S36/37/39	Usar roupas de proteção, luvas e proteção ocular/facial adequadas

## REFERÊNCIAS

- [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.