

KIT DE DOSAGE DE LA CARNITINE

Méthode avec calibrant

REF 066C – Kit pour 30 mesures

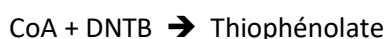
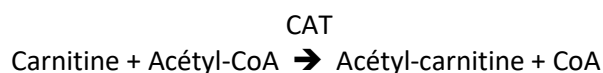


UTILISATION PREVUE

Le Kit de dosage de la Carnitine **Biosentec** est utilisé afin de déterminer la concentration en Carnitine d'un échantillon sanguin (voir paragraphe « Echantillon »). La Carnitine est un composé bio-synthétisé à partir de lysine et de méthionine. Cette molécule intervient au sein de la cellule dans le transport des acides gras, du cytosol vers les mitochondries lors du catabolisme des lipides dans le métabolisme énergétique. Le déficit en carnitine est retrouvé dans des déficits héréditaires, lors de carence de précurseurs de synthèse ou en cas d'insuffisance rénale.

RESUME

Pour son dosage, la carnitine est acétylée par la Carnitine Acétyl-Transférase (CAT) grâce à de l'Acétyl-CoenzymeA (Acétyl-CoA). Le CoA libéré est ensuite complexé au 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB). La formation de ce complexe est dosée à 415nm :



La quantité de Thiophénolate formé est proportionnelle à la quantité de Carnitine initialement présente dans l'échantillon.

REACTIFS

REACTIF N°1	Tampon Tris	150 mmol/L	20mL
REACTIF N°2	DTNB	2 mmol/L	3mL
REACTIF N°3	Acetyl-CoA	5 mg	
	A reconstituer avec 3mL d'eau désionisée.		
REACTIF N°4	CAT	> 40 U	0,7mL
SOLUTION CALIBRANT	Carnitine	voir étiquette	3mL
SOLUTION CONTROLE HAUT	Carnitine	voir étiquette	3mL
SOLUTION CONTROLE NORMAL	Carnitine	voir étiquette	3mL

VALEURS USUELLES

30 à 50 $\mu\text{mol/L}$ de Carnitine libre dans le sang (1an – adulte)

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. Une fois le Coenzyme A (R3) resuspendu dans l'eau, sa stabilité est de 2 semaines 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.

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 dosage est à effectuer sur un plasma hépariné puis déprotéinisé comme suit :

- Mélanger un volume d'échantillon pour un volume d'acide perchlorique HClO_4 0,6M
- Vortexer énergiquement pendant 30 secondes puis laisser dans la glace pendant 10 minutes
- Vortexer à nouveau et centrifuger 10 minutes à 6.000rpm (3.000g)
- Si le surnageant n'est pas limpide, centrifuger à nouveau
- Ajouter 0,2 volume de Potassium carbonate K_2CO_3 1,2 M à 1 volume de surnageant
- Mélanger et laisser dans la glace pendant 20 minutes
- Centrifuger 5 minutes à 6.000rpm (3.000g)
- Doser le surnageant selon la procédure d'essai ci-dessous

PROCEDURE

MATERIEL FOURNI

Voir la partie REACTIFS.

MATERIEL REQUIS

- Matériel : Des cuvettes utilisables à 415nm. Un spectrophotomètre capable de lire la Densité Optique à 415nm, avec un emplacement thermostaté pour la cuvette de lecture. Des pipettes permettant de prélever des volumes précis. Chronomètre.
- Acide perchlorique HClO_4 0,6M
- Potassium carbonate K_2CO_3 1,2M
- H_2O distillée

PROCEDURE

Etape	Action			
1	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>			
	Réactifs	Blanc	Calibrant	Echantillon / Contrôle
	Réactif N°1	0,6 mL	0,6 mL	0,6 mL
	Réactif N°2	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
	Réactif N°3	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
	Eau distillée	0,2 mL	-	-
	Calibrant	-	0,2 mL	-
Echantillon / Contrôle	-	-	0,2 mL	
2	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance à 415 nm : DO initiale</i>			
3	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>			
	Réactif N°4	0,02 mL	0,02 mL	0,02 mL
4	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance à 415 nm après 20 minutes : DO finale</i>			

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer la concentration en Carnitine 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 Carnitine doivent être validés par le dosage du contrôle inclus dans le kit, qui doit être traité comme un échantillon.

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

CALCULS

Déterminer les valeurs suivantes pour chaque cuve : $\Delta DO = DO 2 - DO 1$

Déterminer ensuite les différences d'absorbance :

Pour le calibrant : $\Delta A_{\text{calibrant}} = \Delta DO_{\text{calibrant}} - \Delta DO_{\text{blanc}}$

Pour l'échantillon : $\Delta A_{\text{échantillon}} = \Delta DO_{\text{échantillon}} - \Delta DO_{\text{blanc}}$

Déterminer la concentration en carnitine dans les échantillons :

$$C (\mu\text{mol} / \text{L de carnitine}) = \frac{\Delta A_{\text{échantillon}}}{\Delta A_{\text{calibrant}}} \times C_{\text{calibrant}}$$

EXEMPLE

Les différences d'Absorbance suivantes sont trouvées :

$\Delta A_{\text{calibrant}} = 0,267$, pour une concentration de 100 $\mu\text{mol/L}$

$\Delta A_{\text{échantillon}} = 0,108$

La concentration correspondante en Carnitine dans l'échantillon est de $(0,108/0,267) \times 100 = 40,4 \mu\text{mol/L}$.

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

Vingt analyses d'un même échantillon (étalon à 40 µmol/L) ont été réalisées. La concentration moyenne de ces analyses a été déterminée à 41.3 µmol/L avec un coefficient de variation de 1.3%.

SENSIBILITE

L'estimation de la limite de détection est réalisée sur une série de 10 blancs. Elle est évaluée à 3 µmol/L.

CORRELATION

Les résultats obtenus par la méthode décrite dans cette procédure ont été comparés à ceux obtenus avec ceux provenant de la méthode hospitalière de référence sur quatre séries de 56 patients au total. Cette comparaison a été évaluée via une droite de régression linéaire dont l'équation est $y = 1.1098x - 11.852$ et le coefficient de corrélation est 0.9338.

LINEARITE

Les concentrations mesurées par ce kit sont proportionnelles aux Densités Optiques mesurées lorsqu'elles sont comprises entre 10 et 200 µmol/L.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES



Date d'expiration



Référence



Numéro de Lot



A conserver entre 2 et 8°C



BIOSENTEC
65 Allée Campferran
31320 Auzeville- Tolosane



IN VITRO DIAGNOSTIC