Version Prétraitement Point Redox

POINT REDOX
β-Hydroxybutyrate et Acétoacétate

REF 067 – Kit de dosage des corps cétoniques
40 mesures de chaque

CE IVD

UTILISATION PREVUE

Le Kit de dosage des corps cétoniques **Biosentec** est utilisé afin de déterminer la concentration des corps cétoniques (acétoacétate et ß-hydroxybutyrate) d'un échantillon sanguin (voir paragraphe « Echantillon »). Grâce au nouveau protocole de pré-traitement commun, le lactate, le pyruvate, l'acétoacétate ainsi que le β-hydroxybutyrate peuvent être mesurés sur un seul et même échantillon. Les réactifs inclus dans ce kit peuvent être utilisés manuellement, cependant ils ont été testés dans le cadre d'une automatisation sur un analyseur séquentiel MINDRAY BS-480 (voir la fiche technique du set de solutions titrées BIOSENTEC « Point Redox » pour plus de détails).

RESUME

Les corps cétoniques (acétoacétate et ß-hydroxybutyrate) sont dosés grâce à l'action d'une enzyme l'hydroxybutyrate déshydrogénase (HBDH) :

$$\text{ß-hydroxybutyrate} + NAD^+ \xleftrightarrow{HBDH} \text{acétoacétate} + NADH + H^+$$

A pH alcalin, la quantité de NADH formé est proportionnelle à la quantité de ß-hydroxybutyrate initialement présente dans l'échantillon. A pH neutre, la quantité de NADH est dégradée de façon proportionnelle à la quantité d'acétoacétate initialement présente dans l'échantillon.

REACTIFS

REACTIF N°1	Tampon	pH 9.5	30 mL
REACTIF N°2	NAD	50mmol/L	3 mL
REACTIF N°3	HBDH	>60U/mL	6 mL
REACTIF N°4	Tampon	pH 7	30 mL
REACTIF N°5	NADH	50mmol/L	3 mL
SOLUTION CONTROLE HAUT	ß-hydroxybutyrate	voir étiquette	3 mL
SOLUTION CONTROLE NORMAL	ß-hydroxybutyrate	voir étiquette	3 mL
SOLUTION CONTROLE HAUT	Acétoacétate	voir étiquette	3 mL
SOLUTION CONTROLE NORMAL	Acétoacétate	voir étiquette	3 mL
PREPARATION CONTROLE ACETOACETATE	Tampon de préparation		6 mL

VALEURS USUELLES

Les valeurs de références varient en fonction de l'âge, du régime et du statut alimentaire (se rapporter à la littérature[1]).
Par ailleurs, 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.

MATERIEL

MATERIEL FOURNI

Voir la partie REACTIFS.

MATERIEL REQUIS

- Matériel prétraitement : Centrifugeuse réfrigérée. Tubes héparinés.
- Matériel dosage : 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 ($HClO_4$) 1 M
- Tri-potassium phosphate (K_3PO_4) à 2M
- H_2O distillée

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 dosage doit être effectué sur un échantillon de sang total déprotéinisé avec de l'acide perchlorique puis neutralisé avec du tripotassium phosphate. Le facteur de dilution correspondant au prétraitement est égal à 2,3.

Le prélèvement de sang total doit être réalisé sur tube hépariné et ne doit pas être hémolysé. Afin d'éviter sa dégradation, l'échantillon doit être déprotéinisé immédiatement (<5 min). 2mL de sang total permettent de réaliser les 4 analyses du point redox en manuel. Sur automate, 0,5 mL seulement sont nécessaires (même procédure en conservant les ratios).

Déprotéinisation :

- Mélanger 2mL de sang total + 2mL d'acide perchlorique 1M (préalablement réfrigéré à 4°C).
- Agiter énergiquement (ou vortexer) pendant 15 secondes pour obtenir un coagulum marron.
- Si la neutralisation et le dosage ne sont pas réalisés immédiatement, conserver le tube congelé à -20°C pendant 5 jours maximum.

Neutralisation :

- Après décongélation, centrifuger 10 minutes à 3 000 x g et à 4 °C
- Si le surnageant n'est pas limpide et incolore, centrifuger à nouveau.
- Mélanger 1,5mL de surnageant pour 0,225mL de K_3PO_4 2M (préalablement réfrigéré à 4°C).
- Vortexer et centrifuger 5 minutes à 3 000 x g et à 4°C.
- Doser le surnageant immédiatement selon la procédure d'essai ci-dessous.

CONTROLE QUALITE

Les réactifs du kit de dosage des corps cétoniques doivent être validés par le dosage des contrôles inclus dans le kit.

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**.

Les contrôles **Acétoacétate** sont à préparer de la manière suivante :

- Mélanger : 1 volume contrôle Acétoacétate + 1 volume Tampon préparation contrôle acétoacétate
- Laisser reposer 20 min à température ambiante (1 heure maximum)
- Diluer au 10 ième avec de l'eau distillée pour obtenir le contrôle Acétoacétate (à utiliser dans l'heure)

Les contrôles **ß-hydroxybutyrate** sont prêts à l'emploi.

PROCEDURE sur automate

Pour une utilisation sur analyseur séquentiel, un set d'automatisation β-hydroxybutyrate/Acétoacétate (réf #115) est nécessaire.
Celui-ci permet l'adaptation de ce kit sur analyseur séquentiel. Ce set comprend des solutions titrées permettant de réaliser dix calibrations ainsi que des tampons de dilution facilitant l'usage des kits sur automate.
Veuillez-vous reporter à la notice du set #115.

PROCEDURE en manuel

PROCEDURE POUR LE DOSAGE DU ß-HYDROXYBUTYRATE

Etape	Action		
1	*Pipeter dans les cuvettes :*		
	Réactifs	**Blanc**	**Echantillon**
	Réactif N°1	0,65mL	0,65mL
	Réactif N°2	0,075mL	0,075mL
	Echantillon	-	0,2mL
	Eau distillée	0,2mL	-
2	*Mélanger et mesurer l'absorbance : DO initiale*		
3	*Pipeter dans les cuvettes* :		
	Réactif N°3	0,075mL	0,075mL
4	*Mélanger et mesurer l'absorbance après 10 minutes : DO finale*		

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer la concentration en ß-hydroxybutyrate de l'échantillon.

PROCEDURE POUR LE DOSAGE DE L'ACETOACETATE

Etape	Action		
1	*Pipeter dans les cuvettes :*		
	Réactifs	**Blanc**	**Echantillon**
	Réactif N°4	0,65mL	0,65mL
	Réactif N°5	0,075mL	0,075mL
	Echantillon	-	0,2mL
	Eau distillée	0,2mL	-
2	*Mélanger et mesurer l'absorbance : DO initiale*		
3	*Pipeter dans les cuvettes* :		
	Réactif N°3	0,075mL	0,075mL
4	*Mélanger et mesurer l'absorbance après 10 minutes : DO finale*		

Merci de vous référer à la partie CALCULS pour déterminer la concentration en acétoacétate de l'échantillon.

CALCULS

1) La concentration de l'échantillon en **ß-hydroxybutyrate** est directement proportionnelle au delta de DO :

ΔDO = [DO finale – DO initiale] échantillon – [DO finale – DO initiale] blanc

La concentration en **Hydroxybutyrate** est calculée par l'équation suivante :

$$C = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times 1000 \times \Delta DO \times FD \quad (\mu mol / L)$$

V = Volume total du mélange réactionnel (1mL)
ε = Coefficient d'extinction molaire du NADH (6,220 L x $mmol^{-1}$ x cm^{-1})
l = Longueur du trajet optique (1cm)
v = Volume d'échantillon (0,2mL)
FD = Facteur de dilution due à la procédure de déprotéinisation/neutralisation et de mesure (2,3)

Soit dans les conditions de l'analyse décrite dans cette notice :

C = 1849 x ΔDO (µmol/L de ß-hydroxybutyrate dans l'échantillon)

2) La concentration de l'échantillon en **acétoacétate** est directement proportionnelle au delta de DO :

ΔDO = [DO initiale – DO finale] échantillon – [DO initiale – DO finale] blanc

La concentration en **Acétoacétate** est calculée par l'équation suivante :

$$C = \frac{V}{\varepsilon \times l \times v} \times 1000 \times \Delta DO \times FD \times P \qquad (\mu mol / L)$$

V	=	Volume total du mélange réactionnel (1mL)
ε	=	Coefficient d'extinction molaire du NADH (6,220 L x $mmol^{-1}$ x cm^{-1})
l	=	Longueur du trajet optique (1cm)
v	=	Volume d'échantillon (0,2mL)
FD	=	Facteur de dilution due à la procédure de déprotéinisation/neutralisation et de mesure (2,3)
P	=	Pureté des produits utilisés (1,200)

Soit dans les conditions de l'analyse décrite dans cette notice :

C = 2219 x ΔDO (µmol/L d'acétoacétate dans l'échantillon)

EXEMPLE
Pour un ΔDO = 0,601 la concentration en ß-hydroxybutyrate est de 0,601 x 1849 = 1111,25 µmol/L.
Pour un ΔDO = 0,132 la concentration en acétoacétate est de 0,132 x 2219 = 292,91 µmol/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 limité 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 (solution de ß-hydroxybutyrate / acétoacétate à 100 µmol/L) ont été réalisées. La concentration moyenne de ces analyses a été déterminée à 104 et 97 µmol/L respectivement avec un coefficient de variation de 3,3 et de 5,4 %.

SENSIBILITE
L'estimation de la limite de détection est réalisée sur une série de 10 blancs. Elle est évaluée à 6 µmol/L pour le ß-hydroxybutyrate et 8 µmol/L pour l'acétoacétate.

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 une même série de 20 patients. Cette comparaison a été évaluée via une droite de régression linéaire dont l'équation est y = 0,9867 x + 1,0325 pour le ß-hydroxybutyrate et 0,9865 x + 0,927 pour l'acétoacétate. Le coefficient de corrélation est de 0,9973 pour le ß-hydroxybutyrate et de 0,9968 pour l'acétoacétate.

LINEARITE
Les concentrations mesurées par ce kit sont proportionnelles aux Densités Optiques mesurées lorsqu'elles sont comprises entre 20 et 2000µmol/L pour le ß-hydroxybutyrate et entre 30 et 1000µmol/L pour l'acétoacétate.

BIBLIOGRAPHIE

1- Vassault A. (2008) Lactate, Pyruvate, Acetoacetate and 3-Hydroxybutyrate. In : Blau N., Duran M., Gibson K. (eds) Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics. Springer, Berlin, Heidelberg
2- S. Gibbard, P.J. WatkinsA micro-method for the enzymatic determination of D-beta-hydroxybutyrate and acetoacetate. Clin. Chim. Acta, 19 (1968), pp. 511-521

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

EXP *Date d'expiration*

REF *Référence*

LOT *Numéro de Lot*

2°C 8°C *A conserver entre 2 et 8°C*

BIOSENTEC
48 chemin des Palanques Sud
31120 Portet sur Garonne

CE

IVD *IN VITRO DIAGNOSTIC*