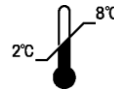




# Kit ELISA de la prueba PLAC®

**REF**  
90123

Inmunoensayo enzimático para la determinación  
cuantitativa de Lp-PLA<sub>2</sub> en el plasma y suero humano



www.plactest.com



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

## Clave de símbolos



Número de catalogo



Dispositivo médico de diagnóstico *in vitro*



Placa recubierta con anticuerpos



Lote



Calibrador



Fecha de caducidad



Control bajo



Guardar entre 2 y 8 °C



Control alto



Irritante



Tampón de lavado



Consulte las instrucciones de uso



Conjugado



Fabricante



Sustrato TMB



Representante autorizado en la Comunidad Europea



Solución de parada



Conformidad europea

Lea este prospecto completamente antes de utilizar el producto. Siga las instrucciones cuidadosamente cuando realice los tests. Si no se siguen las instrucciones se pueden obtener resultados inexactos.

Este producto está cubierto por los números de patentes norteamericanas 5532152, 5641669, 5698403, 5847088, 5968818, 5981252, 6177257, 7045329, 7416853 y los números de patentes europeas 658205 y 673426. Patentes adicionales pendientes.

**PLAC** y PLAC son marcas comerciales de diaDexus, Inc., registradas en los Estados Unidos.

Copyright © 2011 diaDexus, Inc. Todos los derechos reservados.

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

## USO PREVISTO

El kit ELISA de la prueba PLAC<sup>®</sup> de diaDexus es un inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Lp-PLA<sub>2</sub> (fosfolipasa A<sub>2</sub> asociada a lipoproteína) en plasma o suero, para usarlo junto con la evaluación clínica y la valoración del riesgo del paciente, como ayuda en la predicción del riesgo de cardiopatía coronaria e ictus isquémico asociados con la arteriosclerosis.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La Lp-PLA<sub>2</sub> es una serina lipasa calcio-independiente que está asociada tanto con una lipoproteína de baja densidad (LDL) y, en menor medida, con una lipoproteína de alta densidad (HDL) en el plasma y el suero humano [1] y se diferencia de otras fosfolipasas, tales como cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub> [2]. La Lp-PLA<sub>2</sub> es producida por macrófagos y otras células inflamatorias y se expresa en concentraciones mayores en las lesiones ateroscleróticas avanzadas que en las lesiones de las etapas más tempranas [3,4]. Varias líneas de evidencia sugieren que la oxidación de LDL juega un papel crítico en el desarrollo y la progresión de la arteriosclerosis [5,6]. La Lp-PLA<sub>2</sub> participa en la modificación oxidativa de LDL hidrolizando fosfatidilcolina oxidada generando lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres oxidados, productos proinflamatorios que contribuyen a la formación de placas ateroscleróticas [7,8,9]. La Lp-PLA<sub>2</sub> ha demostrado unas variaciones intra- e inter-individuales modestas, proporcionadas con otros marcadores de lípidos cardiovasculares y sustancialmente menores que la proteína reactiva-C (CRP, C-reactive protein). Además, la Lp-PLA<sub>2</sub> no asciende en condiciones inflamatorias sistémicas, y puede ser un marcador más específico de inflamación vascular. La variación biológica relativamente pequeña de la Lp-PLA<sub>2</sub> y su especificidad resultan valiosas en la detección y la supervisión del riesgo cardiovascular [10,11].

Se encontraron niveles elevados de Lp-PLA<sub>2</sub>, cuando se midieron en el inmunoensayo, en pacientes con cardiopatía cardíaca (CHD, Coronary heart disease) probada angiográficamente, cuando se compararon con controles emparejados por edad [1]. En un estudio de control de casos retrospectivo, en el que se utilizaron muestras de hombres hipercolesterolémicos (n=1740), el West of Scotland Coronary Prevention Study (Estudio de prevención coronaria del oeste de Escocia, WOSCOPS), se observó que los sujetos del quintil más alto de los niveles de Lp-PLA<sub>2</sub> presentaban el doble de riesgo de sufrir cardiopatía cardíaca comparados con los del quintil más bajo [12]. Además, se demostró que la asociación de riesgo de CHD del Lp-PLA<sub>2</sub> era independiente de LDL y otros marcadores de inflamación: la proteína reactiva-C, el número de glóbulos blancos y fibrinógeno. Los autores del estudio establecieron en sus conclusiones, “Elevados niveles de fosfolipasa A<sub>2</sub> asociada a lipoproteína parecen ser un fuerte factor de riesgo para la cardiopatía coronaria, éste es un hallazgo que tiene implicaciones para la aterogénesis y la valoración del riesgo”. En otro informe, en el que se utilizaron muestras del estudio Atherosclerosis Risk in Communities (Riesgo de aterosclerosis en comunidades, ARIC), y se hizo el seguimiento de 12.819 hombres y mujeres aparentemente sanos, de mediana edad (45 a 64 años), durante seis a ocho años, se descubrió que la Lp-PLA<sub>2</sub> era un importante factor pronóstico del riesgo de CHD. Para individuos con LDL inferior a 130 mg/dL, la Lp-PLA<sub>2</sub> fue significativamente e independientemente asociada con un riesgo dos veces más alto para sufrir episodios de CHD, tales como revascularización, infarto de miocardio y muerte por cardiopatía [13].

El estudio ARIC se volvió a analizar para determinar el riesgo de ictus asociado con el aumento de los niveles de Lp-PLA<sub>2</sub>. Se identificaron un total de 223 sucesos de ictus en el grupo de estudio, de estos 194 (87%) fueron ictus isquémicos asociadas con arteriosclerosis, según la clasificación de los investigadores del estudio ARIC. Esta proporción de ictus isquémico con el total es coherente con el porcentaje encontrado en la población general [14]. Los resultados de este estudio indicaron que la Lp-PLA<sub>2</sub> era un fuerte factor pronóstico de estos ictus isquémicos, con un aumento del riesgo de casi el doble, incluso después del ajuste de la tensión sanguínea, los lípidos, la diabetes, el índice de masa corporal y otros marcadores inflamatorios [15].

## PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El kit ELISA de la prueba PLAC de diaDexus es un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos monoclonales altamente específicos para la medición directa de la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub> en plasma y suero humano. El sistema de ensayo utiliza anticuerpos monoclonales anti-Lp-PLA<sub>2</sub> (2C10), dirigidos contra la Lp-PLA<sub>2</sub> para la inmovilización en fase sólida en la microplaca. La

muestra se añade a la placa y se incuba durante 10 minutos a 20 a 26 °C. A continuación, se agrega un segundo anticuerpo monoclonal anti-Lp-PLA<sub>2</sub> (4B4) marcado con la enzima peroxidasa de rábano (HRP) y se hace reaccionar con el antígeno inmovilizado a 20 a 26 °C durante 180 minutos, lo que provoca que las moléculas de Lp-PLA<sub>2</sub> queden capturadas entre la fase sólida y los anticuerpos marcados con la enzima. Los pocillos se lavan con un tampón suministrado para eliminar todo el antígeno no unido. A continuación, se añade el sustrato, tetrametilbenzidina (TMB), y se incuba a 20-26 °C durante 20 minutos, lo que da lugar a la aparición de un color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de la solución de parada, que cambia el color a amarillo. La absorbancia de la conversión enzimática del sustrato se determina espectrofotométricamente a 450 nm y es directamente proporcional a la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub> presente. Se usa un conjunto de calibradores Lp-PLA<sub>2</sub> para realizar el gráfico de una curva estándar de absorbancia frente a la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub>, por la que se puede determinar la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub> en la muestra de la prueba. Se suministran dos niveles de controles para supervisar el rendimiento dentro del rango clínico del ensayo.

## REACTIVOS Y MATERIALES

### Materiales provistos con el kit: (suficiente para 96 pocillos)

N.º DE REFERENCIA	SÍMBOLO	DESCRIPCIÓN DEL COMPONENTE	CANTIDAD
60001	<b>PLATE</b>	<b>Placa recubierta con anticuerpos</b> Microplaca recubierta con anticuerpos monoclonales de ratón anti-Lp-PLA <sub>2</sub> (2C10)	1
60006	<b>CAL</b>	<b>Calibradores</b> (0, 50, 100, 250, 500 y 1000 ng/mL)	1 juego, 0,25 mL cada uno
60007			
60008			
60009			
60010			
60011			
60002	<b>WASH</b>	<b>Tampón de lavado 20X</b> Detergente no iónico en una solución tampón	50 mL
60003	<b>CONJ</b>	<b>Conjugado</b> Anticuerpo monoclonal de ratón anti-Lp-PLA <sub>2</sub> (4B4) conjugado con peroxidasa de rábano en un reactivo tamponado con proteínas transportadoras bovinas y de ratón	23 mL
60004	<b>TMB</b>	<b>Reactivo TMB</b> 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina en un tampón ligeramente ácido	11 mL
60005	<b>STOP</b>	<b>Solución de parada</b> HCl 1N	11 mL
65009	<b>CONTROL LOW</b>	<b>Control bajo</b> (~150 ng/mL) Antígeno recombinante diaDexus Lp-PLA <sub>2</sub> (DDX-RA) en una matriz líquida amortiguada con proteína (BSA)	1 frasco, 0,5 mL
65010	<b>CONTROL HIGH</b>	<b>Control alto</b> (~350 ng/mL) Antígeno recombinante diaDexus Lp-PLA <sub>2</sub> (DDX-RA) en una matriz líquida amortiguada con proteína (BSA)	1 frasco, 0,5 mL
FMD-01-026		<b>Certificado de análisis - Rangos de control</b> Los rangos de control para cada lote aparecen indicados en el certificado de análisis	1 de cada

### **Materiales necesarios pero no suministrados:**

- Pipetas de precisión de uno o varios canales: 0,02, 0,10, 0,20 mL
- Puntas de pipeta desechables (se debe utilizar una nueva punta de pipeta para cada adición de las diferentes muestras o reactivos durante el procedimiento de ensayo)
- Mezclador vorticial o equivalente
- Agua desionizada
- Lector de microplacas con un ancho de banda de 10 nm o menos y una densidad óptica (DO) en el rango de 3 o más a 450 nm
- Software capaz de realizar un ajuste de curva punto a punto para el cálculo de la concentración del analito a partir de la densidad óptica (opcional)

### **ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

- Para uso en diagnóstico *in vitro*.
- Trate todas las muestras de sangre como material biológico potencialmente peligroso.
- La exposición de las muestras a la temperatura ambiente debe minimizarse a menos de 6 horas (tiempo utilizado para la extracción de sangre, el procesamiento, el transporte y el tiempo de análisis de la muestra en el laboratorio). Esto no incluye la incubación en la placa ELISA.
- El almacenamiento de las muestras a -20 °C durante más de 24 horas no está recomendado.
- Algunos componentes están etiquetados con precauciones de seguridad. Consulte la sección de Información sobre seguridad del producto.
- Deseche los reactivos de conformidad con los reglamentos aplicables.
- No utilice los reactivos después de sus fechas de caducidad.
- No mezcle los reactivos de diferentes números de lotes de kits.
- No use el producto si existen evidencias de contaminación.
- La hemólisis puede afectar a los resultados. No analice muestras hemolizadas.
- Se recomienda incluir en cada análisis los controles bajo y alto. Si los valores de control no se encuentran dentro de los límites de aceptación, repita el ensayo. Es posible que sea necesario realizar pruebas de control de calidad adicionales de conformidad con los reglamentos locales y estatales.
- Para evitar resultados erróneos, almacene los materiales según se indica.
- Los rangos de control provistos se derivaron de pruebas replicadas de lotes de control específicos utilizando los kits ELISA de la prueba PLAC y deben utilizarse como orientación. Las medias de los laboratorios individuales pueden variar de los valores listados. Las variaciones entre los laboratorios pueden ser ocasionadas por diferencias técnicas o por la variabilidad de los reactivos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos aceptables.

### **PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS**

Almacene los kits de prueba sin abrir entre 2 y 8 °C tras su recepción. Además, mantenga la microplaca sellada en la bolsa de aluminio con desecante para minimizar la exposición a la humedad. Los kits de prueba abiertos se mantendrán estable hasta la fecha de caducidad indicada, siempre que se conserven como se ha descrito anteriormente.

Prepare el tampón de lavado 1X diluyendo el tampón de lavado 20X 1:20 con agua desionizada. Mezcle 1 parte de tampón de lavado con 19 partes de agua desionizada. Conserve a temperatura ambiente (entre 20 y 26 °C). Utilice el tampón de lavado 1X en un plazo de cuatro semanas desde la fecha de preparación. Deseche el tampón si observa crecimiento microbiano.

## RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

- El ayuno no es necesario.
- Recoja las muestras de sangre en
  - tubos para la separación de suero o plasma tratados con gel
  - tubos de recogida de plasma con heparina o EDTA
  - cualquier tubo de recogida de suero.
- Procese las muestras mediante procedimientos de separación estándar.
  - Las muestras se deben centrifugar y separar en el transcurso de las cuatro horas posteriores a la venopunción, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio, pero no después de que hayan transcurrido 36 horas desde la extracción de sangre. Las muestras se deben almacenar refrigeradas (de 2 a 8 °C).
- Muestras de sangre sin procesar:
  - Almacene y transporte las muestras en paquetes fríos (de 2 a 8 °C) y procéselas en las 36 horas siguientes a la recogida.
- Muestras procesadas:
  - Las muestras se deben almacenar refrigeradas de 2 a 8 °C durante un mínimo de 24 horas después de que la muestra haya sido extraída antes de que pueda tener lugar la prueba.
  - Las muestras se pueden analizar hasta 7 días después de que la muestra haya sido extraída siempre que se hayan almacenado de 2 a 8 °C.
  - Para un almacenamiento a más largo plazo, las muestras de suero/plasma se deben almacenar a o por debajo de -70 °C. Una vez descongelada, la muestra se puede analizar hasta 7 días después, siempre que se haya almacenado de 2 a 8 °C. Las muestras pueden congelarse y descongelarse dos veces sin que eso afecte a la cuantificación de la Lp-PLA<sub>2</sub>.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

### Calibración

Cada análisis de placas o tiras se debe calibrar utilizando una curva de calibración completa (6 puntos). Se puede generar una curva estándar utilizando el modelo de ajuste de curva punto a punto. Verifique la curva de calibración con al menos dos niveles de controles siguiendo los requisitos del laboratorio. Calibre y analice los controles para cada ensayo de placa.

### Control de calidad

Analice los controles alto y bajo con cada ensayo. Si los valores de control no se encuentran dentro de los límites de aceptación, repita el ensayo. Es posible que sea necesario realizar pruebas de control de calidad adicionales de conformidad con los reglamentos locales, estatales y/o federales o los requisitos de acreditación.

### Pasos de preparación

1. Deje que la microplaca, el conjugado, el tampón de lavado y el TMB se atemperen a temperatura ambiente (20 a 26 °C) antes de su uso.
2. Retire de la bolsa de papel de aluminio el marco de la placa y el número necesario de microtiras recubiertas. Vuelva a sellar completamente la bolsa de aluminio que contiene las tiras no utilizadas, junto con el desecante incluido en la bolsa, y almacénela de 2 a 8 °C.
3. Prepare el tampón de lavado 1X diluyendo el tampón de lavado 20X 1:20 con agua desionizada (1 parte de tampón de lavado y 19 partes de agua desionizada). Conserve a temperatura ambiente (entre 20 y 26 °C). Utilice el tampón de lavado 1X en un plazo de cuatro semanas desde la fecha de preparación.
4. Deje que las muestras de pacientes se descongelen a 2-8 °C, si fuese necesario, y colóquelas en hielo o entre 2 y 8 °C una vez descongeladas.
5. Conserve los controles de 2 a 8 °C o en hielo hasta su uso.
6. Con ayuda de un mezclador vorticial, agite las muestras y los controles para mezclarlos bien. Evite la formación de espuma.

## Incubación de las muestras

1. Con una pipeta y una punta de pipeta con una precisión adecuada de bajo volumen, administre 20  $\mu\text{L}$  de los calibradores, las muestras y los controles en los pocillos correspondientes, una vez mezclados. Utilice una pipeta calibrada y una punta de pipeta nueva para cada calibrador, control o muestra.
2. Deje que las muestras se incuben en la placa durante  $10 \pm 2$  minutos antes de añadir el conjugado.
3. Pipetee 200  $\mu\text{L}$  de conjugado a temperatura ambiente en los pocillos correspondientes de la microplaca recubierta. Evite la contaminación mediante la adición del conjugado sin tocar las muestras con las puntas de pipeta. Si se produce la contaminación cruzada, cambie la punta de pipeta y siga añadiendo conjugado a los pocillos.
4. Incube durante 3 horas a temperatura ambiente.
5. Al final del periodo de incubación, lave los micropocillos cuatro (4) veces con un mínimo de 300  $\mu\text{L}$  del tampón de lavado 1X suministrado a temperatura ambiente. (NO USE AGUA DEL GRIFO o DESTILADA).
6. Deje la placa sobre papel absorbente después del último lavado. Inmediatamente (en menos de 2 minutos), proceda al siguiente paso. No deje que la microplaca se seque.

## Incubación del sustrato

1. Pipetee 100  $\mu\text{L}$  de reactivo TMB a temperatura ambiente en cada pocillo.
2. Mueva suavemente la placa sobre una superficie plana de 10 a 15 segundos para que se mezcle.
3. Incube la placa a temperatura ambiente durante 20 minutos protegida de la luz.
4. Detenga la reacción añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de parada a temperatura ambiente a cada pocillo.
5. Mueva suavemente la placa sobre una superficie plana de 20 a 30 segundos para que se mezcle. Es importante asegurarse de que el color azul cambie completamente al color amarillo.
6. Seque la humedad de la parte inferior de la placa con una toalla de papel.
7. En el transcurso de los 15 minutos posteriores a la adición de la solución de parada, lea la densidad óptica (DO) a 450 nm mediante un lector de microplacas.

## NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- Almacene todos los reactivos de la prueba de 2 a 8 °C. A excepción de los calibradores y los controles, deje que los reactivos se atemperen a temperatura ambiente antes de usarlos. Un frasco de 23 ml de reactivo puede requerir una hora o más para llegar a la temperatura ambiente. Mantenga los calibradores y los controles de 2 a 8 °C o en hielo hasta su uso.
- Deje que la microplaca se atempere a temperatura ambiente antes de abrir la bolsa. Guarde las tiras en la bolsa de aluminio con desecante para minimizar la exposición a la humedad. Mantenga siempre las tiras no utilizadas dentro de la bolsa de aluminio con desecante.
- Tenga siempre preparado el reactivo del paso siguiente entre 2 y 3 minutos antes de la etapa de lavado.
- Para conseguir una medición exacta de las muestras, la adición de las muestras, los calibradores y los controles debe ser precisa. Pipetee cuidadosamente utilizando únicamente equipos calibrados.
- Este ensayo se puede llevar a cabo mediante cualquier método de lavado validado.
- No utilice selladores de placa durante las incubaciones.
- No utilice una mesa agitadora durante las etapas de incubación.

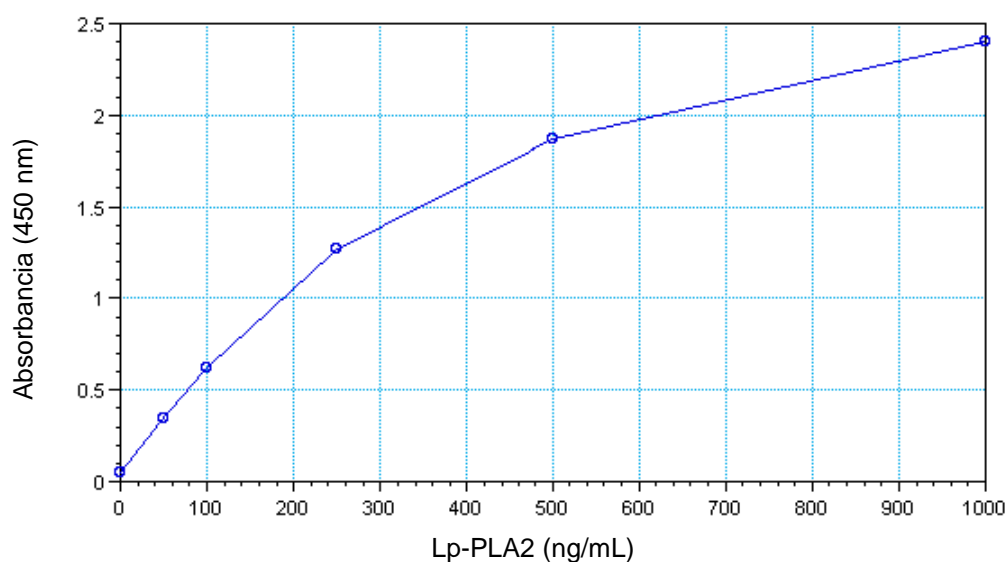
## CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Construya una curva de calibración representando la absorbancia obtenida para cada calibrador en el eje "y" frente a la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub> en ng/mL en el eje "x". Utilice un ajuste de curva punto a punto con el software informático adecuado para construir la curva de calibración.
2. Usando el valor de absorbancia para cada muestra y control, determine la concentración correspondiente de la Lp-PLA<sub>2</sub> en ng/mL en la curva de calibración.

## EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRADOR

En una curva de calibración, las lecturas de DO a 450 nm se representan en el eje "y" del gráfico, frente a las concentraciones Lp-PLA<sub>2</sub> (ng/mL) que se muestran en el eje "x". Esta curva de calibración sirve meramente a efectos ilustrativos. El usuario debe generar una curva de calibración para cada análisis realizado.

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



## LIMITACIONES

### Procedimiento

- Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una comprensión completa de las instrucciones del prospecto y siguiendo una buena práctica de laboratorio.
- Los procedimientos de lavado son fundamentales. Un lavado insuficiente dará lugar a una mala precisión y a lecturas falsamente elevadas de la absorbancia.
- Como con cualquier sistema de inmunoensayo, particularmente los que emplean anticuerpos monoclonales de ratón, existe la posibilidad de interferencia por los anticuerpos antimurínicos humanos (HAMA) u otras interferencias heterofílicas presentes en la muestra, que podrían producir valores falsamente elevados o disminuidos.
- Al igual que ocurre con cualquier método analítico, existe la posibilidad de que sustancias o factores no probados (p. ej. técnicos o procedimentales) interfieran en la prueba y provoquen resultados falsos. Los resultados deben considerarse en conjunción con otros procedimientos clínicos y analíticos.

## Interpretación clínica

- Los niveles de Lp-PLA<sub>2</sub> deben interpretarse junto con los hallazgos clínicos y otras pruebas diagnósticas.
- Esta prueba no sustituye a las pruebas de colesterol en sangre u otros factores de riesgo tradicionales identificados para la cardiopatía coronaria o el ictus isquémico.

## VALORES ESPERADOS

Muestras de sujetos masculinos (n=251) y sujetos femeninos (n=174) aparentemente saludables, en un rango de edad relevante clínicamente que va desde 40 a 70 años, fueron evaluadas con kit ELISA de la prueba PLAC de diaDexus. La población de referencia fue representada por los siguientes grupos étnicos: AfroAmericanos n=26, Caucasianos n=390, Hispanos n=8 y no especificados n=1. En la siguiente tabla aparecen las distribuciones de los valores Lp-PLA<sub>2</sub> para toda la población y divididas por género:

Percentil	Lp-PLA <sub>2</sub> ng/mL		
	Todos (n=425)	Sujetos femeninos (n=174)	Sujetos masculinos (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

Se ofrecen estos rangos de referencia únicamente como directrices y no pretenden señalar "valores críticos" o límites de decisiones médicas. Cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia. Se puede encontrar una guía para establecer intervalos de referencia en CLSI Standard C28-A2 (*How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition*). Basándose en la concentración media de Lp-PLA<sub>2</sub> en la población de 235 ng/mL, se ha sugerido usar ese valor como un umbral de decisión clínica [16]. Más recientemente, un panel de consenso de expertos ha sugerido aplicar un umbral de decisión de 200 ng/mL, en base a un conjunto significativo de literatura publicada para la evaluación del riesgo de la Lp-PLA<sub>2</sub> [17].

## CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### Sensibilidad

El límite mínimo de detección es 0,34 ng/mL, calculado mediante la interpolación de la media más dos desviaciones típicas de 20 repeticiones del calibrador de 0 ng/mL de Lp-PLA<sub>2</sub>.

## Precisión del ensayo

La variabilidad de intraensayo e interensayo se determinó analizando cuatro muestras de suero humano combinado con concentraciones de Lp-PLA<sub>2</sub> distribuidas en todo el rango de calibración del ensayo. Los sueros combinados se analizaron por duplicado, en dos tiras distintas cada día, durante 5 días, en cuatro placas al día. A continuación se resumen los datos:

Suero combinado	Concentración media de Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/mL)	%CV intraensayo n=80	%CV interensayo 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

En un estudio de repetibilidad llevado a cabo en un conjunto de 108 muestras de suero, los resultados del ensayo determinados a partir de los primeros pocillos (ensayo de un solo punto) se compararon con los resultados promedio de dos mediciones sucesivas (pocillos duplicados). Las concentraciones de Lp-PLA<sub>2</sub> de las muestras variaron entre 87 y 575 ng/mL, mientras que el %CV promedio entre repeticiones fue del 2,3%. En un análisis de regresión lineal, los resultados de un único punto están altamente correlacionados con los resultados promedio duplicados: coeficiente de correlación  $r=0,997$  (pendiente 1,0 y ordenada en el origen -1,3 ng/mL).

## Linealidad

Se mezclaron seis muestras de suero con concentraciones conocidas y elevadas de Lp-PLA<sub>2</sub> con seis muestras de suero con concentraciones conocidas y bajas de Lp-PLA<sub>2</sub>. Las recuperaciones porcentuales se determinaron como el valor promedio dividido por el valor esperado, multiplicado por 100. La recuperación promedio fue del 93%, lo que demuestra la linealidad de las muestras diluidas en un rango 151 a 810 ng/mL de Lp-PLA<sub>2</sub>.

## Sustancias interferentes

Se evaluaron sustancias endógenas encontradas en sangre y sustancias exógenas (medicamentos con y sin receta médica) para determinar la interferencia en el ensayo. Se añadieron posibles sustancias interferentes a cinco muestras de suero individuales con valores de Lp-PLA<sub>2</sub> comprendidas entre 163 y 908 ng/mL. No se observó ninguna interferencia apreciable para las siguientes sustancias en los niveles de adición analizados.

Endógenas		Exógenas (medicamentos sin receta, etc.)	
Possible interferente	Concentración de la prueba	Possible interferente	Concentración de la prueba
Bilirrubina	20 mg/dL	Paracetamol	1,66 µmol/L
Colesterol	500 mg/dL	Aspirina	3300 µmol/L
Hemoglobina	1250 mg/dL	Atorvastatina	20 µmol/L
Triglicéridos	3000 mg/dL	Bisulfato de clopidogrel	140 µmol/L
Albumina total*	~6500 mg/dL	Difenhidramina	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
		Tolbutamida	2400 µmol/L
		Vitamina C	227 µmol/L
		Warfarina	64,9 µmol/L

\* 2,5 g/dL de albumina añadidas a la mezcla de plasma, presumiblemente de 4 g/dL de albumina

## ESTUDIOS CLÍNICOS

### Cardiopatía coronaria

Para determinar la eficacia del kit ELISA de la prueba PLAC de diaDexus como factor pronóstico del riesgo para la cardiopatía coronaria (CHD), se midieron los niveles de Lp-PLA<sub>2</sub> en 1.348 muestras del banco de plasma-EDTA de un gran estudio epidemiológico llevado a cabo en varios centros, el estudio Atherosclerosis Risk In Communities (Riesgo de aterosclerosis en comunidades, ARIC), patrocinado por National Institutes of Health's National Heart, Lung, and Blood Institute (Instituto Nacional de Salud del Corazón, los Pulmones y la Sangre). Se hizo el seguimiento a los participantes para estudiar el desarrollo de CHD durante seis a ocho años. Las muestras utilizadas para la prueba PLAC eran de participantes con edades comprendidas entre los 47 y 69 años, que no tenían CHD en el momento de la extracción de sangre. Este fue un estudio de cohorte de casos donde las muestras de todos los casos CHD (607) se analizaron junto con 741 participantes emparejados correctamente sin CHD en el momento censor (controles).\*

Se utilizaron los modelos de regresión de Cox para evaluar la asociación de Lp-PLA<sub>2</sub> y CHD en un análisis de una sola variable (Modelo 1), un análisis de una sola variable ajustado a los datos demográficos (Modelo 2), y un modelo con múltiples variables ajustado a los datos demográficos y otros factores de pronóstico (Modelo 3). Se utilizaron los puntos de corte de los terciles alto y bajo de Lp-PLA<sub>2</sub>, generados a partir de los datos del estudio ARIC establecidos (420 y 310 ng/mL, los percentiles 67<sup>o</sup> y 33<sup>o</sup> respectivamente), los índices de peligro de los análisis de regresión de Cox demostraron que la Lp-PLA<sub>2</sub> era un factor pronóstico significativo de riesgo para CHD, para los niveles más alto e intermedio, cuando se comparaban con el nivel más bajo de Lp-PLA<sub>2</sub>, para todos los participantes (véase Tabla 1). Se debe observar que diferentes puntos de corte pueden ser apropiados para diferentes poblaciones clínicas.

\* NOTA: 86 resultados (5,5%) se encontraban fuera del criterio de aceptación del ensayo y se excluyeron de los análisis de datos.

**Tabla 1. Índices de riesgo de CHD para sujetos en todos los niveles de LDL**

Lp-PLA <sub>2</sub>	Índice de riesgo de Lp-PLA <sub>2</sub> (IC del 95%, valor de p)*		
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
<b>N.º de casos de CHD/total de sujetos en la categoría</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)

\*Se usó el tercil más bajo con valores de Lp-PLA<sub>2</sub> <310 ng/mL como grupo de referencia.

Modelo 1: análisis con una sola variable

Modelo 2: ajustado por edad, raza y género

Modelo 3: Modelo 2, más ajuste según el estado de tabaquismo actual, tensión sanguínea, diabetes, HDL, LDL, CRP e Interacción Lp-PLA<sub>2</sub> - LDL

Se encontró una interacción estadística entre Lp-PLA<sub>2</sub> y LDL. Por lo tanto, resultó apropiado evaluar los índices de riesgo de Lp-PLA<sub>2</sub> en los subgrupos LDL alto y bajo. El valor medio de LDL para la población cohorte fue 130 mg/dL. Esto definió los subgrupos LDL alto y bajo. Las tablas 2a y 2b representan el análisis de una sola variable de los índices de riesgo en los subgrupos de LDL alto y bajo. Los índices de riesgo se calcularon a partir de la regresión de Cox empleando el método ponderado de cohorte de casos con el ajuste Barlow, n=1348.

**Tabla 2a. Índices de riesgo de CHD para sujetos con LDL <130 mg/dL**

	Índice de riesgo de Lp-PLA <sub>2</sub> (IC del 95%)*		
Lp-PLA <sub>2</sub> <sup>†</sup>	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
Índice de riesgo	1,0	2,17 (1,41 a 3,36)	3,52 (2,25 a 5,49)
N.º de casos de CHD/total de sujetos en la categoría	51/215 (23,7%)	75/195 (38,5%)	77/163 (47,2%)

\*Se usó el tercil más bajo con valores de Lp-PLA<sub>2</sub> <310 ng/mL como grupo de referencia.

<sup>†</sup>Los puntos de corte de la Lp-PLA<sub>2</sub> se basan en la población del estudio ARIC en todos los niveles LDL.

**Tabla 2b. Índices de riesgo de CHD para sujetos con LDL ≥130 mg/dL**

	Índice de riesgo de Lp-PLA <sub>2</sub> (IC del 95%)*		
Lp-PLA <sub>2</sub> <sup>†</sup>	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
Índice de riesgo	3,15 (2,08 a 4,77)	3,66 (2,43 a 5,51)	5,10 (3,43 a 7,57)
N.º de casos de CHD/total de sujetos en la categoría	110/234 (47,0%)	126/247 (51,0%)	169/294 (57,5%)

\*Se usó el tercil más bajo para el subgrupo con LDL <130 con valores de Lp-PLA<sub>2</sub> <310 ng/mL como grupo de referencia.

<sup>†</sup>Los puntos de corte de la Lp-PLA<sub>2</sub> se basan en la población del estudio ARIC con LDL ≥130 mg/dL.

En el subgrupo de LDL alto, los grupos de terciles específicos del subgrupo ofrecieron puntos de corte de 350 y 460 ng/mL; el índice de riesgo aumentó con valores más altos de Lp-PLA<sub>2</sub>. Por lo tanto, para individuos con un LDL alto, se debe considerar un punto de corte Lp-PLA<sub>2</sub> más alto. Está justificado realizar investigación adicional para evaluar la interacción Lp-PLA<sub>2</sub> - LDL en el subgrupo con LDL alto. Para el total de la población, la Lp-PLA<sub>2</sub> fue un factor pronóstico significativo de riesgo para CHD para los grupos alto e intermedio frente al grupo (de referencia) de Lp-PLA<sub>2</sub>.

### Ictus isquémico

Se evaluaron los niveles de Lp-PLA<sub>2</sub> en el estudio ARIC para determinar su eficacia como factor pronóstico del riesgo de ictus. Se identificaron un total de 223 episodios de ictus en el grupo de estudio, de estos 194 (87%) fueron ictus isquémicos asociados con arteriosclerosis, según la clasificación de los investigadores del estudio ARIC. Se diseñó un estudio de cohorte de casos similar donde las muestras de todos los casos de ictus isquémico (194) se analizaron con 762 participantes emparejados apropiadamente sin CHD o ictus en el momento censor (controles).

Al igual que en el estudio de riesgo de CHD, se utilizaron los modelos de regresión de Cox para evaluar la asociación de Lp-PLA<sub>2</sub> e ictus en un análisis de una sola variable (Modelo 1), un análisis de una sola variable ajustado a los datos demográficos (Modelo 2), y un modelo de múltiples variables ajustado a los datos demográficos y otros factores de pronóstico (Modelo 3), y todos los factores, incluyendo el estado CHD (Modelo 4). En este estudio se aplicaron los mismos puntos de corte de terciles (420 y 310 ng/mL, los percentiles 67<sup>o</sup> y 33<sup>o</sup> respectivamente), al igual que en los análisis anteriores. Se descubrió que el mismo estado de CHD es un factor pronóstico de riesgo, con un índice de riesgo de 2,26 en un modelo completamente ajustado. Los índices de riesgo de los análisis de regresión de Cox demostraron que la Lp-PLA<sub>2</sub> era un factor pronóstico de riesgo significativo e independiente para el ictus isquémico para los terciles más altos, cuando se comparaban con el tercil más bajo de Lp-PLA<sub>2</sub>, para todos los participantes, con un aumento de hasta casi el doble, incluso después del ajuste de la diabetes, los lípidos, la tensión sanguínea, el estado de tabaquismo, el índice de masa corporal (BMI, body mass index), y otros marcadores inflamatorios, así como estado CHD (véase la Tabla 3).

**Tabla 3. Índices de riesgo de ictus isquémico para todos los sujetos**

Lp-PLA <sub>2</sub>	Índice de riesgo de Lp-PLA <sub>2</sub> (IC del 95%, valor de p)*		
	Tercil 1	Tercil 2	Tercil 3
N.º de casos de ictus isquémico/total de sujetos	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)

\*Se usó el tercil más bajo con valores de Lp-PLA<sub>2</sub> <310 ng/mL como grupo de referencia.

Modelo 1: análisis con una sola variable

Modelo 2: ajustado por edad, raza y género

Modelo 3: Modelo 2, más ajuste según diabetes, LDL, HDL, tensión sanguínea, tabaquismo, BMI y CRP

Modelo 4: Modelo 3, más según CHD





Se llevaron a cabo análisis adicionales para determinar si la Lp-PLA<sub>2</sub> era predictiva de ictus isquémico en todo el rango de tensión sanguínea sistólica (SBP, systolic blood pressure) en la población, y para determinar si la tensión sanguínea y la Lp-PLA<sub>2</sub> eran aditivos en la valoración del riesgo de ictus isquémico. Los puntos de corte de los terciles de tensión sanguínea sistólica fueron asignados por los percentiles 33º y 67º de la población (113 y 130 mm Hg, respectivamente). La población del estudio se dividió en rango bajo, medio y alto (1º, 2º y 3º tercil) de SBP y el rango bajo y alto de Lp-PLA<sub>2</sub> (por debajo y por encima de la media, 377 ng/mL en el estudio ARIC). El riesgo relativo de cada grupo se comparó con el riesgo de episodios asociados con el grupo en el 1º tercil de SBP y el grupo por debajo de la media de Lp-PLA<sub>2</sub> (Tabla 4).

**Tabla 4. Índices de riesgo de ictus isquémico: Efectos aditivos de Lp-PLA<sub>2</sub> y tensión sanguínea sistólica**

		Lp-PLA <sub>2</sub>	
		Por debajo de la mediana	Por encima de la mediana
SBP (mm Hg)	N.º de casos de ictus isquémico/total de sujetos en la categoría	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)

Los individuos por encima de la mediana de la concentración de Lp-PLA<sub>2</sub> del estudio ARIC y el tercil superior de la tensión sanguínea sistólica (>130 mm Hg) presentaron un índice de riesgo de 6,75 (p<0,0001), comparado con los individuos que estaban por debajo de la mediana de Lp-PLA<sub>2</sub> y en el tercil más bajo de tensión sanguínea. Estos resultados indicaron que la Lp-PLA<sub>2</sub> y la tensión sanguínea eran aditivos en su capacidad para predecir el riesgo, y que los individuos en los grupos más altos de ambas variables tenían el mayor riesgo de sufrir ictus isquémico asociado con arteriosclerosis.

## INFORMACIÓN SOBRE SEGURIDAD DEL PRODUCTO

Juego de calibradores (1-6), Control bajo y alto R36/38 S26/36/37/39  [Xi]	Tampón de lavado 20X R36/38 S26/36/37/39  [Xi]	Solución de parada R34/41 S26/36/37/39  [Xi]	Conjugado, Reactivo TMB  [Xi]
--	--	--	---

R34	Causa quemaduras
R36	Irrita los ojos
R38	Irrita la piel
R41	Riesgo de lesiones oculares graves
S26	En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico
S36/37/39	Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara

## REFERENCIAS

- [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.