

Chromogener Test zur Bestimmung der Plasminogen-Aktivität in humanem Plasma, mit gebrauchsfertigen Flüssigreagenzien

**VERWENDUNGSZWECK:**

BIOPHEN™ Plasminogen LRT (Liquid Reagent Technology) ist ein chromogener Test zur quantitativen Bestimmung der Plasminogen-Aktivität in humanem Plasma. Der Test ist als automatisierte oder manuelle Methode durchführbar. Alle Reagenzien liegen gebrauchsfertig in flüssiger Form vor (LRT, Liquid Reagent Technology).

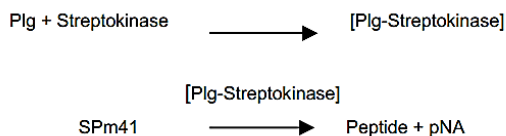
**KLINISCHE ANWENDUNGEN:**

Die Bestimmung von Plasminogen in humanem Plasma dient der Diagnose eines angeborenen oder erworbenen Plasminogen-Mangels. Eine abnormale Plasminogen-Aktivität ist ein Indikator für fibrinolytische Dysfunktion.

**TESTPRINZIP:**

Plasminogen (Plg) ist die Plasmavorstufe für das Enzym Plasmin, welches nach der Plasminogen-Aktivierung durch spezifische biologische Aktivatoren wie uPA und tPA oder pharmakologische Aktivatoren wie Streptokinase gebildet wird.

Mit dem BIOPHEN™ Plasminogen LRT Test wird das Plasminogen nach seiner spezifischen Aktivierung durch Hinzugabe von Streptokinase und plasminogenfreiem Fibrinogen im Überschuss gemessen. Die Komplexbildung zwischen Plasminogen und Streptokinase besitzt eine „plasminähnliche“ Aktivität, wodurch das plasminspezifische Substrat SPm41 gespalten wird. Dabei wird der Farbstoff para-Nitroanilin (pNA) freigesetzt, die Farbentwicklung wird bei 450 nm gemessen. Die Farbentwicklung und die Plasminogen-Aktivität im Testplasma sind direkt proportional.



**IM KIT ENTHALTENE REAGENZIEN:**

**R1** Reagenz 1: Streptokinase  
Aktivierungs-Reagenz, enthält Streptokinase (ca. 15.000 IE) und plasminogenfreie Fibrinogen-Derivate, flüssig.  
3 Flaschen mit je 3 mL, gebrauchsfertig.

**R2** Reagenz 2: Substrat  
Chromogenes Substrat, spezifisch für Plasmin und „Plasminogen-Streptokinase“-Komplex (SPm41), flüssig.  
3 Flasche mit je 3 mL bei ca. 2,5 mg/mL, gebrauchsfertig.

**Anmerkungen:**

- Alle erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen müssen beachtet werden, damit jedes Risiko der Einnahme oder versehentlichen Aufnahme von R1 und R2 durch den Körper vermieden wird. Bei Kontakt mit einer Wunde ist ein medizinischer Dienst hinzuzuziehen und die biologische Herkunft und Art des Produkts mitzuteilen.
- Natriumazid (<1 g/L) dient als Konservierungsmittel und kann mit Blei- oder Kupferarmaturen unter Bildung hochexplorier Metallazide reagieren. Bei der Entsorgung der Lösung über das Abwasser muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.
- Die Streptokinase-Konzentration kann von Charge zu Charge variieren, ist aber für jede neue Reagenzcharge genau angepasst.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden.

**ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:**

- Reagenzien:
- Aqua dest., vorzugsweise steril
  - 20% Essigsäure oder 2% Zitronensäure (Endpunkt-Methode).
  - Physiologische Kochsalzlösung (0,9% NaCl) oder Imidazolpuffer (Art.Nr. AR021A/K/L)
  - BIOPHEN™ Kalibrationsplasma Gerinnung (Art.Nr. 222101), BIOPHEN Kontrollplasma Gerinnung „Normal“ (Art.Nr. 223201) und BIOPHEN Kontrollplasma Gerinnung „Abnormal“ (Art.Nr. 223301), titriert für Plasminogen-Aktivität.

- Geräte:
- Photometer oder Gerinnungsautomaten zur Bestimmung chromogener Teste mit einer Wellenlänge von 405 nm
  - Stoppuhr, geeichte Pipetten

**LAGERUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:**

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil. Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.

**VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:**

Anmerkung: Die jeweilige gerätespezifische Vorschrift des Analyseautomaten ist zu befolgen.

**R1 R2** Die Reagenzien sind gebrauchsfertig. Vor Verwendung für 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren und anschließend durchmischen.

Stabilität der in der Originalflasche oder in einem geschlossenen Kunststoffbehälter gelagerten, geöffneten Reagenzien 1 und 2 unter der Voraussetzung, dass diese nicht kontaminiert wurden und keine Verdunstung erfolgte:

- 6 Monate bei 2-8°C.
- 7 Tage bei Raumtemperatur (18-25°C).

**Warnhinweise:**

- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden.
- Das Substrat ist leicht gelblich. Wird es stark gelblich, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche muss verwendet werden.
- Die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur bewirkt eine Stabilisierung der Reagenzien und damit eine homogene Reaktivität.
- Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsfläche so gering wie möglich zu halten, z.B. durch Verwendung eines Flaschenhalses oder eines Deckels mit Stopper.

**Anmerkungen:**

- Falls die verwendete automatisierte Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen und Reagenzvolumenta genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten.
- Zur Testdurchführung dürfen keine Reagenzien aus Packungen mit unterschiedlicher Chargennummer verwendet werden. Die Kombination der Reagenzien ist in Bezug auf die Testcharge optimiert.

**PROBENGEWINNUNG:**

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion, wobei jegliche Gerinnungsaktivierung zu vermeiden ist.

Die Zentrifugation ist wichtig, um das Plasma von den Plättchen zu separieren. Sie hat rasch nach Blutabnahme unter Verwendung von Citrat-Abnehmeröhrchen oder CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin und Dipyridamol)-Röhrchen zu erfolgen.

Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.

Die Lagerung der Plasmaproben ist möglich für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C), 24 Stunden bei 2-8°C und > 2 Monate tiefgefroren bei ≤ -20°C

Anmerkung: Weitere Informationen zur Probengewinnung, -handhabung und -lagerung sind bei GEHT und/oder im CLSI Dokument H21-A5 veröffentlicht.

**TESTDURCHFÜHRUNG:**

BIOPHEN™ Plasminogen LRT wurde als kinetische Methode zur Durchführung auf Gerinnungsautomaten entwickelt und kann auch als Endpunkt-Methode durchgeführt werden. Adaptionsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten sind auf Anfrage erhältlich. Der Test wird bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt, die Farbentwicklung bei 405 nm gemessen.

**KALIBRATION:**

Der Test wird mit gepooltem Normalplasma (zusammengeführt aus Citratplasma von mindestens 30 medikationsfreien, gesunden männlichen und weiblichen Spendern im Alter von 18 bis 55 Jahren) mit einem festgelegten Plasminogen Wert von 100% kalibriert. Er basiert auf einer Standard-Plasma-Verdünnung von 1:30. Gemäß Definition entspricht diese Verdünnung einer Plasminogen-Aktivität von 100%. Der dynamische Bereich reicht von 0-150% Plasminogen-Aktivität. Die 150% Plasminogen-Aktivität entspricht der 1:20-Verdünnung des Plasmapools (in physiologischer Kochsalzlösung).

Alternativ kann die Kalibration auch mit einem kommerziell verfügbaren Kalibrationsplasma mit bekannter Plasminogen-Konzentration C durchgeführt werden. Die 1:30-Verdünnung entspricht der angegebenen Plasminogen-Konzentration des Kalibrators. Die 150% Plasminogen Konzentration wird wie folgt berechnet: 20 x C:100.

Die Kalibrationskurve kann wie folgt aus der bereits auf 150% Plasminogen voreingestellten Präparation erstellt werden:

% Plasminogen	„150% Plasminogen Kalibrator“ (µL)	Physiologische Kochsalzlösung (µL)
0	0	500
37,5	125	375
75	250	250
100 (falls erforderlich)	333	167
150	500	0

#### TESTPROTOKOLL:

##### Manuelle Methode:

Proben und Kontrollen werden 1:30 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

In ein bei 37°C vorinkubiertes Teströhrchen bzw. Mikrotiterplatte wird nach folgendem Schema zugegeben:

	Mikrotiterplatte	Teströhrchen
Probe, Kalibrator oder Kontrolle (verdünnt)	50 µL	200 µL
<b>[R1]</b> Streptokinase, vorinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
<i>Mischen und für 3 Minuten bei 37°C inkubieren, dann zugeben.</i>		
<b>[R2]</b> Substrat, vorinkubiert bei 37°C	50 µL	200 µL
<i>Mischen und bei 37°C für exakt 3 Minuten inkubieren</i>		
<i>Stoppen der Reaktion durch Zugabe von:</i>		
Zitronensäure (2%)	50 µL	200 µL
<i>Mischen und Messung der Absorption bei 405nm gegen den entsprechenden Probenleerwert.</i>		

Die gebildete Gelbfärbung ist für 2 Stunden stabil. Der Probenleerwert wird durch Mischen der Reagenzien in der umgekehrten Testreihenfolge erhalten, d.h. Zitronensäure (2%), Substrat (R2), Streptokinase (R1), verdünntes Plasma. Die Absorption des Probenleerwertes bei 405 nm ist von der Absorption des entsprechenden Probenwertes abzuziehen.

##### Automatisierte Methoden:

Für die kinetische Messung sind auf Anfrage Adaptionsanleitungen für verschiedene Gerinnungsautomaten erhältlich. In diesem Fall ist es nicht erforderlich, den Probenleerwert abzuziehen oder die Reaktion zu stoppen. Die Besonderheiten der jeweiligen Anwendung und spezifische Warnhinweise für den jeweiligen Automaten sind zu beachten.

##### Anmerkungen:

- Falls die verwendete automatisierte Methode andere Reagenzvolumenta als die oben beschriebenen erfordert, müssen die Verhältnisse der Reagenzkonzentrationen und Reagenzvolumenta genau eingehalten werden, um eine optimale Testleistung zu gewährleisten.
- Bei lipämischem, ikterischem oder hämolytischem Plasma, oder bei unüblicher Färbung, ist eine Leerprobe mitzuführen.

#### QUALITÄTSKONTROLLE:

Die Verwendung von Qualitätskontrollplasmen ermöglicht bei Verwendung der gleichen Reagenzchargen die Validierung der Methodenkonformität und der homogenen Reaktivität des Tests von Analyse zu Analyse. Die Kalibrationskurve wird angenommen, wenn die gemessenen Konzentrationen innerhalb des Akzeptanzbereichs liegen. Es sind verschiedene Qualitätskontrollplasmen erhältlich:

BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung "Normal", Art.Nr. 223201

BIOPHEN™ Kontrollplasma Gerinnung "Abnormal", Art.Nr. 223301

**Anmerkung:** Eine neue Kalibrationskurve muss bei Wechsel der Testkitcharge, größeren Wartungsarbeiten am Messgerät und wenn die gemessenen Werte außerhalb des zu erwartenden Bereiches liegen erstellt werden. Jedes Labor kann, entsprechend der verwendeten Testvorschriften und Geräte, eigene Vertrauensbereiche festlegen. Bei jeder Testserie ist zumindest eine Qualitätskontrolle (mit unterschiedlichen Werten) zu inkludieren.

#### ERGEBNISSE:

- Bei der Endpunktmethode wird auf linearem Millimeterpapier die Plasminogen-Aktivität in Prozent (x-Koordinate) gegen die korrespondierende Absorption  $A_{405}$  (y-Koordinate) aufgetragen. Alternativ können Software-Programme zur Ermittlung der Plasminogen-Aktivität verwendet werden. Das Verhältnis zwischen Plasminogen-Konzentrationen und Absorption  $A_{405}$  ist linear.
- Die Kalibrationskurve wird gezeichnet und  $r^2$  kalkuliert. Die Kalibration ist gültig, sofern  $r^2 \geq 0,98$  ist und die Messwerte der Kontrollen innerhalb der Akzeptanz liegen. Bei der manuellen Methode im Teströhrchen liegt die Absorption zwischen 0 für den 0% Kalibrator und 2,5 ( $\pm 0,5$ ) für die 150% Plasminogen-Konzentration. Bei den automatisierten Methoden sind geringere Absorptionen zu erwarten als bei der manuellen Methode im Teströhrchen und die Absorptionen sind abhängig vom verwendeten Gerinnungsautomaten.
- Die Plasminogen-Aktivität der zu testenden Probe wird direkt von der Kalibrationskurve abgelesen. Die Ergebnisse werden in % Plasminogen angegeben.
- Bei Verwendung von Gerinnungsautomaten wird die Plasminogen-Konzentration in Bezug auf die Kalibrationskurve direkt vom Automaten berechnet.
- Der Messbereich bei der 1:30-Vorverdünnung liegt zwischen 0 und 150%, der Test ist bis 150% Plasminogen-Aktivität linear. Bei abweichender Probenverdünnung müssen die Ergebnisse mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor „D“ geteilt durch 30 (d.h. mit D:30) multipliziert werden.

#### LEISTUNGSMERKMALE:

- Die Nachweisgrenze wird durch die „scheinbare“ Plasminogen-Aktivität definiert. Diese entspricht der mittleren Gerinnungszeit eines Plasminogen-Mangelplasmas plus zwei Standardabweichungen (SD). Sie liegt bei  $\leq 10\%$ .

- Beispiel für die Reproduzierbarkeit, gemessen mit Proben mit unterschiedlichen Plasminogen-Konzentrationen unter Verwendung eines Sysmex® CS-5100 Analyzers:

	Plasminogen-Konzentration %	Intra-Assay			Inter-Assay		
		N	SD	CV%	N	SD	CV%
Probe 1	88	10	0,55	0,6	10	1,0	1,1
Probe 2	29	10	0,27	0,9	10	0,5	1,8

- Der Test BIOPHEN™ Plasminogen LRT zeigt unter Einsatz eines Sysmex® CS-5100 Analyzers eine gute Korrelation mit folgenden Reagenzien:

BIOPHEN™ Plasminogen: n = 40, Korrelation r = 0,999

BERICHROM® Plasminogen: n = 40, Korrelation r = 0,993

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTS:

- Eine signifikante Beeinflussung des Tests durch Heparin-Konzentrationen  $< 2$  IE/mL, Bilirubin-Konzentrationen  $< 0,25$  mg/dL, Triglyzerid-Konzentrationen  $< 300$  mg/dL und Hämoglobin-Konzentrationen  $< 500$  mg/dL im Plasma wurde nicht beobachtet.
- Keine signifikante Beeinflussung des Tests durch Fibrinogen.
- Um eine optimale Funktion des Testes zu gewährleisten, müssen die Vorschriften zur Testdurchführung genau eingehalten werden.

#### ERWARTETE WERTE:

- Die Konzentration von 100% Plasminogen entspricht gemäß Definition der Konzentration in normalem, humanem Citratplasma, gepoolt aus Plasmen von gesunden Männern und Frauen im Alter zwischen 18 und 55 Jahren, welche nicht unter Medikation stehen.
- Die Plasminogen-Konzentration liegt bei gesunden Erwachsenen zwischen 60% und 140%. Mit dem BIOPHEN™ Plasminogen LRT Test, manuelle Methode und n = 54 gesunden Spendern, wurde ein Normalbereich zwischen 70 und 130% (Mittelwert  $\pm$  2SD) ermittelt.
- Bei Neugeborenen ist die Plasminogen-Konzentration verringert. Bei gesunden Erwachsenen wurde beobachtet, dass die Plasminogen-Spiegel abhängig von Faktoren wie Alter, Rauchverhalten, Schwangerschaft, Einnahme hormoneller Kontrazeptiva etc. sind.

#### KLINISCHE INFORMATIONEN:

Eine Plasminogen-Konzentration  $\leq 50\%$  bei Erwachsenen weist auf einen Mangel hin und muss durch Testung einer neuen Plasmaprobe des Patienten bestätigt werden.

Plasminogen-Mängel sind:

- In den meisten Fällen erworbene Mängel: Diese wurden bei Lebererkrankungen, DIC, Sepsis, Thrombolyse-Therapie unter Einsatz von Plasminogen-Aktivatoren und in klinischen Situationen mit hyperfibrinolytischen Zuständen beobachtet.
- Oder angeboren: Von Typ I (Hypoplasminogenämie, verringerte Plasminogen-Aktivität und verringerter Antigen-Spiegel) oder Typ II (Dysplasminogenämie, verringerte Aktivität, aber normaler Antigen-Spiegel). Ob diese mit einem erhöhten Thromboserisiko verbunden sind, wird noch diskutiert.

Eine seltene, aber ernste Komplikation, die mit einem Plasminogen-Mangel einhergeht, könnte lignöse Konjunktivitis sein.

#### BIOCHEMIE:

Plasminogen ist ein einkettiges Glycoprotein mit ca. 90 kDa, welches in der Leber synthetisiert wird und gewöhnlich mit ca. 200 µg/mL im Plasma vorliegt.

Plasminogen ist ein wesentliches Enzym der Fibrinolyse, da Plasminogen nach teilweiser Spaltung durch spezifische Aktivatoren zu Plasmin umgewandelt wird. Die proteolytische Aktivität des Plasmins ist hauptsächlich auf Fibrin ausgerichtet, unter physiologischen Bedingungen wird bei einem Fibringerinnsel Plasminogen zu Plasmin aktiviert. Diese Regulation wird durch verschiedene endogene Aktivatoren (uPA, tPA usw.) oder Inhibitoren (PAI-1) gewährleistet. Auch exogene Streptokinase fungiert als Aktivator.

Der wichtigste Plasmin-Inhibitor im Blut ist das schnell wirkende  $\alpha_2$ -Antiplasmin.

#### REFERENZEN:

- 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.
- Dubosq C, Quintana I, Bassilotta E, Bergonzelli GE, Porterie P, Sassetti B, Haedo AS, Wainsztein N, Kruihof EK, Kordich L, "Plasminogen: an important parameter in septic patients", Thromb Haemost., 77(6): 1090-1095, 1997.
- Azuma H, Uno Y, Shigekiyo T, Saito S, « Congenital plasminogen deficiency caused by a Ser572 to Pro mutation », Blood, 82(2):475-480, 1993.
- 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.
- Ponting CP, Marshall JM, Cederholm-Williams SA, "Plasminogen: a structural review", Blood Coagul Fibrinolysis, 3(5):605-614, 1992.
- Schutta HS, Williams EC, Baranski BG, Sutula TP, « Cerebral venous thrombosis with plasminogen deficiency », Stroke, 22:401-405, 1991.
- 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.
- Reddy KNN, Markus G, "Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase", J. Biol. Chem., 247(6):1683-1691, 1972.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM; "Plasminogen, Plasminogen deficiency" (+173350)