

KIT DE DOSAGE DU PYRUVATE

REF 060 – Kit pour 30 mesures

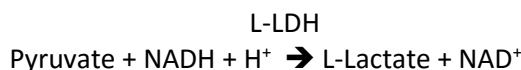


UTILISATION PREVUE & DOMAINE D'APPLICATION

Le Kit de dosage du Pyruvate **Biosentec** permet de déterminer la concentration en Pyruvate d'un échantillon sanguin (voir paragraphe « Echantillon »). L'acide pyruvique (pyruvate) est le produit du métabolisme du glucose et de l'éthanol par la voie anaérobie. Il résulte de l'équilibre de la réaction de transformation pyruvate – lactate. Cette réaction est réversible et il existe un équilibre permanent entre lactate et pyruvate, ce dernier étant seul capable de pénétrer dans les mitochondries pour effectuer une réaction énergétique (cycle de Krebs), avec transformation intermédiaire en acétate (réaction dépendante de la vitamine B1). L'augmentation de son taux peut être rencontrée dans des cas d'hypovitaminose B1, d'acidose diabétique, de vomissements acétoniques, d'états de chocs avec hypoperfusion tissulaire et d'exercice physique intense.

RESUME

Pour son dosage, le pyruvate est transformé en L-Lactate par la L-lactate déshydrogénase en oxydant le NADH en NAD :



La quantité de NADH transformé est proportionnelle à la quantité de Pyruvate initialement présente dans l'échantillon.

REACTIFS

REACTIF N°1	Tampon Phosphate	0,8mol/L	30mL
REACTIF N°2	NADH	3mmol/L	6mL
REACTIF N°3	L-Lactate déshydrogénase	>1000U/mL	0,6mL
SOLUTIONS CONTROLES	Pyruvate	Normal et Haut	2 x 3mL

VALEURS USUELLES

40 à 60µmol/L (soit 3,6 à 5,9mg/L) dans le sang veineux à jeun

Rapport Lactate / Pyruvate < 10

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°C, 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 contamination bactérienne.

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

ECHANTILLON

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 sanguin doit être réalisé à jeun sur tube hépariné et ne doit pas être hémolysé. Afin d'éviter sa dégradation, l'échantillon doit être immédiatement déprotéinisé (procédure ci-dessous) et conservé à 4°C.

Le dosage doit être effectué sur un échantillon déprotéinisé avec de l'acide perchlorique 1M comme suit :

- Mélanger 2mL d'échantillon pour 2mL d'acide perchlorique 1M
- Vortexer énergiquement pendant 30 secondes puis placer dans la glace (ou à 4°C) pour compléter la précipitation des protéines
- Vortexer à nouveau et centrifuger 10 minutes à 3 000 x g
- Si le surnageant n'est pas limpide et incolore, centrifuger à nouveau
- Mélanger 2mL de surnageant pour 1mL de R1
- Laisser décanter
- Doser le surnageant selon la procédure d'essai ci-dessous

PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Voir la partie REACTIFS.

MATERIEL REQUIS

- Matériel : Des cuvettes utilisables à 340nm. Un spectrophotomètre capable de lire la Densité Optique à 340nm, avec un emplacement thermostaté pour la cuvette de lecture. Des pipettes étalonnées permettant de prélever des volumes précis. Des cônes stériles.
- Acide perchlorique (HClO₄) 1 M
- H₂O distillée

PROCEDURE

Etape	Action		
1	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>		
	Réactifs	Blanc	Echantillon / Contrôle
	Réactif N°2	0,2mL	0,2mL
	Echantillon	-	2mL
	Eau distillée	2mL	-
2	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance à 340nm après 2 minutes : DO initiale</i>		
3	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>		
	Réactif N°3	0,02mL	0,02mL
4	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance à 340nm après 10 minutes : DO finale</i>		

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer la concentration en Pyruvate de l'échantillon
Attention : Si après la prise de DO finale, celle-ci évolue toujours, reporter la mesure à 2 minutes supplémentaires.

CONTROLE QUALITE

Les réactifs du kit de dosage du Pyruvate doivent être validés par le dosage des contrôles inclus dans le kit, qui doivent être traités comme un échantillon.

Vous pouvez rectifier les volumes pour ce contrôle de la façon suivante :

1ml de contrôle + 1 ml d'acide perchlorique + 1 ml de réactif R1.

Laisser décanter quelques minutes et prélever 2 ml de surnageant pour réaliser la mesure du contrôle.

Un dosage d'un contrôle hors des valeurs inscrites sur le flacon indique que l'analyse n'est pas correcte. Cette analyse doit être répétée. Si le problème persiste, contactez **Biosentec**.

CALCULS

La concentration de l'échantillon en Pyruvate est directement proportionnelle au delta de DO suivant :

$$\Delta DO = [DO \text{ initiale} - DO \text{ finale}] \text{ échantillon} - [DO \text{ initiale} - DO \text{ finale}] \text{ blanc}$$

La concentration en Pyruvate est calculée par l'équation suivante :

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times l \times v \times 1000} \times \Delta DO \times FD \text{ (mg/L)}$$

V	=	Volume total du mélange réactionnel (2.22mL)
MW	=	Masse Moléculaire du Pyruvate (87.05 g.mol ⁻¹)
ε	=	Coefficient d'extinction molaire du NADH (6 220 L x mol ⁻¹ x cm ⁻¹)
l	=	Longueur du trajet optique (1cm) : A adapter en fonction du matériel utilisé !
v	=	Volume d'échantillon (2mL)
1000	=	Facteur de conversion pour obtenir des mg/L
FD	=	Facteur de dilution inhérente à la procédure de déprotéinisation et de mesure (3)

Soit dans les conditions de l'analyse :

$$C = 46,60 \times \Delta DO \text{ (mg/L de Pyruvate dans l'échantillon)}$$

$$C = 535 \times \Delta DO \text{ (}\mu\text{mol/L de Pyruvate dans l'échantillon)}$$

EXEMPLE

Pour un $\Delta DO = 0,107$, la concentration correspondante en Pyruvate est de $0,107 \times 46,60 = 5\text{mg/L}$

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

REPETABILITE

Trente analyses de deux échantillons (3,5mg/L et 5mg/L) ont été réalisées avec 3 Lots de kits différents. Chaque série de 30 analyses de chacun des échantillons possède un Coefficient de Variation inférieur à 10%.

SENSIBILITE

La limite de détection, évaluée à 0,9mg/L, a été réalisée sur une série de 30 blancs avec 3 Lots de kits différents. La limite de quantification, évaluée à 3,0mg/L, a été réalisée sur une série de 30 blancs avec 3 Lots de kits différents.

CORRELATION

Les résultats obtenus par la méthode décrite dans cette procédure ont été comparés à ceux obtenus avec ceux provenant de la méthode utilisée dans un centre hospitalier universitaire sur une même série de 29 patients. Cette comparaison a été évaluée via une droite de régression linéaire dont l'équation est $y = 0,9903x + 3,4916$ et le coefficient de corrélation est 0,9624.

LINEARITE

Les concentrations mesurées par ce kit sont proportionnelles aux Densités Optiques mesurées lorsqu'elles sont comprises entre 3,0 et 28,0 mg/L.

INTERFERENCES

Les échantillons présentant une hémolyse ne peuvent pas être analysés en utilisant cette méthode, puisque les hématies libèrent de la LDH qui interfère avec le dosage.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

EXP

Date d'expiration

REF

Référence

LOT

Numéro de Lot

2°C / 8°C

A conserver entre 2 et 8°C



BIOSENTEC
65 Allées Campferran
31320 Auzeville- Tolosane

CE

IVD

IN VITRO DIAGNOSTIC