

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les deux adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

LA DÉTERMINATION DU GLUCOSE DANS LES MATÉRIAUX BIOLOGIQUES

Le dosage du glucose est probablement le plus demandé détermination au laboratoire clinique. Relatif à cette réalité et sur l'amélioration permanente des paramètres pour la détermination, ont été développés au fil du temps une variété de méthodes.

Une classe de méthodes utilise pour la détermination les propriétés non spécifiques du glucose. Il s'agit notamment de la propriété du groupe carbonyle du glucose de réduire, dans des conditions données, les sels cuivriques aux sels cuivreux et des ions ferricyanure aux ions ferrocyanure ; aussi, la possibilité du groupe aldéhyde de condensation avec des amines aromatiques (o-toluidine, sulfanilamide, l'aniline, etc.) en formant de composés colorés.

Cette catégorie de méthodes est appliquée dans une variété de façons, y compris le dosage du glucose dans l'urine.

Les inconvénients des méthodes chimiques sont éliminés par des procédés enzymatiques qui utilisent des enzymes comme réactifs (par exemple la glucose oxydase, l'hexokinase, la glucose-déshydrogénase).

Les enzymes agissent spécifiquement sur le substrat, de sorte qu'il n'existe pas des phénomènes d'interférence. Aussi, les vitesses de réactions sont très rapides et sans la production des composées secondaires.

A. Détermination du glucose par des méthodes non spécifiques

Détermination du glucose avec l'o-toluidine

Principe

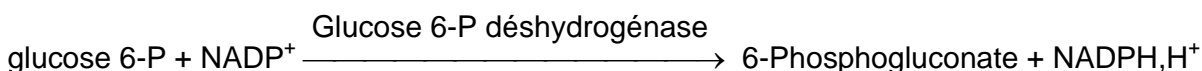
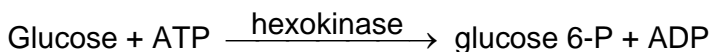
En milieu acétique, en présence de la thiourée, à chaud, glucose se condense avec l'o-toluidine pour former un composé verte, qui a une absorption de lumière, mesurée à 630 nm, qui augmente proportionnellement à la glycémie.

B. Méthodes enzymatiques

Méthode enzymatique basée sur l'action de l'hexokinase et de glucose-6-phosphate déshydrogénase

Principe

Le glucose est phosphorylé par l'action de l'hexokinase en formant l'ester glucose-6-phosphate. Ce composé est déshydrogéné par l'action du glucose 6-phosphate déshydrogénase (NADP^+ dépendante). Le NADPH résulté dans la réaction est mesurée à 340 nm, la concentration étant en rapport stoechiométrique avec le glucose.



Est une méthode spécifique pour le glucose. L'erreur est extrêmement réduite parce qu'il y a une certaine quantité de glucose 6-phosphate dans les érythrocytes, qui est mesurée lorsque la détermination est effectuée sur du sang total, mais il peut changer le résultat de près de 1,5% mg. Plasma (et le sérum) ne contient pas de glucose 6-phosphate.

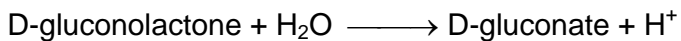
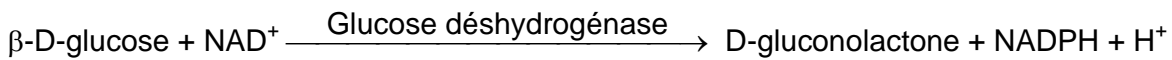
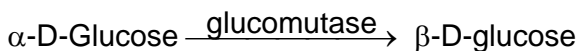
Possibilités d'erreur

Les enzymes sont impures, ce qui peut conduire soit à des résultats plus élevés ou aux résultats inférieurs à ceux réelles. L'acide trichloracétique inhibe la glucose 6-phosphate déshydrogénase, c'est pourquoi d'autres techniques de déprotéinisation sont utilisées (par exemple avec l'acide perchlorique)

Technique enzymatique avec glucose déshydrogénase

Principe

Sous l'action du glucose déshydrogénase, le glucose se transforme en gluconolactone, en conduisant à la formation de NADH (forme réduite). Parce que la glucose déshydrogénase agit uniquement sur β -D-glucose, dans la réaction on introduit une enzyme supplémentaire qui accélère la conversion de α -D-glucose à l'isomère bêta (mutarotase). Parce que gluconolactone se transforme spontanément en présence d'eau en acide gluconique, le gluconolactone est éliminé constamment de la réaction, alors qu'il ne perturbe pas l'équilibre réactionnel, et la conversion du glucose est directement proportionnelle à son concentration dans l'échantillon.



La méthode est très spécifique, dans le sang il n'y a aucune substance interférente à la réaction.

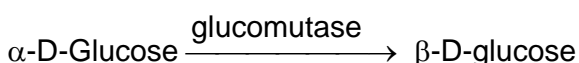
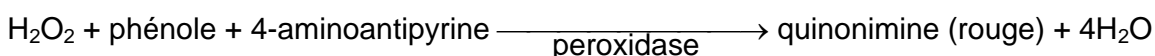
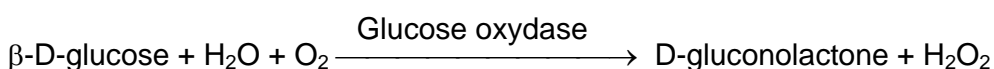
Application pratique

La technique enzymatique avec glucose oxydase

Principe

Sous l'action du glucose oxydase, le glucose est converti en D-gluconolactone, en formant une quantité stoechiométrique de peroxyde d'hydrogène. Ceci est converti, en présence de phénol et de la 4-aminoantipyrine et sous l'action de la peroxydase, dans un composé de couleur rouge (quinonimine), dont l'absorption de la lumière est mesurée à une longueur d'onde entre 470 et 550 nm.

En plasma, le rapport de β -D-glucose et α -D-glucose est de 2 : 1. Que l' β -D-glucose est consommé dans la réaction, α -D-glucose est converti en forme bêta, de sorte que toute la quantité de glucose dans le sang va être déterminée par ce procédé.



La glucose oxydase agit aussi sur le 2-deoxyglucose, le mannose, les dérivés méthylés ou fluorés du glucose, mais ils n'apparaissent pas dans le sang; la méthode peut être considérée comme méthode très spécifique.

Réactifs

1. Réactif de travail: contenant tampon phosphate 0,5 mol/l, pH 7,50, phénol 7,5 mmol/l de glucose oxydase 12 000 U / l, peroxydase 660 U / l, 4-aminoantipyrine 0,4 mmol/l.
Le réactif est stable pendant 3 mois à 2-8°C ou 3 semaines à 20 à 25°C.
2. Glucose étalon (standard): contenant glucose 100 mg% (5,55 mmol/l).

Mode opératoire

Introduisez dans 3 tubes à essais (120/12 mm):

Réactifs (µl)	Ech (Echantillon)	(ET) Etalon	T (Témoin)
Réactif de travail	1000	1000	1000
Sérum (dilué 1/10)	100	-	-
Etalon (dilué 1/10)	-	100	-
Eau distillée	-	-	100

Incubez les tubes 15 minutes à 37°C ou 30 minutes à 25°C. Mesurez l'absorption de rayonnement de l'étalon et de probe à 546 nm. La couleur est stable pendant 60 minutes et la réponse est linéaire jusqu'à une concentration de glucose sanguin de 400 mg% (22,2 mmol / l). A des valeurs plus élevées, diluez la probe au 1:2 et multipliez le résultat par 2.

Calcul

$$\text{mg glucose/100 ml} = A_{\text{Ech}}/A_{\text{Et}} \times 100$$

Valeurs normale

Sérum, plasma: 75 - 115 mg/100 ml (4,16 - 6,38 mmol/l)

LCR: 50 - 70 mg/100 ml (2,78 - 3,89 mmol/l)

Sources d'erreurs

- La méthode est interférée par de concentrations d'hémoglobine de plus de 4 g/l, bilirubine de 200 mg/l, créatine (100 mg/l), galactose 1 g/l d'EDTA et 2 g/l
- La déprotéinisation du sang avec de l'acide trichloracétique ou perchlorique peut causer la lyse des érythrocytes, avec la libération subséquente de glutathion. Ceci va réagir avec une partie du peroxyde d'hydrogène formé dans la réaction, il y a donc un risque de faux résultats (inférieurs à la réalité). Il est recommandé la déprotéinisation avec l'acétate d'uranyle isotonique, qui préserve l'intégrité des globules rouges.
- Des résultats inférieurs sont obtenus dans le cas de concentrations élevées supérieures à 5 mg% de vitamine C, qui consomme également du peroxyde d'hydrogène. De telles concentrations apparaissent après injection intraveineuse de vitamine C (après administration par voie orale n'ont pas été observés ces erreurs).

Valeurs pathologiques

Hyperglycémies: diabète sucré, syndrome de Cushing (excès de glucocorticoïdes), l'acromégalie (excès de l'hormone de croissance), phéochromocytome (excès de catécholamines), hyperthyroïdie sévère, stress, choc, pancréatite, cancer du pancréas, pancréatectomie.

Hypoglycémies: surdosage d'insuline, l'ingestion de grandes quantités d'alcool, gastrectomie, tumeurs pancréatiques insulino-sécrétrices (insulinome).

Détermination du glucose dans l'urine

Dans l'urine normale sont de très petites quantités de glucose, l'élimination urinaire ne dépassant pas 350-500 milligramme/24 heures.

Les glycosuries se produisent généralement que dans des cas d'hyperglycémie avec des valeurs au-dessus du seuil de l'élimination rénale de glucose (glycémie dépasse 170-180 mg/100 ml).

Notez que la glycosurie n'est pas toujours anormale, mais peut se produire:

- Après l'ingestion de grandes quantités de glucose,
- Après un stress émotionnel.

En principe, la détermination du glucose dans l'urine se fait semblable à la détermination de sérum (voir ci-dessus), en précisant que lorsque l'urine contient des de glucose, on fait de dilutions et le résultat est multiplié par le facteur de dilution et est rapporté par litre d'urine ou, éventuellement, au volume total d'urine (litres) excrétée dans 24 heures.