

## PYRUVATE KINASE

DETERMINAZIONE QUANTITATIVA CINETICA UV della PIRUVATO CHINASI (PK)  
su SIERO ed ERITROCITI con Analizzatore MINDRAY BS-300



**265 tests (20 x 3 mL)**

**REF** NCPK8831

### DESTINAZIONE D'USO

La piruvato chinasi (PK) catalizza la seconda fase della formazione di energia nella glicolisi; una carenza comporta qui delle severe conseguenze. L'unico scopo di questo enzima è catalizzare il trasferimento di un gruppo fosfato da fosfoenolpiruvato (PEP) ad ADP ottenendo una molecola di piruvato e una molecola di ATP. L'attivazione di questo enzima ha bisogno di magnesio e potassio. L'attività della PK è regolata da:  
- i suoi propri substrati PEP e fruttosio 1,6-bifosfato aumentano l'attività enzimatica. Così la glicolisi è spinta ad operare più velocemente con più substrato.  
- ATP e alanina sono inibitori negativi o modulatori.  
- Acetil-CoA sembra dare una inibizione negativa; il ruolo potenziale di inibizione del citrato non è ben noto. L'attività della PK epatica è regolata indirettamente epinefrina (inibizione) e glucagone (attivazione), mentre l'attività della PK muscolare non è inibita da epinefrina. Difetti genetici di questo enzima causano carenza di piruvato chinasi. In questa condizione una mancanza della piruvato chinasi rallenta il processo della glicolisi. Questo effetto è particolarmente devastante in cellule che mancano di mitocondri poiché queste cellule devono utilizzare glicolisi anaerobica come unica fonte di energia in quanto il ciclo di Krebs non è disponibile. Se un essere umano ha globuli rossi in uno stato di carenza di piruvato chinasi, rapidamente diventa carente in ATP e può essere sottoposto ad anemia emolitica. Variazioni sensibili della attività della PK si trovano nei tumori, in particolare tumori epatici.

### PRINCIPIO

Il PK nel campione catalizza la reazione tra ADP e PEP (fosfoenolpiruvato), formando Piruvato.  
Il lattato deidrogenasi contenuto nel sistema catalizza la reazione tra Piruvato e NADH, formando acido lattico e NAD.  
L'incremento di assorbanza nei 10 minuti di reazione, letto a 340 nm, è dovuta all'ossidazione del NADH, è proporzionale all'attività del PK nel campione.  
Usando il calibratore contenuto nel kit è possibile preparare una curva di calibrazione a cui fare riferimento. Riportando sulla medesima i valori di assorbanza e le concentrazioni dei singoli punti, si possono determinare le concentrazioni dei singoli campioni.

### PRECAUZIONI D'USO

1. Questo prodotto è stato formulato per uso diagnostico in vitro.
2. Una variazione proporzionale dei volumi di reazione non modifica il risultato.
3. NON miscelare tra loro Reagenti da diversi lotti di produzione.

4. Per concentrazioni di Piruvato Chinasi maggiori di 90 U/L nel siero e 900 mU/10<sup>9</sup> eritrociti/mL, diluire il campione 1:10 con soluzione fisiologica, ristare e moltiplicare il risultato x 10.

5. Oltre alle eventuali indicazioni di rischio, il Reagente contiene conservanti (sodio azide o altri), la cui concentrazione totale è inferiore ai limiti riportati nelle Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE e relative modifiche per la classificazione, etichettatura ed imballaggio di preparati pericolosi (Reagenti).

Tuttavia si raccomanda di manipolare i reagenti con cautela, evitandone l'ingestione ed il contatto con gli occhi, la pelle e le mucose; di seguire quindi le norme di buona pratica di laboratorio nell'utilizzo di questi materiali.

Nelle schede di sicurezza vengono descritte le procedure operative per la manipolazione di questo prodotto.

Le schede di sicurezza vengono fornite su richiesta.

### ATTENZIONE!

A) Le applicazioni su analizzatori di routine possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale; inoltre le procedure sono specifiche per ciascun analizzatore.

B) Elevata attenzione deve essere data alle sostanze interferenti: alcuni farmaci ed altre sostanze potrebbero influenzare i livelli od il dosaggio di Piruvato Chinasi (cfr Bibliografia 2).

C) Il Reagente deve essere impiegato SOLO per l'uso indicato, da personale esperto e addestrato, seguendo le norme della buona pratica di laboratorio.

D) La diagnosi clinica non può essere fatta correttamente usando il risultato di un solo test, ma deve essere fatta integrando criticamente i risultati di diversi test di laboratorio con differenti dati clinici.

E) Campioni di sangue intero e campioni torbidi e/o itterici devono essere pretrattati prima di essere testati.

F) Una serie di fattori, quali la temperatura ambientale, la temperatura dei reagenti di lavoro, l'accuratezza dei lavaggi e il tipo di spettrofotometro, possono influire sulle prestazioni del test.

G) La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

H) Per la manipolazione dei Reagenti devono essere osservate le precauzioni normalmente adottate in laboratorio.

Tutti i calibratori e controlli vanno considerati come campioni umani, quindi potenzialmente infettivi; devono quindi essere adottate tutte le misure di protezione adeguate allo scopo di evitare ogni tipo di potenziale rischio biologico.

### REAGENTI

Composizione del kit:

**R1 - BUFFER**

Tampone Good >20 mmol/L

**REF** NCPK8831  
1 x 60 mL

**R2 - NADH, LDH** **20 x 3 mL**

NADH >0.1 mmol/L  
PEP >0.1 mmol/L  
LDH > 1000 U/L

**R3 - ADP** **3 x 2 mL**

ADP >0.1 mmol/L

**R4 - CAL** **3 x 1 mL**

Siero umano stabilizzato  
(Valori di Piruvato Chinasi, vedere sul flacone)

**R5 - DIL** **1 x 4 mL**

Diluyente Calibratore  
NaN<sub>3</sub> < 0.1%

**STABILITÀ:** i Reagenti chiusi sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle etichette, se conservati nel loro contenitore primario integro, a 2-8°C se non esposti a fonti termiche e/o variazioni di pressione. In caso di danneggiamento del contenitore primario provvedere allo smaltimento.

**REAGENTI AUSILIARI PER IL CONTROLLO QUALITÀ**

Per garantire l'adeguata prestazione del test utilizzare i seguenti kit (vedere le relative informazioni d'uso (IFU)):

- PIRUVATE KINASE (PK) CONTROL **[REF] OGPCKO32**

La curva di calibrazione deve essere sempre ripetuta ad ogni cambio di lotto del Reagente e/o del calibratore.

**PREPARAZIONE DEL REAGENTE DI LAVORO**

Dissolvere un vial di **R2 - NAHD, LDH** con 3 mL di **R1 - BUFFER**, mescolare gentilmente fino a dissoluzione completa. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

**STABILITÀ' DEL REAGENTE DI LAVORO**

Il REAGENTE DI LAVORO è stabile 3 giorni a 2-8°C al buio.

**PREPARAZIONE DEL REAGENTE STARTER**

Dissolvere un vial di **R3 - ADP** con 2 mL di ACQUA DISTILLATA, mescolare gentilmente fino a dissoluzione completa. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

**STABILITÀ' DEL REAGENTE STARTER**

Il REAGENTE STARTER è stabile 2 settimane a 2-8° C al buio.

**PREPARAZIONE DEL CALIBRATORE**

Dissolvere un vial di **R4 - CAL** con 1 mL di **R5 - DIL**, mescolare gentilmente fino a dissoluzione completa. Evitare la formazione di schiuma. Portare i Reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso. Chiudere immediatamente dopo l'impiego. I prodotti vanno manipolati in modo adeguato, tale da evitare ogni contaminazione.

L'uso non competente ci solleverà da ogni responsabilità.

**STABILITÀ' DEL CALIBRATORE**

Il CALIBRATORE è stabile:

- 4 ore a 2-8° C al buio;
- 3 giorni a -20°C, frazionato in piccole aliquote.

**MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI**

Normale attrezzatura da laboratorio.  
Micropipette in grado di erogare da 3 a 1000 µL.  
Puntali monouso per micropipette.  
Provette in vetro trasparente per la diluizione dei campioni.  
Soluzione fisiologica, acqua distillata, Controlli  
Spettrofotometro od analizzatore automatico di chimica clinica.

**CAMPIONI**

• Siero fresco, non emolizzato e non lipemico, senza altri trattamenti.

TESTARE IMMEDIATAMENTE. L'attività decade del 50% dopo 24 ore a 4°C.

• Sangue intero con EDTA, eparina o ACD(citrato-destrosio): può essere usato per stabilizzare la PK e conservare i campioni per circa 15 giorni a 2-8°C, prima di preparare l'emolisato per il test (cfr Bibliografia 5).

□ **Eritrociti 1<sup>st</sup> step:** si può determinare il numero degli eritrociti nel modo consueto, riportando il risultato nella seguente formula:

**En = n x 10<sup>9</sup> eritrociti/ml sangue per singolo campione.**

□ **Eritrociti 2<sup>nd</sup> step:** Preparare l'emolisato.

Lavare 0,2 ml di sangue intero con 2 ml soluzione salina.

Centrifugare a 3000 rpm x 10 minuti. Eliminare il surnatante e risospesare con 2 ml di salina. Ripetere 3x.

Dopo l'eliminazione dell'ultimo surnatante, gli eritrociti devono essere risospesi con 2 ml di ACQUA DISTILLATA.

Mettere a 2-8°C ed attendere 15 minuti.

Quindi centrifugare a 3000 rpm x 10 min.

**Il surnatante è l'EMOLISATO. TESTARE IMMEDIATAMENTE.**

L'attività decade del 50% dopo 24 ore a 4°C.

Raccolta dei campioni in accordo con CLSI (NCCLS) (cfr Bibliografia 3).

**SMALTIMENTO DEI MATERIALI**

Per lo smaltimento dei rifiuti attenersi alle regolamentazioni locali vigenti.

**PROCEDURA ANALITICA**

**su SPETTROFOTOMETRO MANUALE**

- Lunghezza d'onda: 340 nm
- Cammino ottico: 1 cm
- Lettura: contro il Bianco Reagente
- Temperatura: 37°C
- Metodo: cinetica
- Reazione: 5 + (10 + 10) minuti
- Rapporto campione/reagente: 1/5/0.2 (siero)  
1/29/1 (eritrociti)

**Portare i reagenti alla temperatura di lavoro prima dell'uso.**

Pipettare in tubi o cuvette così etichettate:

BL (Bianco); C (Calibratore); S: Campione (S = siero,

E = eritrociti):

	R/B	ST	S	E
<b>REAGENTE DI LAVORO</b>	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL
Acqua distillata	500 µL	----	----	<b>400 µL</b>
<b>R4 - CAL</b>	----	500 µL	----	----
Campione siero	----	----	500 µL	----
Campione eritrociti	----	----	----	<b>100 µL</b>

Miscelare gentilmente e mettere in stand-by alla temperatura di lavoro. Aspettare esattamente 5 min.; fare la PRIMA lettura (E1 ed Eb1). Mettere ancora in stanb-by alla temperatura di lavoro. Aspettare esattamente 10 min.; fare la SECONDA lettura (E2 ed Eb2). Aggiungere:

<b>REAGENTE STARTER</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
-------------------------	--------	--------	--------	--------

Miscelare gentilmente e fare la TERZA lettura (E3 ed Eb3).

Mettere ancora in stanb-by alla temperatura di lavoro.

Aspettare ancora 10 min.; fare la QUARTA lettura (E4 ed Eb4).



Determinare la differenza di Abs per 10 minuti dovuta all'attività del PK :

**SIERO**  $\Delta A(S)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

**ERITROCITI**  $\Delta A(GR)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

**BIANCO**  $\Delta A(bl)$  (10 min.) = (Ebl3 - Ebl4) - (Ebl1 - Ebl2)

**CALIBRATORE**  $\Delta A(C)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

Sottrarre il  $\Delta A(bl)$  da quello del campione:

**SIERO**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\square A(S)$  (10 min.) -  $\square Abl$  (10 min.)

**CALIBRATORE**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\square A(C)$  (10 min.) -  $\square Abl$  (10 min.)

**ERITROCITI**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\square A(GR)$  (10 min.) -  $\square Abl$  (10 min.)

## ATTENZIONE!

Il kit è sperimentato per spettrofotometro manuale e per sistemi HITACHI, COBAS e MINDRAY.

Le applicazioni su analizzatori automatici possono essere totalmente diverse da quanto sviluppato come determinazione manuale.

## VALORI DI RIFERIMENTO

Valori normali Piruvato Chinasi:

- siero 0 - 45 U/L (cfr Bibliografia 6)

- eritrociti 111 - 406 mU/10<sup>9</sup> eritrociti/mL (cfr Bibliografia 7)

- emoglobina 41 - 152 U/g emoglobina (cfr Bibliografia 7)

Poiché i valori normali dipendono dall'età, dal sesso, dalla dieta, dall'area geografica e da altri fattori, ogni laboratorio deve stabilire i propri valori normali per questa procedura.

## CALCOLO

Inserire il valore trovato nella seguente formula:

### Siero

PK (U/L) =

(Siero)  $\Delta A$  (10 minuti)

----- x concentrazione **R4 - CAL**

(Calibratore)  $\square A$  (10 minuti)

### Eritrociti

PK (mU/10<sup>9</sup> eritrociti/ mL = U/10<sup>9</sup> eritrociti/L =

(Erythrocyti)  $\Delta A$  (10 minuti)

----- x concentrazione **R4 - CAL** x 10 x 1/n x F

(Calibratore)  $\Delta A$  (10 minuti)

dove 10 = fattore di diluizione emolisato

n = numero degli eritrociti espresso in 10<sup>9</sup>

F = 5 [riferito alla diluizione 1/5 del campione

(100  $\mu$ l campione + 400  $\mu$ l acqua distillata)]

Tuttavia la **PK negli eritrociti** può anche essere espressa come **U/g Hb**. E' necessario determinare dapprima la concentrazione di Emoglobina in g/dL nei campioni; poi bisogna applicare la seguente formula:

**PK (U/g Emoglobina) =**

(Erythrocyti)  $\Delta A$  (10 minuti)

----- x conc. **R4 - CAL** x 10 x 1/10 Hb x F

(Calibratore)  $\square A$  (10 minuti)

dove 10 = fattore di diluizione emolisato

Hb (g/dL) = concentrazione di Emoglobina in ogni campione

10 Hb (g/L) = 10 volte conc. di Emoglobina in ogni campione

F = 5 [riferito alla diluizione 1/5 del campione

(100  $\square$ l campione + 400  $\square$ l acqua distillata)]

Così la formula diventa

**PK (U/g Emoglobina) =**

(Erythrocyti)  $\Delta A$  (10 minuti)

----- x conc. **R4 - CAL** x 1/Hb x F  
(Calibratore)  $\Delta A$  (10 minuti)

## PRESTAZIONI ANALITICHE

(validate su MINDRAY BS300)

Le prestazioni del Reagente **PYRUVATE KINASE** sono state sperimentate con un analizzatore MINDRAY BS300. I dati, pur rappresentando le caratteristiche del prodotto, potrebbero variare per ogni singolo laboratorio e per i diversi analizzatori.

**Limitazioni del metodo:** non sono conosciute limitazioni.

**Linearità del metodo:** il test è lineare fino a 90 U/L nel siero e 900 mU/10<sup>9</sup> eritrociti/mL. Per concentrazioni 90 U/L nel siero e 900 mU/10<sup>9</sup> eritrociti/mL, diluire il campione 1:10 con soluzione salina, ripetere la determinazione e moltiplicare il risultato x 10.

**Sensibilità del metodo (LoD) :** il limite di sensibilità, ovvero la concentrazione minima che può essere distinta dallo zero è 1.3 U/L

**Interferenze:** cfr Bibliografia punto 2.

Criterio delle prove di interferenza: recupero  $\pm$  10% del valore iniziale. Non si sono osservate interferenze su campioni con:

- bilirubina totale fino a 20 mg/dL;

- emoglobina fino a 450 mg/dL;

- acido ascorbico fino a 37.5 mg/dL.

**Precisione nella serie:** determinata su 20 replicati di due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm$ 2s	CV%
Umano 1	31.6 $\square$ 0.7	1.2
Umano 2	41.7 $\square$ 0.8	1.1

**Precisione tra le serie:** determinata per 5 giorni su 20 replicati al giorno per due campioni.

I risultati ottenuti sono i seguenti:

Campione	Media (U/L) $\pm$ 2s	CV%
Umano 1	31.4 $\square$ 0.8	1.3
Umano 2	41.5 $\square$ 1.2	1.4

**Accuratezza:** un gruppo di 20 sieri è stato testato con questa procedura ed usando il reagente su analizzatori diversi.

Il confronto ha dato i seguenti risultati:

Regressione lineare  $y = 0.9975x - 0.103$

Coefficiente di correlazione  $r = 0.9999$  n = 20

## BIBLIOGRAFIA

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.
4. Beisenherz G. et al., Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
5. Beutler E., Red Cell Metabolism, Grune & Stratton, New York (1971).
6. Otto, P. et al., Klin. Wschr. 42, 75 (1964).
7. Wiesmann, U. et al., Klin. Wschr. 43, 1311 (1965)

Codice Ramo **CND W01010199**





## PYRUVATE KINASE



QUANTITATIVE KINETIC UV DETERMINATION OF PYRUVATE KINASE (PK)  
in SERUM and ERYTHROCYTES on MINDRAY BS-300 Analyzer



265 tests (20 x 3 mL)



NCPK8831

### INTENDED USE

Pyruvate kinase (PK) catalyzes the second step of formation of energy in the glycolysis; a deficiency involves strict consequences here. The only scope of this enzyme is to catalyze the transfer of a phosphate group from phosphoenolpyruvate (PEP) to ADP, yielding one molecule of pyruvate and one molecule of ATP.

The activation of this enzyme needs magnesium and potassium. PK activity is regulated by:

-its own substrate, PEP and fructose 1,6-biphosphate, enhance enzymatic activity. Thus glycolysis is driven to operate faster with more substrate.

-ATP and alanine are negative inhibitor or modulator.

-acetyl-CoA seems to have negative inhibition; the potential inhibitory role of citrate is not well known.

Liver PK is also regulated indirectly by epinephrine (inhibition) and glucagon (activation), while muscle PK is not inhibited by epinephrine.

Genetic defects of this enzyme cause pyruvate kinase deficiency. In this condition, a lack of pyruvate kinase slows down the process of glycolysis. This effect is especially devastating in cells that lack mitochondria, because these cells must use anaerobic glycolysis as their sole source of energy because the Krebs cycle is not available. If an human being has red blood cells in a state of pyruvate kinase deficiency, rapidly they become deficient in ATP and can undergo to hemolytic anemia.

Sensitive variations of the PK are found in the tumors, in particular liver tumors.

### PRINCIPLE

PK in the sample catalyzes the reaction between ADP and PEP (phosphoenolpyruvate), forming Pyruvate.

The Lactate dehydrogenase (LDH) in the system catalyzes the reaction between Pyruvate and NADH, giving Lactic ac. and NAD. The decrease of absorbance in 10 min at 340 nm, due to the oxidation of NADH is proportional at the activity of the PK in the sample.

Using the calibrator contained in the kit it is possible to prepare a Calibration Curve to refer.

Plotting on the Calibration Curve absorbance values and concentration for each single sample, may be determined the concentration of each sample.

### PRECAUTIONS FOR USE

1. This product has been formulated for in vitro diagnostic use.
2. A proportional variation of the reaction volumes does not change the result.
3. DO NOT mix Reagents from different Production lots.

4. For concentration of Pyruvate Kinase higher than 90 U/L for serum and 900 mU/10<sup>9</sup> erythrocytes /mL, dilute the sample 1:10 with saline solution, repeat the determination and multiply the result by 10.

5. In addition to the possible risk indications, the Reagent can contain preservatives (as sodium azide or others), which total concentration is lower than the limits mentioned in Dir. 67/548/CEE e 88/379/CEE and following modifications regarding classification, labelling and packaging of dangerous preparations (Reagents). However it is recommended to handle the reagents carefully, avoiding ingestion and contact with eyes, mucous membranes and skin; to use reagents according to good laboratory practice. On the material safety data sheet are detailed the operating procedures for the manipulation of this product.

Material safety data sheet should be supplied on request.

### ATTENTION!

A) Applications on routine analyzers may be totally different from what developed as manual determination; in addition the procedures are specific for each analyzer.

B) Very deep attention must be given to interfering substances: certain drugs and other substances are able to influence levels of Pyruvate Kinase (see References 2):

C) The reagent must be used ONLY for the intended destinations, by expert and trained people and in according to good laboratory practice.

D) The clinical diagnosis cannot be done correctly using the result of only one test, but have to be done integrating critically the results of different laboratory tests and clinical data.

E) Whole blood sample will be pretreated before the test.

F) A lot of factors, as ambient temperature, the working reagent temperature, wash accuracy and the type of spectrophotometer, may affect the tests performances.

G) The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

H) All the precautions normally used in the laboratory must be respected for reagents handling.

All the calibrators and controls must be considered as human sample, so potentially infectious; all the protection actions must be applied to avoid any potential biological risk.

### REAGENTS

Components of the kit:

#### R1 - BUFFER

Good buffer >20 mmol/L

#### R2 - NADH, LDH

NADH >0.1 mmol/L  
PEP >0.1 mmol/L

REF NCPK8831

1 x 60 mL

20 x 3 mL



LDH	> 1000 U/L	
<b>R3 - ADP</b>		<b>3 x 2 mL</b>
ADP	>0.1 mmol/L	
<b>R4 - CAL</b>		<b>3 x 1 mL</b>
Human stabilized serum (Values of Pyruvate Kinase, see on the bottle)		
<b>R5 - DIL</b>		<b>1 x 4 mL</b>
Calibrator diluent NaN3 < 0.1%		

**STABILITY:** the Reagents are stable up to the expiry date mentioned on the labels, stored at 2-8°C, if closed and kept in their intact primary container; if not exposed to heat sources and/or pressure variations.

In case of damaging of the primary container organize the waste disposal.

#### AUXILIARY REAGENTS FOR QUALITY CONTROL

To grant the right performances use following kits (see the relative information for use (IFU)):

- PIRUVATE KINASE (PK) CONTROL REF OGPCKO32

The calibration curve has to be always repeated at each change of the lot of the Reagent and/or calibrator.

#### PREPARATION OF THE WORKING REAGENT

Dissolve a vial of **R2 - NADH, LDH** with 3 mL of **R1 - BUFFER**, mix gently until dissolution.

Let the reagent reach the room temperature before use.

Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

#### STABILITY OF THE WORKING REAGENT

The WORKING REAGENT is stable 3 days at 2-8°C.

#### PREPARATION OF THE WORKING STARTER

Dissolve a vial of **R3 - ADP** with 2 mL of DISTILLED WATER, mix gently until dissolution. Let the reagent reach the room temperature before use. Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

#### STABILITY OF THE WORKING STARTER

The WORKING STARTER is stable 2 weeks at 2-8°C.

#### PREPARATION OF CALIBRATOR

Dissolve a vial of **R4 - CAL** with 1 mL of **R5 - DIL**, mix gently until dissolution. Avoid foam. Let the reagent reach the room temperature before use. Close immediately after handling.

The Reagents have to be used correctly, to avoid contamination.

An incompetent handling relieves us from any responsibility.

#### STABILITY OF CALIBRATOR

The CALIBRATOR is stable:

- 4 hours at 2-8°C in the dark;

- 3 days at -20°C in the dark.

#### MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

Normal laboratory equipment.

Micropipettes to deliver from 3 to 1000 µL.

Disposable micropipettes tips .

Transparent glass tubes for sample dilution.

Saline solution, distilled water, Controls.

Spectrophotometer or automatic analyzer for Clinical Chemistry.

#### SAMPLES

• Not haemolysed and not lipemic fresh serum, without other treatments.

To test immediately. A 50% of activity may be lost after 24 h at 2-8°C.

• Whole blood collected with EDTA, heparin or ACD (Acid-Citrate-Dextrose) may be used to stabilize and store Pyruvate Kinase for about 15 days at 2-8°C, before to prepare the haemolyzate to test (see References 5).

• Erythrocytes 1<sup>st</sup> step: you must determine the number of erythrocytes in the normal way, reporting the result

**En = n x 10<sup>9</sup> erythrocytes/mL blood for each sample.**

• Erythrocytes 2<sup>nd</sup> step: prepare the haemolyzate. Wash 0,2 mL of whole blood with 2 mL of saline. Centrifuge 3000 rpm x 10 min. Eliminate the supernatant and resuspend with 2 mL of saline. Repeat 3x. After the elimination of the last supernatant, the washed and precipitated by centrifugation Erythrocytes must be suspended with 2,0 mL of DISTILLED WATER. Leave to wait 15 min x 2-8°C. Then centrifuge 3000 rpm x 10 min.

The supernatant is the HAEMOLYZATE. To test immediately.

A 50% of activity may be lost after 24 h at 2-8°C.

#### WASTE DISPOSAL

Observe all federal, state and local environmental regulations for waste disposal.

#### ANALYTICAL PROCEDURE FOR SERUM AND URINE

##### ON MANUAL SPECTROPHOTOMETER

- Wavelength: 340 nm (334 - 365 nm)
- Pathlength: 1 cm
- Reading: against Blank Reagent
- Temperature: 37°C
- Method: end-point
- Reaction: 3 + 10 minutes
- Sample/reagent: 1/300/0.5

**Let reagents reach the working temperature before use.**

Pipette into a test tube or cuvette labelled:

BL (Blank); C (Calibrator); S: Sample (S=serum, E=erythrocytes);

	R/B	ST	S	E
<b>WORKING REAGENT</b>	2500 µL	2500 µL	2500 µL	2500 µL
Distilled water	500 µL	----	----	<b>400 µL</b>
<b>R4 - CAL</b>	----	500 µL	----	----
Sample serum	----	----	500 µL	----
Erythrocytes Sample	----	----	----	<b>100 µL</b>

Mix kindly and put in stand-by at the right temperature. Wait exactly 5 minutes; make the FIRST reading (E1 and Eb1).

Put again in stand-by at the right temperature. Wait exactly 10 minutes; make the SECOND reading (E2 and Eb2). Add:

<b>WORKING STARTER</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
------------------------	--------	--------	--------	--------

Mix kindly and make the THIRD reading (E3 and Eb3).

Put in stand-by at the right temperature.

Wait again 10 min.; make the FOURTH reading (E4 and Eb4).

Determine the diff. of absorbance for 10 minutes due to PK activity:

**SERUM**  $\Delta A(S)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

**ERYTHROCYTES**  $\Delta A(E)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

**BLANK**  $\Delta A(B)$  (10 min.) = (Eb3 - Eb4) - (Eb1 - Eb2)

**CALIBRATOR**  $\Delta A(C)$  (10 min.) = (E3 - E4) - (E1 - E2)

Subtract the Blank ( $\Delta A(B)$ ) from the Calibrator and samples:

**SERUM**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\Delta A(S)$  (10 min.) -  $\Delta A(B)$  (10 min.)

**CALIBRATOR**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\Delta A(C)$  (10 min.) -  $\Delta A(B)$  (10 min.)

**ERYTHROCYTES**  $\Delta A$  (10 min.) =  $\Delta A(E)$  (10 min.) -  $\Delta A(B)$  (10 min.)



## ATTENTION!

The kit is tested for a manual spectrophotometer and for HITACHI, COBAS and MINDRAY systems. The applications on automatic analyzers could be completely different by what has been developed as manual determination.

## REFERENCE VALUES

Normal Values Pyruvate Kinase:

- serum 0-45 U/L (see References 6)
- erythrocytes 111-406 mU/ 10<sup>9</sup> erythrocytes /mL (see References 7)
- hemoglobin 41-152 U/g hemoglobin (see References 7)

Since the normal values depend on age, sex, diet, geographic area and other factors, each laboratory should establish its own normal values for this procedure.

## CALCULATION

Use this general formula to calculate the concentration:

### Serum

PK (U/L) =

$$\frac{(\text{Serum}) \Delta A (10 \text{ minutes})}{(\text{Calibrator}) \Delta A (10 \text{ minutes})} \times R4 - \text{CAL concentration}$$

### Erythrocytes

PK (mU/10<sup>9</sup> erythrocytes/mL = U/10<sup>9</sup> erythrocytes/L =

(Erythrocytes) ΔA(10 minutes)

$$\frac{\text{-----}}{(\text{Calibrator}) \Delta A (10 \text{ minutes})} \times R4 - \text{CAL concentration} \times 10 \times 1/n \times F$$

where 10 = dilution factor of haemolyzate  
 n = erythrocytes number mentioned in 10<sup>9</sup>  
 F = 5 [referred to the dilution 1/5 of the sample  
 (100 μl sample + 400 μl distilled water)]

But the PK in erythrocytes may be also expressed as U/g Hb. At first must be determined the concentration of Hemoglobin in g/dL. After that use this formula:

### PK (U/g Hemoglobin)

(Erythrocytes) ΔA(10 minutes)

$$\frac{\text{-----}}{(\text{Calibrator}) \Delta A (10 \text{ minutes})} \times R4 - \text{CAL conc.} \times 10 \times 1/10 \text{ Hb} \times F$$

where 10 = dilution factor of haemolyzate  
 Hb (g/dL) = Hemoglobin conc. for each sample  
 10 Hb (g/L) = 10 times Hemoglobin conc  
 F = 5 [referred to the dilution 1/5 of the sample  
 (100 μl sample + 400 μl distilled water)]

So formula becomes:

### PK (U/g Hemoglobin)

(Erythrocytes) ΔA(10 minutes)

$$\frac{\text{-----}}{(\text{Calibrator}) \Delta A (10 \text{ minutes})} \times R4 - \text{CAL conc.} \times 1/\text{Hb} \times F$$

## ANALYTICAL PERFORMANCES

### (validate on MINDRAY BS300)

The performances of the Reagent PYRUVATE KINASE have been tested with a MINDRAY BS300 analyzer. The data, while representing the characteristics of the product, could be different for each laboratory and for different analyzers.

**Method Limitations:** are not know limitations.

**Method Linearity:** the test is linear up to 90 U/L for serum and 900

mU/10<sup>9</sup> erythrocytes /mL. For concentrations ≥ 490 U/L for serum and 900 mU/10<sup>9</sup> erythrocytes /mL, it is recommended to dilute the sample 1:10 with saline solution, test again and multiply the result x 10.

**Method Sensitivity (LoD):** the sensitivity limit, that is the minimum concentration that can be distinguished by zero, is 1.3 U/L

**Interferences:** see References 2.

Interference test criterion: recovery ± 10% of initial value. No interference found on samples with:

- total bilirubin up to 20 mg/dL;
- haemoglobin up to 450 mg/dL,
- ascorbic acid up to 37.5 mg/dL.

**Within-run Precision:** determined on 20 replications of 2 samples.

The results obtained are following:

Sample	Mean (U/L) ± 2s	CV %
Human 1	31.6 ± 0.7	1.2
Human 2	41.7 ± 0.8	1.1

**Run-to-run Precision:** determined for 5 days with 20 replications for each days, for two samples.

The results obtained are the following:

Sample	Mean (U/L) ± 2s	CV %
Human 1	31.4 ± 0.8	1.3
Human 2	41.5 ± 1.2	1.4

**Accuracy:** a group of 20 sera has been tested using this procedure and using a similar reagent available on the market. The comparison gave these results:

Linear regression equation  $y = 0.9975x - 0.103$

Correlation coefficient  $r = 0.9999$   $n = 20$

## REFERENCES

1. Textbook of Clinical Chemistry, Ed. by N.W. Tietz, W.B. Saunders Co., Philadelphia (1999).
2. Young D.S., Effect of drugs on Clinical Lab. Test, 5th Ed. AACC Press (2000).
3. CLSI(NCCLS) GP44-A4/H18-A4: Proc. for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Lab. Tests.
4. Beisenherz G. et al., Z. Naturforsch. 8b, 555 (1953)
5. Beutler E., Red Cell Metabolism, Grune & Stratton, New York (1971).
6. Otto, P. et al., Klin. Wschr. 42, 75 (1964).
7. Wiesmann, U. et al., Klin. Wschr. 43, 1311 (1965)

**EDMA (EDMS) CODE 11 01 01 90 00**

