



BIOPHEN Plasminogen

Ref A221502

Chromogenic assay for measuring
Plasminogen activity in plasma

For in vitro diagnostic use only



Manufactured By: HYPHEN BioMed

Last revision: 04/04/2007

INTENDED USE:

BIOPHEN Plasminogen kit is a chromogenic assay for the quantitative determination of Plasminogen Activity in human plasma, using a manual or an automated method.

CLINICAL APPLICATIONS:

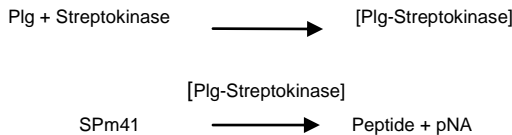
Assay of Plasminogen in human plasma for the diagnosis of congenital or acquired Plasminogen deficiencies.

An abnormal Plasminogen activity is an indicator for fibrinolytic troubles.

ASSAY PRINCIPLE:

Plasminogen (Plg) is the plasma precursor for the fibrinolytic enzyme plasmin, which is generated following plasminogen activation by specific biological activators such as uPA and tPA, or pharmacological activators such as streptokinase.

Using the BIOPHEN Plasminogen assay, Plasminogen is measured following its specific activation by addition of streptokinase and plasminogen-free fibrinogen in excess. The complex formed between plasminogen and streptokinase possesses a "plasmin-like" activity, which then specifically cleaves the plasmin-specific substrate SPm41, releasing para-nitroaniline (pNA), which colour is measured at 405nm. There is a direct relationship between colour development and Plasminogen activity in the tested plasma.



REAGENTS:

R1: Reagent 1: Streptokinase.

Activation reagent containing streptokinase (about 25,000 IU) and plasminogen-free fibrinogen, lyophilized and stabilized.

2 vials (to be reconstituted with 2.5 mL of distilled water).

R2: Reagent 2: Substrate

Chromogenic substrate, specific for plasmin and "plasminogen-streptokinase" complexes (SPm41), lyophilized:

2 vials of about 6.25 mg (to be reconstituted with 2.5 mL of distilled water).

Note: All the required cautions must be respected in order to avoid any risk of ingestion or accidental introduction of R1 or R2 in body. In case of skin contact, wash extensively with water. In case of contact with a wound, address to the appropriate medical service, and indicate the biological origin and the nature of the product.

REAGENTS AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

Reagents:

- Distilled water, preferentially sterile.
- Acetic Acid (20%) or Citric Acid (2%) (End point method).
- Physiological saline.
- Calibration (ex: BIOPHEN Plasma Calibrator Ref A222101) and quality control plasmas (ex: BIOPHEN Normal Control Plasma Ref A223201, and BIOPHEN Abnormal Control Plasma Ref A223301), titrated for plasminogen activity.

Material:

- Spectrophotometer, photometer or automates for chromogenic assays, with a wavelength set up at 405 nm.
- Stop watch.
- Calibrated pipettes.

STORAGE CONDITIONS:

BIOPHEN Plasminogen reagents must be stored at 2-8°C, in their original packaging box. They are then stable until the expiration date printed on the box.

PREPARATION AND STABILITY OF REAGENTS:

R1: Reagent 1: Streptokinase

- Reconstitute each vial with 2.5 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex).
- Incubate at room temperature (18-25°C) for 30 minutes, while shaking the vial from time to time.
- Homogenize the content before each use.

Stability of reconstituted R1, kept in its original vial:

- 1 month at 2-8°C.
- 7 days at Room Temperature.
- Do not freeze.

R2: Reagent 2: Plasmin specific chromogenic substrate (SPm41)

- Reconstitute each vial with 2.5 mL of distilled water. Shake thoroughly until complete dissolution of the content (vortex).
- Incubate at room temperature (18-25°C) for 30 minutes, while shaking the vial from time to time.
- Homogenize the content before each use.

Stability of restored substrate, kept in its original vial:

- 1 month at 2-8°C.
- 7 days at Room Temperature.
- Do not freeze.

Cautions:

- In order to improve stability, reagents must be closed with their original screw cap following each use (white cap for streptokinase (R1), yellow cap for substrate SPm41 (R2)).
- Reagents must be handled with care, in order to avoid any contamination during use.
- The substrate is slightly yellow. If the substrate becomes very yellow, this indicates the presence of a contaminant. It must be rejected, and a new vial must be used.

Note:

- R1 and R2 are closed under vacuum. Remove carefully the stopper, in order to avoid any lost of powder when opening the vials.
- According to the automated method used, the reagents can be reconstituted with volumes different from those recommended. In any case, the established reactive ratios, between R1 and R2 (respective reagent concentrations in the reactive milieu), must be adhered to.
- Use only reagents from kits with the same lot number. Do not mix reagents from kits with different lots when running the assay. Reagents R1 and R2 are optimized for each lot of kits.
- The stability studies at 30°C show that the reagents can be shipped at room temperature without damage.

PREPARATION OF PLASMA:

Blood (9 volumes) must be collected on 0.109 M citrate anticoagulant (1 volume), with great care, in a silicon glass or a plastic tube. Sampling must be performed through a net venipuncture, avoiding any blood activation.

- Within 4 hours, blood must be centrifuged at 3,000 g for 20 min at 18°C or below, and plasma decanted into a plastic tube, using a plastic pipette.

Refer to GEHT or NCCLS guidelines for further instructions on specimen collection, handling and storage.

TEST PROCEDURE:

BIOPHEN Plasminogen kit is designed for being used with kinetics methods, automated, but it can also be used for end point manual methods. Adaptations to the various automates are available upon request. The assay is performed at the controlled temperature of 37°C and the colour development is measured at 405 nm.

CALIBRATION:

Calibration is performed with a normal pooled human citrated plasma (made with plasmas from at least 30 normal individuals, males or females, aged between 18 and 55 years, and free of any medication or disease), with the assigned value of 100% Plasminogen. The assay includes a standard plasma dilution of 1:30. By definition, this latter dilution of the pool represents the 100 % Plasminogen activity. The dynamic range is from 0 to 150 % Plasminogen. The 150 % Plasminogen activity is then the 1:20 dilution of the plasma pool (in physiological saline).

(Or calibration can also be performed with a commercially available plasma calibrator, with a known Plasminogen concentration (C). The 1:30 dilution corresponds to the indicated Plasminogen concentration. The 150% Plasminogen concentration is obtained (in the assay conditions) by using the following dilution factor: 20 x C :100).

The calibration curve can then be prepared as follows from the preparation already adjusted at 150% plasminogen:

% Plasminogen	"150% Plasminogen Calibrator" (µL)	Physiological saline (µL)
0	0	500
37.5	125	375
75	250	250
150	500	0

D.750.02/BI/1502



6560 Gove Court - Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

ASSAY PROTOCOL:

Manual Method:

Tested plasmas and controls are assayed at the **1:30** dilution in physiological saline.

In a microplate well, or in a **plastic** tube preincubated at 37°C, introduce:

Reagents	Microplate	Test Tube
Calibrators, or diluted tested plasmas or controls	50µL	200 µL
R1 : Streptokinase preincubated at 37°C	50µL	200 µL
Mix and Incubate for 3 min at 37°C, then introduce:		
R2: Substrate preincubated at 37°C	50µL	200 µL
Mix and Incubate for 3 min at 37°C, exactly		
Stop the reaction by introducing:		
Citric Acid (20g/L)	50µL	200 µL
Mix and measure the optical density at 405nm against the sample blank.		

The yellow colour obtained is stable for 2 hours.

The sample blank is obtained by mixing the reagents in the opposite order from that of the test i.e.: Citric Acid (20 g/L), Substrate, Streptokinase, diluted sample.

Measure the Absorbance at 405 nm (A405). Subtract the sample blank from the A405 obtained for the assay.

Automated methods:

Adaptations to the various analysers are available upon request. The assay is then performed kinetically. The reaction does not require to be stopped and sample blanks are automatically subtracted.

NB:

- If higher or lower reactive volumes than those indicated here above are required for the method used, the same respective proportions between reagent concentrations and volumes used, must be adhered to, in order to maintain the assay performance.
- Run a sample blank in presence of highly lipemic, icteric or haemolysed plasmas, or if the plasmas has a "colour" different from the usual one.

QUALITY CONTROL:

The control is performed using commercially available control plasmas, titrated for Plasminogen activity. Various control plasmas are available:

BIOPHEN Normal Control Plasma: (ref A223201).

BIOPHEN Abnormal Control Plasma: (ref A223301).

Use of quality control plasmas allows validating the calibration curve, as well as the homogeneous reactivity of the BIOPHEN Plasminogen assay from run to run, and from series to series, when using a same lot of reagents.

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE:

- No significant interference is observed (using STA) for heparin concentrations < 2 IU/mL, bilirubin concentrations < 0.2 mg/ml, and haemoglobin concentrations < 2 mg/ml in plasma.
- No significant interference of plasma fibrinogen concentration in the assay.
- In order to get the optimal performances of the assay, the procedural instructions must be strictly respected.

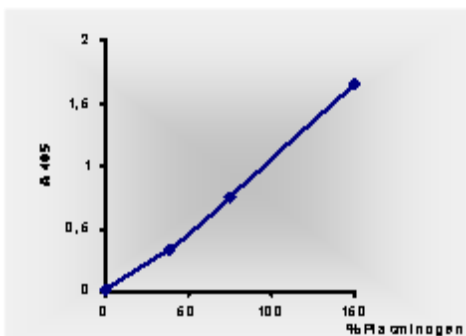
RESULTS:

- For the end point method, using a linear graph paper, plot on abscissa the Plasminogen concentration (%) and on ordinates the corresponding absorbance (**A405**). The Plasminogen concentration in the tested sample is directly obtained on the calibration curve. Results are expressed as % of Plasminogen.
- Using automated methods, the Plasminogen concentrations are directly calculated by the analyzer, respectively to the calibration curve.
- The dynamic range is from 10 to 150 %; the assay being linear up to 150% Plasminogen activity.

When the assay dilution is **1:30**, the Plasminogen concentration is directly read on the calibration curve. When different dilutions are used, the results must be multiplied by the dilution factor "D", divided by **30**, i.e. **D:30**.

EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve below is indicated as an example only. Only the calibration curve generated for the series of measures performed must be used.



VALIDATION OF CALIBRATION CURVE:

The calibration curve is acceptable when the concentrations measured for the Control Plasmas are within the acceptance range.

PERFORMANCES AND CHARACTERISTICS:

- The detection threshold is calculated by measuring the "apparent" A405 obtained for a Plasminogen deficient sample plus 3 standard deviations (SD). This detection threshold is $\leq 10\%$.
- Example of Intra-Assay and Inter-Assay reproducibilities obtained for samples with variable Plasminogen concentrations (manual method) :

Samples	Plasminogen concentrations %	Intra-Assay CV%	N	Inter-Assay CV%	N
Sample 1	101	0.99	10	6.7	8
Sample 2	55	2.01	10	5.0	8

- Correlation: BIOPHEN Plasminogen assay shows good correlation with HemosIL Plasminogen kit: $Y = 1.05 X$ $n=48$ $r = 0.99$

EXPECTED VALUES:

By definition, the 100 % Plasminogen concentration corresponds to the concentration in a normal human citrated plasma pool, obtained by pooling plasmas from healthy males or females aged from 18 to 55 years, and out of any medication, diluted 1:30.

The Plasminogen concentration in healthy adults is usually in the range 60 to 120% (normal range determined at about 70-130% (mean \pm 2SD) using the BIOPHEN Plasminogen assay, with manual method, on n=54 healthy individuals).

Plasminogen concentration is low in neonates. In healthy adults plasminogen level variations are observed with age, smoking habits, pregnancy, hormonal contraceptives, ...

CLINICAL VARIATIONS:

Plasminogen concentration $\leq 50\%$ (in adults) indicates the presence of a deficiency, which must be confirmed with another test and / or by testing another plasma sample from the patient.

Plasminogen deficiencies can be:

- Mostly acquired: they have been observed in hepatic diseases, DIC, sepsis, thrombolytic therapy using plasminogen activators... and in clinical situations associated with hyperfibrinolytic conditions.
- Hereditary: they can be of type I (hypoplasminogenemia, reduced level of activity and antigen) or of type II (dysplasminogenemia, decreased activity, but normal for antigen levels). They could then be associated with an increased thrombotic risk, still discussed.

Ligneous conjunctivitis could also represent a rare but serious complication of plasminogen deficiency.

BIOCHEMISTRY:

Plasminogen is a single chain glycoprotein of about 90KDa, synthesized in particular in the liver, and usually present at about 200µg/ml in plasma.

Major component in the fibrinolytic system, plasminogen zymogen is converted to plasmin following partial cleavage by specific activators. Plasmin proteolytic activity is mainly targeted towards fibrin (clot lysis), plasminogen being activated to plasmin onto the fibrin clot in physiological conditions. Regulation is ensured by various endogenous activators (uPA, tPA,...) or inhibitors (PAI-1). Exogenous streptokinase also acts as an activator.

The major physiological inhibitor of plasmin in blood is the fast acting α_2 plasmin inhibitor.

REFERENCES:

1.)Okamoto A, Sakata T, Mannami T, Baba S, Katayama Y, Matsuo H, Yakasa M, Minematsu K, Tomoike H, Miyata T, « Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese: the Suita study », *J. Thromb Haemost.*, 1:2397-2403, 2003.
2. Duboscq C, Quintana I, Bassilotta E, Bergonzelli GE, Porterie P, Sasseti B, Haedo AS, Wainsztein N, Kruihof EK, Kordich L, "Plasminogen: an important parameter in septic patients", *Thromb Haemost.*, 77(6): 1090-1095, 1997.
3. Azuma H, Uno Y, Shigekiyo T, Saito S, « Congenital plasminogen deficiency caused by a Ser⁶⁷² to Pro mutation », *Blood*, 82(2):475-480, 1993.
4. Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam SI, McCall F, Mitchell R, Davidson JF, "Plasminogen levels in healthy volunteers - influence of age, sex, smoking and oral contraceptives", *Thromb Haemost.*, 68(5):506-510, 1992.
5.)Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA, "Plasminogen: a structural review", *Blood Coagul Fibrinolysis*, 3(5):605-614, 1992.
6.)Schutta HS, Williams EC, Baranski BG, Sutula TP, « Cerebral venous thrombosis with plasminogen deficiency », *Stroke*, 22:401-405, 1991.
7.)Aoki N, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M, "Abnormal Plasminogen: a hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis", *J. Clin. Invest.*, 1977, 1186-1195, 1977.
8. Reddy KNN, Markus G, "Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase", *J. Biol. Chem.*, 247(6):1683-1691, 1972.
9.)<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; OMIM; "Plasminogen, Plasminogen deficiency" (+173350).



BIOPHEN Plasminogen

Ref A221502

Dosage Fonctionnel du Plasminogène (Plg)
plasmatique par méthode colorimétrique

A usage diagnostic in vitro exclusivement



Fabricant: HYPHEN BioMed

Dernière révision : 04/04/2007

UTILISATION :

Le coffret BIOPHEN Plasminogen est une technique chromogénique proposée pour la détermination in vitro de l'activité du Plasminogène, dans le plasma humain citraté, par méthode manuelle ou automatisée.

INTERET CLINIQUE :

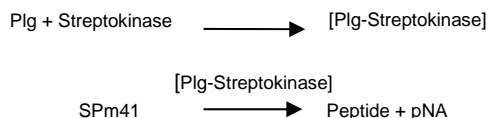
Dosage du Plasminogène plasmatique afin de diagnostiquer les déficits congénitaux ou acquis en Plasminogène.

Une activité anormale du Plasminogène constitue un facteur de trouble fibrinolytique.

PRINCIPE :

Le Plasminogène est une protéine qui est le précurseur plasmatique de la plasmine, enzyme fibrinolytique formée après activation par des activateurs spécifiques biologiques tels que l'uPA et le tPA, ou pharmacologiques comme la streptokinase.

Dans le dosage BIOPHEN Plasminogen, le Plasminogène plasmatique est dosé après activation par addition en excès d'un mélange de streptokinase et de fibrinogène dépourvu de plasminogène. Le complexe « plasminogène-streptokinase » ainsi formé possède une activité « plasmin-like », et hydrolyse alors le substrat peptidique SPm41 en libérant de la paranoiline (pNA), groupement chromophore mesuré à 405 nm.



REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Streptokinase

Mélange de streptokinase (environ 25000 UI) et de fibrinogène dépourvu de plasminogène, lyophilisé et stabilisé.

2 flacons (à reconstituer par 2,5 ml d'eau distillée).

R2 : Réactif 2 : SPm41

Substrat chromogène spécifique de la Plasmine et du complexe « plasminogène-streptokinase », lyophilisé.

2 flacons d'environ 6,25 mg (à reconstituer par 2,5 ml d'eau distillée).

Précaution: Toute précaution doit être prise pour éviter tout risque d'ingestion et d'introduction accidentelles de R1 et R2 dans l'organisme. En cas de contact avec la peau, laver abondamment à l'eau. En cas de contact avec une plaie, contacter un service médical compétent en précisant la nature et l'origine biologique du produit.

REACTIFS NECESSAIRES MAIS NON FOURNIS :

Réactifs:

- Eau distillée, de préférence stérile.
- Acide acétique (20%) ou acide citrique 2% (méthode en point final).
- Serum physiologique.
- Plasma de calibration (ex: BIOPHEN Plasma Calibrator # A222101) et contrôle de qualité (ex: BIOPHEN Normal Control Plasma # A223201, et BIOPHEN Abnormal Control Plasma # A223301), titrés en plasminogène.

Matériels :

- Spectrophotomètre ou automates pour dosages chromogéniques, mesurant à 405nm.
- Chronomètre.
- Pipettes calibrées.

CONSERVATION :

Les réactifs non encore utilisés doivent être conservés à 2-8 °C, dans leur coffret d'origine. Ils sont alors stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette.

PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

R1 : Réactif 1 : Streptokinase

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2,5 ml d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à dissolution complète.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant toute utilisation.

Stabilité du R1 reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 1 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

R2 : Réactif 2 : Substrat chromogène spécifique de la Plasmine (SPm41)

- Reconstituer chaque flacon par exactement 2,5 ml d'eau distillée. Bien agiter lors de la reconstitution (vortex) jusqu'à dissolution complète.
- Laisser stabiliser la solution à température ambiante (18-25°C) pendant 30 minutes, en agitant de temps en temps.
- Bien homogénéiser avant toute utilisation.

Stabilité du substrat reconstitué, conservé dans son flacon d'origine :

- 1 mois à 2-8°C.
- 7 jours à température ambiante (18-25°C).
- Ne pas congeler.

Précautions :

- Pour assurer une bonne stabilité des réactifs, refermer les flacons après usage, avec leurs bouchons respectifs (capsule blanche pour la streptokinase (R1), capsule jaune pour le substrat (R2)).
- Manipuler les réactifs avec les précautions d'usage afin d'éviter toute contamination.
- Le substrat présente une coloration jaune modérée. S'il jaunit très fortement, ceci indique la présence d'une contamination. Il doit être rejeté et un nouveau flacon doit être utilisé.
- La stabilisation des flacons pendant 30 min. à TA, après reconstitution, permet d'obtenir une réactivité homogène et stable dans le temps.
- Afin d'éviter l'évaporation des réactifs pendant leur utilisation, limiter au maximum la zone d'échange en utilisant, par exemple, des cheminées plastiques et/ou des capsules operculées

Nota:

- Les flacons R1 et R2 sont lyophilisés sous vide. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.
- Suivant la méthode automatique utilisée, les réactifs peuvent être reconstitués avec des volumes différents de ceux indiqués. Dans tous les cas, les rapports respectifs de chaque réactif, R1 et R2, préconisés dans la méthode manuelle (concentration finale dans le milieu réactionnel et volume total), doivent être respectés.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffrets. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage. Les réactifs R1 et R2 sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

PREPARATION DES PLASMAS :

Le sang (9 volumes) doit être collecté, en tube plastique ou en verre silicé, sur du citrate trisodique 0.109M (1 vol.), par ponction veineuse franche, en évitant toute activation. Rejeter les premières gouttes de sang.

- Centrifuger le prélèvement, dans les 4 heures suivantes, pendant 20 minutes à 3000g, à une température inférieure ou égale à 18°C. Le plasma citraté doit être décanté dans un tube plastique.

Se référer aux recommandations du GEHT ou du NCCLS pour toute instruction complémentaire sur la collecte, le traitement et le stockage des échantillons.

PROCEDURE :

Le coffret Biophen Plasminogen est utilisé en méthode cinétique, automatisée, et peut être également utilisé en méthode manuelle, en « point final ». Les adaptations sur automates sont disponibles sur demande. Le test est réalisé à 37°C et l'intensité de la coloration est évaluée à 405nm.

ETALONNAGE :

La gamme d'étalonnage est réalisée à l'aide d'un pool de plasmas humains citratés normaux (au moins 30 individus normaux, hommes et femmes, de 18 à 55 ans, sans traitement ou pathologie connue), qui par définition titre 100% de plasminogène.

Le dosage intègre une dilution du plasma au 1/30. La dilution du plasma au 1/30 représente par définition le taux 100% de plasminogène.

La gamme d'étalonnage va de 0 à 150% de plasminogène. La dilution au 1/20 (en sérum physiologique) représente 150% de plasminogène.

(Ou pour un calibre titrant une concentration (C) en plasminogène précisément définie, le taux de 150% (dans les conditions du dosage) est obtenu en diluant ce calibre par le facteur suivant : 20 x (C) / 100).

À partir de l'étalon dilué et ajusté à 150% de plasminogène, faire la gamme d'étalonnage suivante en sérum physiologique :

% Plasminogène	Etalon 150% plasminogène (µl)	Sérum physiologique (µl)
0	0	500
37.5	125	375
75	250	250
150	500	0



8580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

D.750.01/BI/1502

www.aniara.com

MODE OPERATOIRE :

Méthode manuelle :

Diluer les plasmas à tester ou les contrôles au **1/30** en sérum physiologique.

Dans les puits d'une microplaque, ou dans un tube **plastique** incubé à **37°C**, introduire:

Réactifs	Microplaque	Tube plastique
Calibrateur, ou plasmas dilués à tester, ou contrôles dilués	50µl	200 µl
R1 : Streptokinase : préincubée à 37°C	50µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 3 minutes, puis introduire :		
R2: Substrat : préincubé à 37°C	50µl	200 µl
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 3 minutes		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide citrique (20g/l)	50µl	200 µl
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

La couleur jaune obtenue est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse de celui du test : Acide Citrique (20g/l), substrat, streptokinase, échantillon dilué.

Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance obtenue pour le test.

Méthode automatisée :

Les adaptations sur les divers automates présents sur le marché sont disponibles sur demande. Pour toute adaptation, les rapports respectifs des réactifs et le protocole général de la méthode manuelle doivent être respectés.

Nota:

- Suivant les méthodes, si des volumes plus ou moins importants doivent être utilisés, respecter très exactement le rapport des volumes et des concentrations des différents réactifs constituant le milieu réactionnel.
- Faire un blanc plasma si le plasma est icterique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

CONTROLE DE QUALITE :

L'utilisation de plasmas de contrôle disponibles sur le marché, titrés en activité plasminogène, permet de valider la courbe d'étalonnage et la réactivité homogène du dosage, dans les différentes séries, pour un même lot de réactifs. Différents plasmas de contrôle sont disponibles: **Biophen Normal Control Plasma** : (réf A223201). **Biophen Abnormal Control Plasma** : (réf A223301).

LIMITES DU DOSAGE :

- Aucun effet significatif n'est observé (au STA) pour des taux d'Héparine inférieurs à 2UI/ml dans le plasma, des taux de bilirubine inférieurs à 0,2 mg/ml, d'hémoglobine inférieurs à 2 mg/ml.
- Le taux de fibrinogène de l'échantillon testé n'a pas d'influence significative sur le dosage.
- Pour obtenir les performances optimales du coffret, suivre scrupuleusement les instructions techniques.

RESULTATS :

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer sur papier millimétré la droite étalon, en portant en ordonnées la **DO à 405nm** et en abscisses le taux de Plasminogène en %. La concentration de Plasminogène dans l'échantillon dosé est déduite directement sur la courbe d'étalonnage. Les résultats sont exprimés en % de plasminogène.
- En technique automatique, les taux sont directement calculés par l'instrument en fonction des valeurs de l'étalonnage.

Si la dilution utilisée est **1/30**, le taux de plasminogène est obtenu directement sur la courbe.

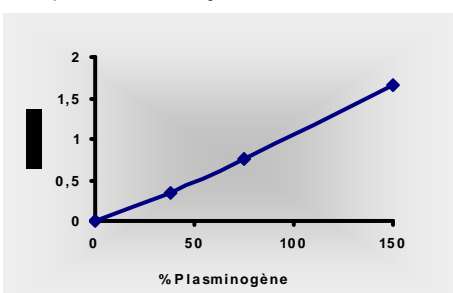
Si d'autres dilutions sont utilisées le taux obtenu est le taux mesuré, multiplié par le facteur de dilution « D » utilisé et divisé par : 30, soit **D/30**.

La zone de mesure va de **10 à 150 %**.

En coordonnées linéaires, le test est linéaire jusqu'à 150 % de Plasminogène.

EXEMPLE DE COURBE D'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage ci-dessous est donnée à titre d'exemple. N'utiliser que la courbe générée pour la série de dosages réalisés.



VALIDITE DE L'ETALONNAGE :

La courbe d'étalonnage est valide lorsque les concentrations obtenues pour les contrôles correspondent à la zone d'acceptation.

PERFORMANCES ET CARACTERISTIQUES :

- La limite de détection est déterminée en mesurant sur la courbe d'étalonnage le « taux apparent » de Plasminogène, qui correspond à la DO moyenne obtenue pour un échantillon sans Plasminogène plus 3 écart-types. Cette limite de détection est $\leq 10\%$.
- Exemple de reproductibilité obtenue avec des plasmas à taux variables de Plasminogène en méthode manuelle.

Echantillons	Taux Plasminogène (%)	CV intra essai (%)	N	CV Inter Essais (%)	N
Echantillon 1	101	0.99	10	6.7	8
Echantillon 2	55	2.01	10	5.0	8

- Le dosage Biophen Plasminogen présente une bonne corrélation avec le dosage HemosIL Plasminogen : $Y = 1.05 X$ $n=48$ $r = 0.99$

VALEURS ATTENDUES :

Par définition, le taux de 100% correspond à la concentration de Plasminogène dans un pool de plasmas humains normaux, hommes ou femmes, âgés de 18 à 55 ans, en dehors de toute médication, dilué au 1/30.

Le taux plasmatique de Plasminogène chez l'adulte sain est généralement compris entre 60 et 120% (Pour le coffret Biophen Plasminogen, la zone normale a été déterminée à environ 70%-130% (moyenne ± 2 écarts types) sur une population normale (n=54) par méthode manuelle.)

Le taux de Plasminogène est bas chez le nouveau né. Il varie chez l'adulte sain selon divers facteurs (âge, tabagisme, grossesse, contraception hormonale, ...).

VARIATIONS CLINIQUES

Un taux de Plasminogène $\leq 50\%$ (chez l'adulte) indique la présence d'un déficit qui doit être confirmé par un autre dosage et/ou sur un autre prélèvement.

Les déficits en Plasminogène peuvent être :

- Majoritairement acquis : ils ont été rapportés lors d'atteintes hépatiques, de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), d'état septique, de thérapies thrombolytiques à l'aide d'activateurs du plasminogène... et de situations généralement associées à un état hyperfibrinolytique.
- Hérititaires : de type I (hypoplasminogénémie, diminution de l'activité et du taux d'antigène) ou de type II (dysplasminogénémie, activité diminuée avec taux d'antigène normal). Ils pourraient alors constituer un facteur de risque thrombotique, encore sujet à discussion.

La conjonctivite fibreuse représenterait également une complication rare mais sérieuse liée à un déficit en plasminogène.

BIOCHIMIE :

Le plasminogène est une glycoprotéine monochaine d'environ 90 kDa synthétisée en particulier par le foie, généralement présente dans le plasma à une concentration d'environ 200µg/ml. Composant majeur du système fibrinolytique, le plasminogène est converti après activation par clivage partiel en plasmine, enzyme protéolytique dont la cible majeure est la fibrine (lyse du caillot). En effet, la plasmine est essentiellement générée sur la surface du caillot de fibrine dans les conditions physiologiques.

Son action est régulée par de nombreux activateurs (endogènes tels que uPA, tPA... ou exogènes tel que la streptokinase) ou inhibiteurs plasmatiques (PAI-1 ...).

L'inhibiteur physiologique principal de la plasmine dans la circulation sanguine est l' α_2 -antiplasmine, qui est un inhibiteur d'action très rapide.

REFERENCES :

1. Okamoto A, Sakata T, Mannami T, Baba S, Katayama Y, Matsuo H, Yakasa M, Minematsu K, Tomoike H, Miyata T, « Population-based distribution of plasminogen activity and estimated prevalence and relevance to thrombotic diseases of plasminogen deficiency in the Japanese: the Suita study », *J. Thromb Haemost.*, 1:2397-2403, 2003.
2. Duboscq C, Quintana I, Bassilotta E, Bergonzelli GE, Porterie P, Sasseti B, Haedo AS, Wainsztein N, Kruithof EK, Kordich L, "Plasminogen: an important parameter in septic patients", *Thromb Haemost.*, 77(6): 1090-1095, 1997.
3. Azuma H, Uno Y, Shigekiyo T, Saito S, « Congenital plasminogen deficiency caused by a Ser⁵⁷² to Pro mutation », *Blood*, 82(2):475-480, 1993.
4. Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam SI, McCall F, Mitchell R, Davidson JF, "Plasminogen levels in healthy volunteers - influence of age, sex, smoking and oral contraceptives", *Thromb Haemost.*, 68(5):506-510, 1992.
5. Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA, "Plasminogen: a structural review", *Blood Coagul Fibrinolysis*, 3(5):605-614, 1992.
6. Schutta HS, Williams EC, Baranski BG, Sutula TP, « Cerebral venous thrombosis with plasminogen deficiency », *Stroke*, 22:401-405, 1991.
7. Aoki N, Moroi M, Sakata Y, Yoshida N, Matsuda M, "Abnormal Plasminogen: a hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis", *J. Clin. Invest.*, 1977, 1186-1195, 1977.
8. Reddy KNN, Markus G, "Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase", *J. Biol. Chem.*, 247(6):1683-1691, 1972.
9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>: OMIM: "Plasminogen, Plasminogen deficiency" (+173350).

D.750.01/BI/1502