

KIT DE DOSAGE DES CORPS CETONIQUES β -Hydroxybutyrate et Acétoacétate

REF 067

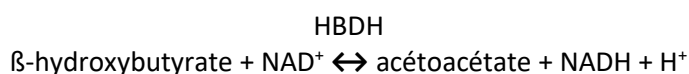


UTILISATION PREVUE

Le Kit de dosage des corps cétoniques **Biosentec** est utilisé afin de déterminer la concentration des corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) d'un échantillon sanguin (voir paragraphe « Echantillon »). Les corps cétoniques sont trois produits chimiques issus du catabolisme incomplet des acides gras dans les mitochondries des cellules hépatiques lorsque l'organisme ne peut puiser dans ses réserves de glucose comme source d'énergie. Les hyperproductions se rencontrent par exemple au cours de diabètes insulino-dépendants, d'acidémies organiques, d'hyperlactacidémies congénitales, de déficits de la néoglycogénèse ou de déficit en glycérol kinase.

RESUME

Les corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) sont dosés grâce à l'action de l'hydroxybutyrate déshydrogénase (HBDH) :



A pH alcalin, la quantité de NADH formé est proportionnelle à la quantité de β -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	>40mmol/L	3 mL
REACTIF N°3	HBDH	>60U/mL	6 mL
REACTIF N°4	Tampon	pH 7	30 mL
REACTIF N°5	NADH	>3.5mmol/L	3 mL
SOLUTION CONTROLE HAUT	β -hydroxybutyrate	voir étiquette	3 mL
SOLUTION CONTROLE NORMAL	β -hydroxybutyrate	voir étiquette	3 mL
SET DE CONTROLES	acétoacétate	voir étiquette	250 mg

VALEURS USUELLES

25 à 70 μ mol/L de β -hydroxybutyrate dans le sang veineux à jeun

18 à 76 μ mol/L d'acétoacétate dans le sang veineux à jeun

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.

Le flacon de Acétoacétate est à conserver au congélateur à -20°C jusqu'à la date de péremption du kit. Merci de vous référer à la procédure de manipulation des produits congelés en vigueur dans l'établissement.

Dès la première ouverture, réaliser des aliquotes du contenu du flacon (voir la partie PROCEDURE-Contrôle Qualité). Les solutions diluées préparées lors du contrôle qualité sont stables 6 heures conservées à 4°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.

Deux types de traitement de l'échantillon sont proposés :

Le dosage peut être effectué sur du sang total déprotéinisé avec de l'acide perchlorique 1M comme suit :

- Mélanger un volume de sang pour un volume 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
- Laisser décanter
- Doser le surnageant immédiatement selon la procédure d'essai ci-dessous

Le dosage peut être effectué sur du plasma fluoré non-déprotéinisé. Ces plasmas sont à congeler immédiatement après préparation. Le jour du dosage, les échantillons sont décongelés à 4°C et à doser immédiatement.

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. Des pipettes permettant de prélever des volumes précis. Des fioles jaugées.
- H₂O distillée

PROCEDURE POUR LE DOSAGE DU β -hydroxybutyrate

Etape	Action		
1	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>		
	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	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance : DO initiale</i>		
3	<i>Pipeter dans les cuvettes :</i>		
	Réactif N°3	0,075mL	0,075mL
4	<i>Mélanger et mesurer l'absorbance après 10 minutes : DO finale</i>		

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

PROCEDURE POUR LE DOSAGE DE L'acétoacétate

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.

CONTROLE QUALITE

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

Attention, ces contrôles doivent être déprotéinés (le cas échéant) comme des échantillons avant utilisation.

Les contrôles β -hydroxybutyrate sont en solution, prêts à être déprotéinés.

Les contrôles Acétoacétate sont à préparer, puis à déprotéiniser :

Action		Concentration
Peser précisément 54 mg de poudre, et la dissoudre dans 50 ml d'eau avec l'utilisation d'une fiole jaugée		solution mère : 10 000 $\mu\text{mol/L}$
Dilution au 50 ^{ième}	1 ml de la solution mère dans 50 ml d'eau (fiole jaugée)	solution d'acétoacétate à 200 $\mu\text{mol/L}$ +/- 20 $\mu\text{mol/L}$
Dilution au 200 ^{ième}	1 ml de la solution mère dans 200 ml d'eau (fiole jaugée)	solution d'acétoacétate à 50 $\mu\text{mol/L}$ +/- 10 $\mu\text{mol/L}$
Ces solutions contrôle diluées sont à déprotéiniser (voir la partie ECHANTILLONS)		

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

CALCULS

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

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

La concentration est calculée par l'équation suivante :

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

- 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 si sang total déprotéinisé (2)

Soit dans les conditions de l'analyse :

$$C = 804 \times \Delta DO \times FD \quad (\mu\text{mol/L de } \beta\text{-hydroxybutyrate dans l'échantillon})$$

- 2) La concentration de l'échantillon en **acétoacétate** est directement proportionnelle au delta de DO :
 $\Delta DO = [DO \text{ finale} - DO \text{ initiale}] \text{ échantillon} - [DO \text{ finale} - DO \text{ initiale}] \text{ blanc}$

La concentration est calculée par l'équation suivante :

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

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 si sang total déprotéinisé (2)
P	=	Pureté de la poudre utilisée (tient compte de la teneur en eau et en Lithium) (1,200)

Soit dans les conditions de l'analyse :

$$C = 965 \times \Delta DO \times FD \quad (\mu\text{mol/L d'acétoacétate dans l'échantillon})$$

EXEMPLE

Pour un $\Delta DO = 0,601$ la concentration en β -hydroxybutyrate est de $0,601 \times 1608 = 966,3 \mu\text{mol/L}$.

Pour un $\Delta DO = 0,132$ la concentration en acétoacétate est de $0,132 \times 1930 = 77,2 \mu\text{mol/L}$.

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 (solution de β -hydroxybutyrate / acétoacétate à $100 \mu\text{mol/L}$) ont été réalisées. La concentration moyenne de ces analyses a été déterminée à 104 et $97 \mu\text{mol/L}$ 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 $6 \mu\text{mol/L}$ pour le β -hydroxybutyrate et $8 \mu\text{mol/L}$ 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 β -hydroxybutyrate et $0,9865 x + 0,927$ pour l'acétoacétate. Le coefficient de corrélation est de $0,9973$ pour le β -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 $2000 \mu\text{mol/L}$ pour le β -hydroxybutyrate et entre 30 et $1000 \mu\text{mol/L}$ pour l'acétoacétate.

INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES



Date d'expiration



Référence



Numéro de Lot



A conserver entre 2 et 8°C



BIOSENTEC
65 Allées Campferan
31320 Auzeville- Tolosane



IN VITRO DIAGNOSTIC