

PLAC[®] test dell'attività della Lp-PLA₂

**Dosaggio enzimatico per la determinazione quantitativa dell'attività della Lp-PLA₂
nel siero o nel plasma umani**



CERTIFICAZIONE EN ISO 13485:2012

Diazyme Laboratories, Inc.
12889 Gregg Court,
Poway, CA 92026 USA
Tel: 1-858-455-4768
www.diazyme.com

ECREP MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany

Legenda dei simboli

	Numero di catalogo		Tampone
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>		Substrato
	Batch		Calibratore
	Data di scadenza		Controllo basso
	Conservare a 2-8 °C.		Controllo alto
	Irritante		Consultare le istruzioni per l'uso
	Conformità europea		Produttore
	Rappresentante autorizzato nella Comunità Europea		Leggere

Leggere interamente il foglietto illustrativo prima di utilizzare il prodotto. Seguire attentamente le istruzioni nell'esecuzione dei test. Il mancato rispetto delle istruzioni può generare risultati errati.

Per specifiche Schede sull'applicazione dell'analizzatore automatico di chimica clinica, contattare il servizio clienti Diazyme al numero 1-858-455-4768.

Cod. art. 30045-08
Rev. B

USO PREVISTO

Il **PLAC[®] test dell'attività della Lp-PLA₂** è un dosaggio enzimatico per la determinazione quantitativa dell'attività della Lp-PLA₂ (fosfolipasi A₂ associata alle lipoproteine) nel plasma e nel siero umani sugli analizzatori automatici di chimica clinica; il test deve essere utilizzato in abbinamento alla valutazione clinica e alla valutazione del rischio del paziente come indicatore di patologia cardiovascolare aterosclerotica.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

La Lp-PLA₂ è una lipasi sierica indipendente dal calcio associata sia alla lipoproteina a bassa densità (LDL) sia, in misura minore, alla lipoproteina ad alta densità (HDL) nel siero e nel plasma umano¹ e si distingue da altre fosfolipasi come la cPLA₂ e la sPLA₂.² La Lp-PLA₂ viene prodotta da macrofagi e altre cellule infiammatorie e si esprime in maggiori concentrazioni nelle lesioni aterosclerotiche avanzate rispetto alle lesioni nelle fasi iniziali.^{3,4} L'ossidazione della LDL rappresenta un passaggio di importanza critica nello sviluppo e nella progressione dell'aterosclerosi.^{5,6} La Lp-PLA₂ partecipa alla scissione delle LDL ossidate nella parete vascolare tramite l'idrolisi dei fosfolipidi ossidati e produce lisofosfatidilcoline e acidi grassi liberi ossidati, entrambi potenti prodotti proinfiammatori che contribuiscono alla formazione delle placche aterosclerotiche.^{7,8,9} La Lp-PLA₂ ha dimostrato una modesta variazione intra-individuale e inter-individuale, commensurata ad altri marcatori lipidici cardiovascolari, e una variabilità sostanzialmente inferiore alla proteina C-reattiva ad alta sensibilità (PCR-hs). Inoltre, la Lp-PLA₂ non è elevata nelle condizioni infiammatorie sistemiche e può essere un marcatore più specifico dell'infiammazione vascolare. La variazione biologica relativamente contenuta della Lp-PLA₂ e la sua specificità vascolare sono di grande aiuto nell'individuazione e nel monitoraggio del rischio vascolare.^{10,11}

PRINCIPIO DEL TEST

Il PLAC test dell'attività della Lp-PLA₂ è un dosaggio enzimatico. La Lp-PLA₂, in siero o plasma, idrolizza la posizione sn-2 del substrato, 1-miristoil-2-(4-nitrofenilsuccinil) fosfatidilcolina, e genera un prodotto di reazione colorato, il 4-nitrofenolo. La velocità di formazione del 4-nitrofenolo viene seguita spettrofotometricamente e l'attività della Lp-PLA₂ viene calcolata sulla base della velocità di variazione dell'assorbanza. Una serie di cinque calibratori di Lp-PLA₂ consente di generare un curve fitting standard della variazione dell'assorbanza rispetto al livello di attività della Lp-PLA₂ in nmol/min/mL, da cui deriva l'attività della Lp-PLA₂ campione.

REAGENTI E MATERIALI

Il PLAC test dell'attività della Lp-PLA₂ ha in dotazione:

SIMBOLO

DESCRIZIONE DEI COMPONENTI



Tampone



Substrato di Lp-PLA₂, 1-miristoil-2-(4-nitrofenilsuccinil) fosfatidilcolina



Calibratore



Controllo basso



Controllo alto



Certificato di analisi - Intervallo di controllo

Gli intervalli di controllo del lotto sono riportati nel Certificato di analisi

Altro materiale necessario ma non fornito

- Manuale dell'analizzatore automatico di chimica clinica e di funzionamento del sistema
- La Scheda sull'applicazione dell'analizzatore specifica per l'analizzatore di chimica clinica utilizzato è disponibile separatamente. Contattare il servizio clienti Diazyme.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

La diluizione dei campioni genera risultati errati. I campioni non possono essere diluiti a nessun livello di attività della Lp-PLA₂.

Campioni elevati con valori della Lp-PLA₂ superiori all'intervallo di misurazione devono essere segnalati come > 400 nmol/min/mL. In uno studio sulla popolazione costituita da oltre 4500 soggetti, 6 dei valori segnalati erano > 400 nmol/min/mL in base al PLAC test dell'attività della Lp-PLA₂.

I campioni emolizzati interferiscono con il dosaggio e non devono essere testati.

I campioni visibilmente emolizzati devono essere riprelevati. L'analisi di campioni emolizzati con > 1,0 mg/mL di emoglobina può causare risultati errati.

L'inversione della posizione dei reagenti sull'analizzatore può causare risultati errati.

Assicurarsi di caricare il reagente R1 nella corretta posizione sull'analizzatore, la posizione R1, e il reagente R2 nella posizione R2 dello strumento.

- Per uso diagnostico *in vitro*.
- Trattare tutti i campioni ematici, i calibratori e i controlli come materiale potenzialmente a rischio biologico.
- Osservare visivamente i campioni per rilevare eventuali torbidità e coaguli prima dell'analisi. I campioni con torbidità e coaguli eccessivi possono avere un impatto negativo sui risultati e non devono essere utilizzati.
- Smaltire i reagenti in conformità alle relative normative in vigore.
- Non utilizzare i reagenti dopo le date di scadenza.
- Non mescolare reagenti provenienti da kit diversi.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

I reagenti vengono forniti pronti all'uso. Rimuovere i tappi dei reagenti R1 e R2 e collocarli sullo strumento. I reagenti sono stabili per un massimo di 4 settimane caricati sull'analizzatore. Una volta aperti:

- I reagenti possono essere conservati a 2-8°C per non più di 4 settimane.
- I calibratori possono essere conservati a 2-8°C per non più di 3 mesi.
- I controlli possono essere conservati a 2-8°C per non più di 3 mesi.

Fare riferimento alla specifica Scheda sull'applicazione dell'analizzatore di chimica clinica per informazioni specifiche sul singolo analizzatore. I laboratori devono verificare la stabilità dei reagenti caricati sui propri analizzatori in classiche condizioni di laboratorio.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

- Il digiuno non è necessario.
- Prelevare sangue intero mediante venipuntura in:
 - Provette di raccolta del siero, con o senza gel.
 - Provette di raccolta del plasma EDTA K₂ o K₃, con o senza gel.
- Analizzare il sangue con procedure di separazione standard.
 - Il sangue intero può essere conservato per un massimo di 4 ore a temperatura ambiente o per un massimo di 30 ore a 2-8°C prima che si verifichi la separazione.
- A seguito della centrifugazione, esaminare la presenza di emolisi. Se presente, eliminare il campione e prelevare di nuovo.
- I campioni possono essere testati immediatamente o conservati prima di essere testati nelle condizioni seguenti:
 - 8 ore a temperatura ambiente
 - Fino a 2 settimane a 2-8°C
 - Fino a 18 mesi a -20°C
 - Fino a 2,5 anni a -70°C (studi estesi in corso)
- I campioni di plasma o siero possono essere congelati e scongelati fino a 5 volte dopo essere stati congelati a -20°C o -70°C.
- Durante il trasporto dei campioni, spedire i campioni su impacchi freddi a 2-8°C o congelare su ghiaccio secco.
- Maneggiare e smaltire tutti i campioni in base alle precauzioni universali in caso di rischio biologico.

PROCEDURE DI DOSAGGIO

Calibrazione

Il dosaggio è calibrato utilizzando una curva di calibrazione a 5 punti. Viene generata una curva standard utilizzando il corretto modello di curve fitting indicato nella Scheda sull'applicazione dell'analizzatore. Verificare la calibrazione con almeno due livelli di controlli in conformità ai requisiti del laboratorio. Ricalibrare ed eseguire i controlli per ciascun kit di un nuovo lotto e, successivamente, ogni 4 settimane per i kit dello stesso lotto. Se i controlli non rientrano nell'intervallo accettabile del laboratorio, ricalibrare come richiesto **fino alla data di scadenza dei reagenti aperti**.

Controllo di qualità

Analizzare almeno due livelli di materiale per controllo di qualità idoneo almeno una volta al giorno per ogni giorno di utilizzo. Inoltre, eseguire i controlli dopo ciascuna nuova esecuzione della calibrazione. Si consiglia di includere controlli bassi e alti in ogni esecuzione. Se i valori dei controlli non rientrano nei limiti di accettabilità, ripetere il dosaggio. Potrebbero essere necessari ulteriori test di controllo di qualità in conformità alle normative locali, regionali e/o statali o ai requisiti di accreditamento.

Esempio di procedura di dosaggio

Il PLAC test dell'attività della Lp-PLA₂ deve essere eseguito con le impostazioni corrette per l'analizzatore in uso. Per istruzioni dettagliate e per le impostazioni per ciascun analizzatore, fare riferimento alla Scheda sull'applicazione dell'analizzatore dello specifico analizzatore automatico di chimica clinica utilizzato. Viene fornita una spiegazione complessiva della procedura di dosaggio dell'analizzatore Beckman Coulter (Olympus) AU400®.

Impostazioni dell'analizzatore clinico Beckman Coulter (Olympus) AU400®

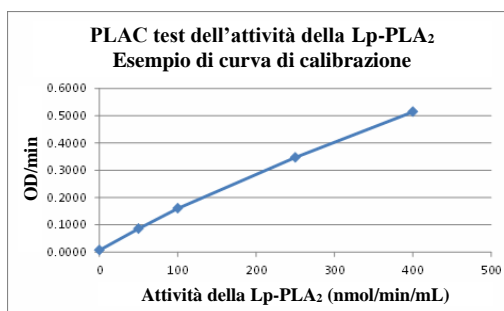
Assay Code	Rate
Assay Time	8.5 minutes
Read Cycle	12-14
Sample Volume	25 µL
Reagent R1 vol.	100 µL R1 reagent (R1 position)
Reagent R2 vol.	25 µL R2 reagent (R2 position)
Wavelength	1° 410 nm, 2° 520 nm
Calibration Method	Spline 5 point
Assay Range	1.4-400 nmol/min/mL

NOTE SULLA PROCEDURA

- È opportuno che ciascun laboratorio stabilisca una frequenza di calibrazione idonea. È almeno opportuno generare una nuova curva di calibrazione con un kit di un nuovo lotto e, successivamente, ogni 4 settimane per i kit dello stesso lotto. Eseguire la calibrazione se e quando i controlli non rientrano nell'intervallo accettabile.
- Al momento della conservazione, non scambiare i tappi delle soluzioni dei reagenti per non causare contaminazione.
- Miscelare accuratamente tutti i campioni prima del test, in particolare durante il scongelamento dei campioni conservati. Utilizzare un miscelatore vortex; rimuovere tuttavia le eventuali bolle d'aria o la schiuma dai campioni.

ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE:

Attività della Lp-PLA ₂ nmol/min/mL	Assorbanza OD/min
0	0,0067
50	0,0857
100	0,1601
250	0,3469
400	0,5142



LIMITI

- È possibile ottenere risultati affidabili, accurati e riproducibili se la procedura del dosaggio viene eseguita avendo compreso appieno le istruzioni del foglio illustrativo e se si garantisce la conformità alle buone prassi di laboratorio.
- Come avviene con qualsiasi metodo analitico, esiste la possibilità che sostanze e/o fattori non testati (ad es. tecnici o legati alla procedura) possano interferire con il test o causare risultati erranei. I risultati devono essere valutati insieme ad altri metodi clinici e analitici.

INTERPRETAZIONE CLINICA

- L'attività della Lp-PLA₂ deve essere interpretata insieme alla valutazione clinica e alla valutazione del rischio del paziente in qualità di indicatore della patologia cardiovascolare aterosclerotica.
- Questo test non sostituisce il test dei lipidi nel sangue o altri fattori di rischio tradizionali identificati per le patologie cardiovascolari.

VALORI ATTESI

I campioni di siero sono stati prelevati da uomini (N=751) e donne (N=785) di almeno 35 anni di età clinicamente rilevante (intervallo 35-98 anni). I campioni sono stati testati con il PLAC test dell'attività della Lp-PLA₂ in conformità al protocollo consigliato per la manipolazione dei campioni e gli intervalli di riferimento sono stati calcolati. La distribuzione dei valori dell'attività della Lp-PLA₂ per questa popolazione è visualizzata nella tabella seguente:

Distribuzione per sesso

Percentile	Tutti (N=1536) Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	Uomini (N=751) Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	Donne (N=785) Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)
Min	2	24	2
5	106	107	104
20	137	141	134
25	143	149	139
33	152	160	147
50	172	184	165
67	194	207	183
75	205	219	194
80	214	229	201
95	265	278	244
99	326	318	290
Max	>400	>400	>400
Media	177	186	168

È stata segnalata una mutazione nulla in omozigosi (V279F) a bassa frequenza nei soggetti con genitori asiatici, con conseguente basso livello di Lp-PLA₂ circolante.¹²

Questi intervalli di riferimento vengono forniti unicamente come linee guida e non riguardano i “valori critici” o i limiti delle decisioni mediche. I risultati indicano che ciascun laboratorio clinico può osservare una mediana e un intervallo di valori dell'attività della Lp-PLA₂ che dipendono dalla natura della popolazione di pazienti testati in tale laboratorio (ad es. pazienti generalmente soggetti a un maggiore rischio di patologia cardiovascolare rispetto ai pazienti a rischio generalmente minore). Ciascun laboratorio deve stabilire intervalli di riferimento propri. Le indicazioni per stabilire intervalli di riferimento sono disponibili nello Standard CLSI EP28-A3c (How to Define and Determine reference intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition, Come definire e determinare gli intervalli di riferimento nel laboratorio clinico, linee guida approvate – Terza edizione). In un numero consistente di studi clinici epidemiologici, i valori dell'attività della Lp-PLA₂ superiori alla mediana hanno dimostrato un significato prognostico.¹³

CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche delle prestazioni sono state stabilite utilizzando l'analizzatore Beckman Coulter (Olympus) AU400®. Per le caratteristiche delle prestazioni, fare riferimento alla specifica Scheda sull'applicazione dell'analizzatore di chimica clinica.

SENSIBILITÀ

La sensibilità clinica (limite di quantificazione) del dosaggio è ≤ 10 nmol/min/mL.

PRECISIONE DEL DOSAGGIO

La variabilità intra-dosaggio e inter-dosaggio è stata determinata dall'analisi di quattro campioni di siero umano e di due controlli con attività della Lp-PLA₂ compresa nell'intervallo tra 98 e 324 nmol/min/mL. I campioni sono stati analizzati in duplicato, due volte al giorno, nel corso di 20 giorni e con 3 lotti di reagenti. I coefficienti di variazione di precisione totale per ciascun lotto e campione di reagenti sono stati $< 3\%$. I dati relativi a un lotto di reagenti sono sintetizzati di seguito e rappresentano le prestazioni rappresentative del dosaggio:

Siero	Concentrazione media Lp-PLA ₂ (nmol/min/mL)	Intra-dosaggio % CV n=40	Tra saggi % CV n=40	Totale % CV n=80
1	98	1,4	2,0	2,5
2	201	1,4	1,9	2,6
3	255	1,3	2,6	2,9
4	324	1,3	2,1	2,8

LINEARITÀ

Sono state preparate diverse serie di diluizioni, a partire da campioni di siero con livelli di attività della Lp-PLA₂ alti e bassi noti, e in seguito testate con 3 lotti di reagenti. Nella gamma dinamica da 1,0 a 400 nmol/min/mL, la regressione lineare dei livelli di attività della Lp-PLA₂ ha causato delle pendenze nella gamma 0,98-1,03, intercetta nella gamma da -6,8 a 10,7 nmol/min/mL e R² nella gamma da 0,995 a 0,999.

SOSTANZE INTERFERENTI

Le sostanze endogene rilevate nel sangue e le sostanze esogene (farmaci comuni e con obbligo di ricetta) sono state valutate ai fini dell'interferenza nel dosaggio. I campioni sono stati arricchiti con due livelli del potenziale interferente e testati. Non è stata osservata alcuna interferenza apprezzabile per le seguenti sostanze ai livelli di arricchimento testati.

Analisi dell'interferenza

Potenziale interferente	Concentrazione del test bassa	Concentrazione del test alta
Albumina, g/l	35	50
Trigliceridi, mg/dL	150	500
Bilirubina, mg/dL	0,2	5
Colesterolo, mg/dL	150	250
Emoglobina, mg/mL	0,62	1,00
Acetaminofene, μ mol/l	33	199
Aspirina, μ mol/l	720	3600
Atorvastatina, μ mol/l	2	20
Difenidramina, μ mol/l	2	20
Fenofibrato, μ mol/l	42	125
Lisinopril, μ mol/l	0,25	0,74
Niacina, μ mol/l	480	4800
Tolbutamide, μ mol/l	400	2300
Warfarin, μ mol/l	10	33
Metformina, μ mol/l	31	310
Clopidogrel bisolfato, μ mol/l	10	100
Vitamina C, μ mol/l	14	342

RECUPERO



Quantità diverse di una soluzione con alti livelli di attività della Lp-PLA₂ sono state aggiunte a un diluente privo di enzimi per creare sette livelli di attività. Queste soluzioni arricchite sono state analizzate con 3 lotti di reagenti e i livelli dell'attività della Lp-PLA₂ sono quindi stati confrontati ai valori attesi che hanno dato come esito pendenze comprese nell'intervallo tra 0,99 e 1,10, intercetta nella gamma da -2,9 a 4,2 nmol/min/mL e R² nella gamma da 0,997 a 1,000.

STUDI CLINICI

Studi epidemiologici e trial clinici dimostrano in modo solido e uniforme l'esistenza di una correlazione tra livelli base incrementati di Lp-PLA₂ e il rischio elevato di eventi di patologia cardiovascolare.¹³⁻²¹ I dati della correlazione sono stati sintetizzati in una meta-analisi pubblicata in The Lancet e comprendevano 32 studi potenziali con 79.036 soggetti in cui i livelli di attività della Lp-PLA₂ hanno dimostrato un'associazione continua con il rischio di cardiopatia coronarica, ictus e mortalità.¹³ La Lp-PLA₂ sembra essere univocamente specifica dell'infiammazione vascolare.^{3,4,11} In entrambe le popolazioni degli studi di prevenzione primaria e secondaria, la Lp-PLA₂ è stata associata a un rischio cardiovascolare più elevato e la previsione del rischio resta significativa quando viene regolata per tenere conto dei fattori di rischio tradizionali di patologia cardiovascolare. Hatoum e colleghi hanno concluso che i livelli di attività della Lp-PLA₂ erano significativamente associati agli incidenti di cardiopatia coronarica tra le donne nel Nurses' Health Study.²² Tra uomini e donne con diabete di tipo 2, i livelli di attività della Lp-PLA₂ erano significativamente associati agli incidenti di cardiopatia coronarica, indipendentemente da fattori di rischio tradizionali o infiammatori.²³ Maiolino, et al. hanno rilevato che un'elevata attività della Lp-PLA₂ peggiora la prognosi del coefficiente di variazione nei pazienti del ceppo caucasico (n=712) segnalati per angiografia coronarica.²⁴

I dati degli studi sul polimorfismo del gene Lp-PLA₂ (riduzione dei livelli della Lp-PLA₂) sono variabili, ma negli uomini coreani (dove è comune l'allele della perdita di funzionalità V279F) erano associati a una significativa riduzione del rischio di patologia cardiovascolare nei soggetti interessati. La portata e la direzione di questo effetto genetico si sono dimostrate pienamente uniformi ai più ampi studi epidemiologici sull'attività della Lp-PLA₂ del plasma e sul rischio di coronaropatia. La naturale insufficienza nell'attività della Lp-PLA₂ causata dal trasporto dell'allele PLA2G7 279F protegge gli uomini coreani dalla coronaropatia. Questi risultati dimostrano l'esistenza di una relazione di causa-effetto tra la Lp-PLA₂ e la coronaropatia.¹²

In un'analisi post-hoc dello studio LIPID, la prevastatina con dosaggio di 40 mg/dia ha ridotto in media l'attività della Lp-PLA₂ del 16%. È stato riscontrato un beneficio maggiore con la prevastatina tra i soggetti con livelli base più alti di Lp-PLA₂. Livelli di attività della Lp-PLA₂ di base hanno predetto decessi da cardiopatia coronarica dopo la piena regolazione per tutti e 24 i fattori di rischio di base. La riduzione dell'attività della Lp-PLA₂ grazie alla prevastatina nel corso del primo anno è stata in grado di prevedere in maniera significativamente elevata gli eventi di cardiopatia coronarica, indipendentemente dalle modifiche al colesterolo LDL, e potrebbe essere responsabile di oltre la metà dei benefici della prevastatina nello studio LIPID.²⁵

Set calibratori (1-5), controllo basso e alto  R36 S25/26/36/37/39	Tampone R1  R36 S25/26/36/37/39
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

R36	Irritante per gli occhi.
S25	Evitare il contatto con gli occhi.
S26	In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare un medico.
S36/37/39	Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

BIBLIOGRAFIA

1. Caslake, M. J. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150, 413-419 (2000).
2. Kudo, I. & Murakami, M. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins & other lipid mediators* 68-69, 3-58 (2002).
3. Hakkinen, T. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2), platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19, 2909-2917 (1999).
4. Kolodgie, F. D. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 2523-2529, doi:10.1161/01.ATV.0000244681.72738.bc (2006).
5. Chisolm, G. M. & Steinberg, D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free radical biology & medicine* 28, 1815-1826 (2000).
6. Witztum, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 344, 793-795 (1994).
7. MacPhee, C. H. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Current opinion in pharmacology* 1, 121- 125 (2001).
8. MacPhee, C. H. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *The Biochemical journal* 338 (Pt 2), 479-487 (1999).
9. Suckling, K. E. & MacPhee, C. H. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a target directed at the atherosclerotic plaque. *Expert opinion on therapeutic targets* 6, 309-314, doi:10.1517/14728222.6.3.309 (2002).
10. Wolfert RL, K. N., Selby RG, Sarno MJ, Warnick RG, Sudhir K. Biological variability and specificity of lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA₂), a novel marker of cardiovascular risk (abstract). *Circulation* 110, 309 (2004).
11. Lerman, A. & McConnell, J. P. Lipoprotein-associated phospholipase A2: a risk marker or a risk factor? *The American journal of cardiology* 101, 11F-22F, doi:10.1016/j.amjcard.2008.04.014 (2008).
12. Jang, Y. *et al.* Carriage of the V279F null allele within the gene encoding Lp-PLA(2) is protective from coronary artery disease in South Korean males. *PloS one* 6, e18208, doi:10.1371/journal.pone.0018208 (2011).
13. Thompson, A. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2) and risk of coronary disease, stroke, and mortality: collaborative analysis of 32 prospective studies. *Lancet* 375, 1536-1544, doi:10.1016/S0140-6736(10)60319-4 (2010).

14. Kiechl, S. *et al.* Oxidized phospholipids, lipoprotein(a), lipoprotein-associated phospholipase A2 activity, and 10-year cardiovascular outcomes: prospective results from the Bruneck study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27, 1788-1795, doi:10.1161/ATVBAHA.107.145805 (2007).
15. Winkler, K. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 predicts 5-year cardiac mortality independently of established risk factors and adds prognostic information in patients with low and medium high-sensitivity C-reactive protein (the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study). *Clinical chemistry* 53, 1440-1447, doi:10.1373/clinchem.2007.086298 (2007).
16. Robins, S. J., Collins, D., Nelson, J. J., Bloomfield, H. E. & Asztalos, B. F. Cardiovascular events with increased lipoprotein-associated phospholipase A(2) and low high-density lipoprotein-cholesterol: the Veterans Affairs HDL Intervention Trial. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 28, 1172-1178, doi:10.1161/ATVBAHA.107.160739 (2008).
17. Elkind, M. S., Tai, W., Coates, K., Paik, M. C. & Sacco, R. L. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and risk of recurrent stroke. *Cerebrovascular diseases* 27, 42- 50, doi:10.1159/000172633 (2009).
18. Cucchiara, B. L. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 and C-reactive protein for risk-stratification of patients with TIA. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 40, 2332- 2336, doi:10.1161/STROKEAHA.109.553545 (2009).
19. Caslake, M. J. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2), inflammatory biomarkers, and risk of cardiovascular disease in the Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk (PROSPER). *Atherosclerosis* 210, 28-34, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.10.041 (2010).
20. Kinney, G. L. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A(2) activity predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis. *Diabetes technology & therapeutics* 13, 381-387, doi:10.1089/dia.2010.0175 (2011).
21. Massot, A. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 testing usefulness among patients with symptomatic intracranial atherosclerotic disease. *Atherosclerosis* 218, 181- 187, doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.04.031 (2011).
22. Hatoum, I. J., Cook, N. R., Nelson, J. J., Rexrode, K. M. & Rimm, E. B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity improves risk discrimination of incident coronary heart disease among women. *American heart journal* 161, 516-522, doi:10.1016/j.ahj.2010.11.007 (2011).
23. Hatoum, I. J., Hu, F. B., Nelson, J. J. & Rimm, E. B. Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity and incident coronary heart disease among men and women with type 2 diabetes. *Diabetes* 59, 1239-1243, doi:10.2337/db09-0730 (2010).
24. Maiolino, G. *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity predicts cardiovascular events in high risk coronary artery disease patients. *PloS one* 7, e48171, doi:10.1371/journal.pone.0048171 (2012).
25. White, H. D. *et al.* Changes in Lipoprotein-Associated Phospholipase A2 Activity Predict Coronary Events and Partly Account for the Treatment Effect of Pravastatin: Results From the Long-term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease Study. *Journal of the American Heart Association* 2, e000360, doi:10.1161/JAHA.113.000360 (2013).

