

BIOPHEN™ Plasminogen LRT

REF 221511

R1 R2 3 x 3 mL

IVD

Méthode chromogène pour la mesure de l'activité Plasminogène plasmatique, avec réactifs liquides prêts à l'emploi.

Français, dernière révision : 02-2022

UTILISATION:

Le coffret BIOPHEN™ Plasminogen LRT est une méthode chromogène pour la détermination quantitative *in vitro* de l'activité du Plasminogène sur plasma humain citraté en utilisant une méthode manuelle ou automatisée. L'ensemble des réactifs est sous forme liquide prête à l'emploi (LRT, Liquid reagent Technology).

RESUME ET EXPLICATION:**Technique** ^{5,8,13}

Composante majeure du système fibrinolytique, le zymogène du plasminogène (Plg) est converti en plasmine par des activateurs spécifiques (et l'activité fonctionnelle mesurée par dosage chromogénique). L'activité protéolytique de la plasmine est principalement orientée vers la fibrine (lyse du caillot), le plasminogène étant activé en plasmine à la surface du caillot de fibrine dans les conditions physiologiques. La régulation est assurée par divers activateurs (ex : uPA, tPA endogènes ou streptokinase exogène) ou inhibiteurs (ex : PAI-1, α 2-antiplasmine).

Clinique ^{1-4, 6-7, 10-13}

La mesure de l'activité du Plasminogène en plasma humain est utilisée pour l'aide au diagnostic des déficits congénitaux ou acquis en Plasminogène.

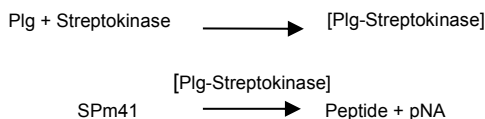
Les déficits acquis sont observés par exemple dans les maladies hépatiques, la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD), l'état septique, les thérapies thrombolytiques à l'aide d'activateurs du plasminogène, les contextes hyperfibrinolytiques...

Les déficits congénitaux peuvent être de type I (quantitatif) ou de type II (qualitatif) et pourraient être associés avec une augmentation du risque thrombotique, encore sujet à discussion.

La conjonctivite ligneuse et les lésions pourraient représenter des complications liées à un déficit en plasminogène. Une activité anormale du plasminogène est un indicateur de troubles fibrinolytiques. La concentration de plasminogène est diminuée chez les nouveaux-nés.

PRINCIPE:

Dans le dosage BIOPHEN™ Plasminogen LRT, le Plasminogène plasmatique est mesuré après activation spécifique avec la streptokinase et des dérivés de fibrinogène dépourvus de plasminogène, en excès. Le complexe « plasmin-like » formé, hydrolyse le substrat chromogène (SPm41) qui libère de la para-nitroaniline (pNA). La quantité de pNA libérée (mesurée par l'absorbance à 405 nm) est directement proportionnelle à la concentration de plasminogène dans l'échantillon.

**REACTIFS:**

R1 Streptokinase : Réactif d'activation composé de streptokinase (environ 15 000 UI/mL) et de dérivés de fibrinogène dépourvus de plasminogène, stabilisé, sous forme liquide. Contient de la BSA.

R2 Substrat chromogène spécifique de la Plasmine et du complexe « plasminogène-streptokinase » (SPm41), à environ 2,5 mg/mL, stabilisé, sous forme liquide. Contient un mélange de 5-Chloro-2-méthyl-4-isothiazolin-3-one and 2-Méthyl-2H -isothiazol-3-one (3:1).

R1 R2 3 flacons de 3 mL.**MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS:**

- Certains réactifs de ce coffret contiennent des produits d'origine humaine et animale. Lorsque du plasma humain a été utilisé dans la préparation de ces réactifs, la recherche de l'antigène HBs, des anticorps anti-HCV, anti-HIV 1 et anti-HIV 2 a été effectuée et trouvée négative. Cependant aucun test ne peut garantir de façon absolue l'absence de tout agent infectieux. Aussi, ces réactifs d'origine biologique doivent être manipulés avec les précautions d'usage s'agissant de produits potentiellement infectieux.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret.
- Les études de vieillissement montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante sans aucun dommage.
- Ce dispositif de diagnostic *in vitro* est destiné à une utilisation professionnelle en laboratoire.

PREPARATION DES REACTIFS:

R1 R2 Réactif prêt à l'emploi, homogénéiser, en évitant la formation de mousse, et charger directement sur l'automate en suivant les instructions du guide d'application.

Pour la méthode manuelle, laisser stabiliser pendant 30 min à température ambiante (18-25°C), homogénéiser avant utilisation.

STOCKAGE ET STABILITE:

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

R1 R2 La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé fermé est de :

- 1 mois** à 2-8°C.
- 7 jours** à température ambiante (18-25°C).
- Stabilité à bord de l'automate : se référer à l'application spécifique.**

Si le substrat devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.

REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS:**Réactifs:**

- Eau distillée.
- Acide acétique à 20% ou acide citrique à 2% (méthode en point final).
- Diluant : Solution saline (0,9% NaCl) ou tampon Imidazole Buffer (AR021K/AR021L/AR021B/AR021M/AR021N). Utiliser le même tampon pour l'ensemble des dilutions.
- Etalon et contrôles spécifiques avec titration connue tels que :

Nom du produit	Référence
BIOPHEN™ Plasma Calibrator	222101
BIOPHEN™ Normal Control Plasma	223201
BIOPHEN™ Abnormal Control Plasma	223301

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

Matériels:

- Spectrophotomètre, ou automates pour dosage chromogène
- Chronomètre, Pipettes calibrées, tubes pour tests en plastique ou microplaque.

PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS:

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur l'anticoagulant citrate trisodique (1 volume) (0,109M, 3,2%) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier tube doit être éliminé.

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI H21-A5⁹ pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).
Pour la conservation des plasmas, se référer aux références⁹.

PROCEDURE:

Le coffret peut être utilisé en méthode cinétique, automatisée, ou en méthode manuelle (point final). Le test est réalisé à **37°C** et l'intensité de la coloration est mesurée à **405nm**.

Pour une méthode automatisée, les guides d'applications sont disponibles sur demande. Se référer aux guides d'application et aux précautions spécifiques pour chaque automate.

Méthode de dosage:

1. Reconstituer les étalons et les contrôles comme indiqué dans les notices spécifiques. Les étalons doivent être dilués dans la solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous afin d'effectuer la gamme de calibration ("C" définit la concentration en Plasminogène).
La dilution au **1/30** correspond à la concentration (C) en Plasminogène indiquée, et le **1/20** à 1,5 fois cette concentration (3C/2).

Préparer **2 mL** de la concentration en Plasminogène à **150%** (C1) (dans les conditions du test) en utilisant le facteur de dilution (**20x C/100**).

La gamme d'étalonnage peut alors être préparée comme suit :

Plasminogène	C1	C2	C3	C4	0
Plasminogène (%)	150	100	75	37,5	0
Volume Etalon à 150%	500µL	333µL	250µL	125µL	0µL
Volume Solution saline	0µL	167µL	250µL	375µL	500µL

2. Diluer les échantillons et contrôles en solution saline comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Référence	Dilution
Contrôle	223201 / 223301	1/30
Echantillons	N.A.	1/30

Réaliser la gamme de calibration et la tester avec les contrôles de qualité. Les échantillons dilués doivent être testés rapidement, s'ils sont conservés à température ambiante (18-25°C). Les concentrations exactes des étalons et des contrôles sont indiquées pour chaque lot sur le papillon fourni avec le coffret.

3. Introduire dans les puits d'une microplaque ou dans un tube plastique incubé à 37°C :

	Microplaque	Tube
Echantillons, contrôles ou étalons dilués	50 µL	200 µL
[R1] Streptokinase préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C pendant 3 minutes, puis introduire :		
[R2] Substrat chromogène préincubé à 37°C	50 µL	200 µL
Mélanger et incubé à 37°C, pendant 3 minutes exactement		
Arrêter la réaction en introduisant :		
Acide Citrique (2%)*	50 µL	200 µL
Mélanger et mesurer la densité optique à 405nm contre le blanc correspondant.		

*Ou acide acétique (20%). La couleur jaune est stable pendant 2 heures.

Le blanc échantillon est obtenu par mélange des réactifs dans l'ordre inverse à celui du test : Acide Citrique (2%), R2, R1, échantillon dilué. Mesurer la densité optique à 405 nm. La valeur du blanc mesurée doit être soustraite de l'absorbance mesurée pour le test correspondant.

Faire un blanc plasma si l'échantillon est ictérique, lipémique, hémolysé ou présente une coloration différente des plasmas étalons.

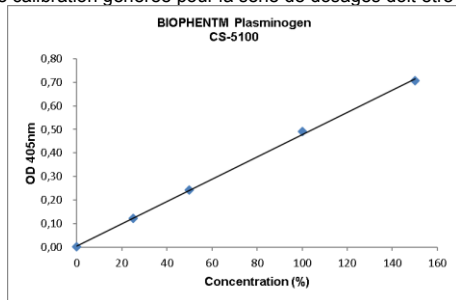
Si un volume réactionnel différent de celui indiqué ci-dessus est requis pour la méthode utilisée, le rapport des volumes doit être strictement respecté afin de garantir les performances du dosage. L'utilisateur est responsable de la validation des modifications et de leur impact sur tous les résultats.

CALIBRATION:

Le test BIOPHEN™ Plasminogène LRT peut être calibré pour le dosage de l'activité du plasminogène. L'étalon couvrant la zone calibration est disponible chez HYPHEN BioMed (Voir paragraphe REACTIFS ET MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNIS) et peut être utilisé pour générer la courbe de calibration.

- La zone de calibration est environ de 0 à 150% (sur CS-series).

La courbe de calibration ci-dessous, est indiquée à titre d'exemple uniquement. La courbe de calibration générée pour la série de dosages doit être utilisée.



CONTRÔLE QUALITE:

L'utilisation de contrôles de qualité permet de valider la conformité de la méthode ainsi que l'homogénéité des dosages entre les différents essais pour un même lot de réactifs.

Inclure des contrôles qualité dans chaque série, selon les bonnes pratiques de laboratoire, afin de valider le test. Une nouvelle courbe de calibration doit être établie, de préférence, pour chaque série d'essai, et au moins pour chaque nouveau lot de réactif ou après chaque maintenance de l'automate, ou quand les valeurs des contrôles de qualité sont mesurées en dehors de la zone d'acceptation définie pour la méthode.

Chaque laboratoire doit établir les zones d'acceptation et vérifier les performances attendues dans son système analytique.

RESULTATS:

- Pour la méthode manuelle, en point final, tracer la droite de calibration lin-lin, en portant en ordonnées la DO à 405 nm et en abscisses la concentration de Plasminogène en %.
- Quand la méthode cinétique est utilisée, utiliser les ΔDO 405 au lieu des DO 405.
- La concentration de Plasminogène (%) dans l'échantillon à doser est déduite directement de la courbe de calibration, lorsque la dilution standard est utilisée.

- Les résultats doivent être interprétés selon l'état clinique et biologique du patient.

LIMITATIONS:

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout échantillon suspect ou présentant des signes d'activation doit être rejeté.
- Un résultat anormal inattendu doit être confirmé par une autre méthode et/ou un autre échantillon prélevé, et considéré en fonction du contexte clinique.

VALEURS ATTENDUES:

La concentration de Plasminogène chez l'adulte est généralement attendue entre 80% et 140% selon les données internes et la littérature (variable selon l'âge, l'éthnie, le tabagisme, la grossesse, les contraceptifs...).^{1,3,4,10,11} Cependant, chaque laboratoire doit établir son propre intervalle normal.

PERFORMANCES:

- La limite basse de détection dépend du système analytique utilisé (<2% sur Sysmex CS-5100).
- La zone de mesure dépend du système analytique utilisé (environ de 2 à 150% de Plasminogène sur Sysmex CS-series).
- Les études de performances ont été réalisées en interne sur Sysmex CS-5100. Les performances ont été évaluées avec les contrôles du laboratoire sur 5 jours, 2 séries par jour et 2 répétitions à chaque série pour un niveau de contrôle. Les résultats suivants ont été obtenus :

Contrôle	Intra-essai				Inter-essais			
	N	Moy.%	CV%	SD	n	Moy.%	CV%	SD
Contrôle 1	10	91,3	0,8	0,8	20	91,5	1,1	1,0
Contrôle 2	10	29,1	1,3	0,4	20	29,1	1,8	0,5

- Corrélation avec une autre méthode (Berichrom Plasminogène vs BIOPHEN™ Plasminogène LRT sur Sysmex CS-5100) :
n = 63 y = 1,11x - 14,20 r = 0,995

- Interférences :
Aucune interférence, sur l'automate Sysmex CS-5100 n'a été observée avec les molécules et jusqu'aux concentrations suivantes :

Hémoglobine	Bilirubine (C/L)	Intralipides	Héparines (HNF/HBPM)
500 mg/dL	28 mg/dL	300 mg/dL	2 UI/mL

Aucune interférence significative de la concentration plasmatique de fibrinogène dans le dosage.

Se référer également au guide d'application spécifique de l'automate utilisé.

REFERENCES:

- Okamoto A. *et al.* 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.* 2003.
- Duboscq C. *et al.* Plasminogen: an important parameter in septic patients. *Thromb Haemost.* 1997.
- Azuma H. *et al.* Congenital plasminogen deficiency caused by a Ser572 to Pro mutation. *Blood.* 1993.
- Tait RC. *et al.* Plasminogen levels in healthy volunteers - influence of age, sex, smoking and oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1992.
- Ponting CP. *et al.* Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1992.
- Schutta HS. *et al.* Cerebral venous thrombosis with plasminogen deficiency. *Stroke.* 1991.
- Aoki N. *et al.* Abnormal Plasminogen: a hereditary molecular abnormality found in a patient with recurrent thrombosis. *J. Clin. Invest.* 1978.
- Reddy KNN. and Markus G. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. *J. Biol. Chem.* 1972.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- Kratz A. *et al.* Laboratory Reference Values. *The New England Journal of Medicine.* 2004.
- Andrew M. *et al.* Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood.* 1992.
- Mehta R. and Shapiro AD. Plasminogen deficiency. *Haemophilia.* 2008.
- Shapiro AD. *et al.* An international registry of patients with plasminogen deficiency (HISTORY). *Haematologica.* 2020.

SYMBOLES:

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

- [R2]** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.