

## PYRUVATE KINASE (PK)

**REF** 063 - Kit pour 20 mesures



---

### UTILISATION PREVUE & DOMAINE D'APPLICATION

---

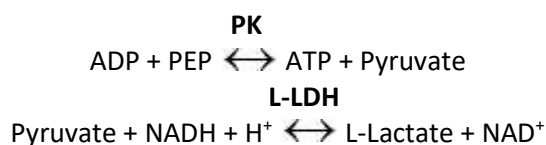
Le Kit Pyruvate Kinase de **Biosentec** est utilisé afin de déterminer l'activité PK dans un échantillon sanguin (voir « Echantillon »), en ultraviolet à 340nm. La glycolyse anaérobie, qui comporte une dizaine d'enzymes dont la PK, fournit sous forme d'ATP, toute l'énergie nécessaire au maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la cellule. Un déficit en PK érythrocytaire est dû à des mutations du gène PK-LR et peut provoquer une hémolyse locale particulièrement importante.

---

### RESUME

---

La PK est dosée grâce à l'action de la L-Lactate Déshydrogénase (L-LDH) :



Les conditions de l'analyse sont étudiées pour que l'activité de la PK soit limitante par rapport à celle de la L-LDH. La quantité de NADH dégradé par unité de temps est proportionnelle à l'activité PK présente dans l'échantillon.

---

### REACTIFS

---

<b>REACTIF N°1</b>	Tampon pH 7.5 / PEP	5mmol/L	20mL
<b>REACTIF N°2</b>	NADH	1.5mmol/L	4mL
<b>REACTIF N°3</b>	L-LDH	>240U/mL	1mL
<b>REACTIF N°4</b>	ADP	100mmol/L	2mL

---

### VALEURS USUELLES

---

5,9 à 8,1 U/g Hb à 37°C

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse un intervalle de référence tenant compte de la population étudiée.

---

### STABILITE ET CONSERVATION

---

Si l'emballage extérieur est détérioré, vérifier que les flacons sont intacts. Dans ce cas, ils peuvent être utilisés. Dans le cas contraire, contacter Biosentec.

Fermés et stockés entre 2 et 8°, les réactifs sont stables jusqu'à la date inscrite sur les étiquettes. Une fois ouverts, ils doivent être utilisés sous 8 semaines et stockés entre 2 et 8°C.

La stabilité est garantie en l'absence de contaminations bactériennes.

Elimination des réactifs : se conformer à la fiche de sécurité du kit.

---

## ECHANTILLONS

---

Aucune méthode d'analyse connue ne permet de s'assurer que les échantillons humains de sang ne transmettent aucune infection. Tous les dérivés de sang doivent donc être manipulés avec attention.

Le prélèvement de sang peut être fait sur un tube ACD à température ambiante et le culot globulaire doit être réalisé dans les 3 heures.

La préparation du culot globulaire doit être réalisée jusqu'à 24h après le prélèvement si celui-ci est conservé à 4°C.

### PREPARATION DES ECHANTILLONS – MODE OPERATOIRE :

Préparation du culot globulaire : la température doit maintenue à 4°C tout au long de la procédure

- a. Introduire dans chaque tube 2 ml de sang + 2 ml d'H<sub>2</sub>O physiologique (NaCl 0.9%) à 4°C
- b. Répéter 2 fois :
  - Agiter doucement par inversion (2-3 fois) et centrifuger 5 mn à 3000 rpm à 4°C
  - Eliminer le surnageant ainsi que la couche de globules blancs soigneusement
  - Remplir à nouveau chaque tube avec 2 mL d' H<sub>2</sub>O physiologique à 4°C
- c. Agiter doucement et centrifuger 10 mn à 3000 rpm à 4°C
- d. Eliminer le surnageant
- e. Répartir le culot de globules rouges en 4 fractions de 100µl

A ce stade, le culot globulaire peut être conservé à -80°C.

Préparation de l'hémolysât

- a. Ajouter 1,4 ml d'H<sub>2</sub>O distillée à 4°C au tube contenant 100 µL de culot de globules rouges
- b. Vortexer énergiquement afin de favoriser la lyse
- c. Centrifuger 3 mn à 7000 rpm à 4°C afin d'éliminer le stroma des GR
- d. Utiliser le surnageant dans la procédure d'essai décrite ci-dessous

A ce stade, l'hémolysât doit être conservé à 4°C et analysé au plus vite. Il est nécessaire de réaliser un dosage de l'hémoglobine du culot globulaire afin de pouvoir exprimer l'activité PK par rapport à celle-ci.

---

## PROCEDURE

---

### MATERIEL FOURNI

Voir la partie REACTIFS.

### MATERIEL REQUIS

Des tubes à hémolyse de 5 ml. Des cuvettes utilisables à 340nm. Un spectrophotomètre capable de lire la Densité Optique à 340 nm. Un bain-marie thermostaté à 37°C pour les incubations. Des pipettes étalonnées permettant de prélever des volumes précis. Des cônes stériles. Un chronomètre. L'équipement permettant de compter les globules rouges ou de déterminer la concentration en hémoglobine.

## PROCEDURE

La température du mélange réactionnel doit être de 37°C et maintenue tout au long de la procédure : le tube à hémolyse ne doit pas être sorti du bain-marie.

Avant utilisation, tous les réactifs du kit doivent être mélangés par inversion (2-3 fois).

Etape	Action	
1	<i>Dans un tube à hémolyse, mettre en présence et homogénéiser :</i>	
	<b>Réactifs</b>	<b>Echantillon</b>
	Réactif N°1	1,0 mL
	Réactif N°2	0,2 mL
	Réactif N°3	0,05 mL
	Eau distillée	1,4 mL
	Hémolysat	0,1 mL
<i>Laisser incuber le mélange à 37°C environ 5 minutes</i>		
2	<i>Ajouter au mélange :</i>	
	Réactif N°4	0,1 mL
<i>Homogénéiser à la pipette sans sortir le tube du bain-marie et déclencher le chronomètre.</i>		
3	<i>A <b>1 minute</b> : prélever 1 ml et lire la <b>DO initiale</b> à 340nm</i>	
4	<i>A <b>6 minutes</b> : prélever 1 ml et lire la <b>DO finale</b> à 340nm</i>	

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer l'activité Pyruvate Kinase de l'échantillon.

### Remarque :

En cas de série de mesures, attention de bien prendre en compte les différentes étapes pour que le temps d'incubation de 5 minutes entre les prises de DO soit bien effectif pour chacune des mesures.

## CONTROLE QUALITE

Les réactifs du kit de dosage de l'activité Pyruvate Kinase doivent être validés par le dosage de contrôles (Biosentec #113 Set de contrôles Pyruvate Kinase) devant être traité comme des échantillons après dilution adaptée (voir la notice du Set de contrôles).

Un dosage du contrôle hors des variations annoncées sur le flacon indique que l'analyse n'est pas correcte. Cette analyse doit être répétée en prenant soin d'éviter toute erreur de manipulation. La précision des volumes et des temps d'incubation est en effet cruciale. Si le problème persiste, contactez **Biosentec**.

---

## CALCULS

---

L'activité PK du contrôle : 
$$PK = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \quad (\text{U/mL})$$

L'activité PK de l'échantillon : 
$$PK = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times \frac{\Delta DO}{\Delta t} \times Fd \times \frac{1}{Hb} \times 100 \quad (\text{U/g Hb})$$

$\Delta DO$	=	[ DO finale – DO initiale ] échantillon
V	=	Volume total du mélange réactionnel (2.85mL)
$\varepsilon$	=	Coefficient d'extinction molaire du NADPH (6,22 – exprimé en L x mmol <sup>-1</sup> x cm <sup>-1</sup> )
l	=	Longueur du trajet optique (1cm)
v	=	Volume d'échantillon (0.1mL)
$\Delta t$	=	Temps de l'analyse (5min)
Fd	=	Facteur de dilution de l'échantillon (15)

Hb = Taux d'hémoglobine du culot globulaire (en g/dL)  
100 = Facteur de conversion (1 dl = 100 ml)

Soit pour le contrôle :

Soit pour l'échantillon :

$$PK = 0.9164 \times \Delta DO \text{ (U/mL)}$$

ou

$$PK = 1374.6 \times \frac{1}{Hb} \times \Delta DO \text{ (U/g Hb)}$$

#### EXEMPLE

Pour un  $\Delta DO = 0.150$  et un taux d'hémoglobine de 12g/dL, l'activité correspondante en PK est de  $0.150 \times 1374.6 / 12 = 13.75$  U/g Hb.

---

### INTERPRETATION

---

Le kit ne permet de rendre un résultat précis que lorsque la valeur de ce dernier se trouve dans la gamme de linéarité. Si le résultat calculé est inférieur à la limite basse de linéarité, il doit uniquement être conclu qu'il y est inférieur. De même, si le résultat calculé est supérieur à la limite haute de linéarité, il doit uniquement être conclu qu'il y est supérieur.

---

### PERFORMANCES

---

#### REPRODUCTIBILITE

Trente analyses de deux échantillons (solution à 0.050 U/mL et à 0.300 U/mL) ont été réalisées. L'activité moyenne de ces analyses a été déterminée à 0.0504 U/mL et à 0.2991 U/mL avec un coefficient de variation de 4.8 % et 3.5 %, respectivement.

#### SENSIBILITE

L'estimation de la limite de détection est réalisée sur trois séries de 30 blancs. Elle est évaluée à 0.005 U/mL.

#### CORRELATION

Les résultats obtenus par la méthode décrite dans cette procédure ont été comparés à ceux obtenus avec ceux provenant d'une méthode de référence hospitalière sur une même série de 13 patients. Cette comparaison a été évaluée via une droite de régression linéaire dont l'équation est  $y = 0.9294x + 0.8545$  et le coefficient de corrélation est 0.9646.

#### LINEARITE

Les Densités Optiques mesurées par ce kit sont proportionnelles aux activités enzymatiques lorsqu'elles sont comprises entre 0.02 et 0.700 U/mL, soit entre 2.5 et 87.5 U/gHb pour un taux de 12g/dl.

---

#### INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

EXP

Date d'expiration

REF

Référence

LOT

Numéro de Lot



A conserver entre 2 et 8°C



BIOSENTEC  
65 Allées Campferran  
31320 Auzeville- Tolosane



IN VITRO DIAGNOSTIC