

T.P. 2. DÉTERMINATION DE LA CRÉATININE SÉRIQUE ET URINAIRE

Introduction

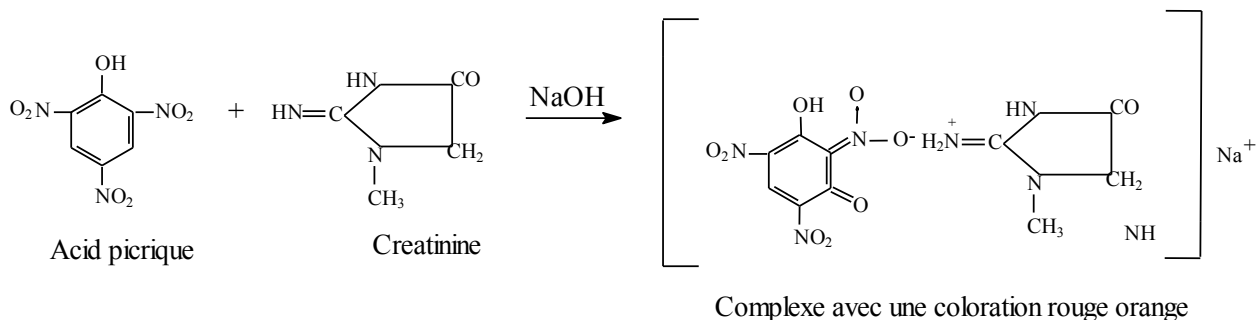
La créatinine provient de la conversion par déshydratation de la créatine (est l'anhydride de la créatine). La créatinine est excrétée dans l'urine et la détermination de la créatinine sérique et urinaire est d'une importance particulière dans la pratique médicale pour l'étude de la fonction rénale. Parce qu'il est entièrement produit dans les muscles, la quantité de la créatinine formée est proportionnelle à la masse musculaire.

Partie expérimentale

A. La méthode Jaffe (variante Popper – Mandel - Mayer)

Principe

La créatinine dans l'échantillon biologique réagit, en milieu alcalin, avec de l'acide picrique pour former un complexe de picrate de créatinine, de couleur rouge-orange, avec une absorption maximale à 520 nm, proportionnels à la quantité de créatinine dans l'échantillon.



C'est une méthode très simple, mais elle a le désavantage d'interférence avec de nombreuses substances: l'acide ascorbique, le pyruvate, l'acétone, l'acide acétoacétate, le glucose, l'acide urique, les protéines, les antibiotiques, le lévulose (fructose).

Ces substances, appelées chromogènes non-créatininiques, peuvent conduire, en cas de leur présence dans le sérum, à une augmentation de plus de 20%. Ces chromogènes non-créatininiques n'influencent pas la détermination de la créatinine dans les urines.

On a développé des variantes de la réaction de Jaffe en vue d'éliminer ces interférences (variantes cinétiques - la vitesse de réaction de la créatinine est supérieure à celle des chromogènes).

La version ci-dessous utilise de l'acide picrique à la fois pour la précipitation des protéines et comme réactif de couleur.

Réactifs

1. solution d'acide picrique 1,2%
2. solution d'hydroxyde de sodium 10%
3. solution étalon de créatinine 2 mg/100 ml dans 0,1 N HCl

Mode opératoire

Dilution de l'urine de 24 heures: 1:100 avec de l'eau distillée (0,1 ml d'urine de 24 heures + 9,9 ml d'eau distillée)

Déprotéinisation: pipetez dans deux tubes de centrifuge:

Réactifs, ml	Probe sérum	Probe urine
Sérum	1	-
Urine de 24 heures, dilution 1:100	-	1
Acide picrique	3	3

Agitez et laissez reposer 10 minutes, puis centrifugez 10 minutes à 3000 rpm.

Réaction de couleur: pipettez dans quatre tubes:

Réactifs, ml	Probe sérum	Probe urine	Etalon	Témoin
Surnageant Ps	2	-	-	-
Surnageant Pu	-	2	-	-
Etalon	-	-	0,50	-
Eau distillée	-	-	-	0,50
Acide picrique	-	-	1,50	1,50
NaOH	0,10	0,10	0,10	0,10

Agitez et laissez reposer 20 minutes et puis mesurez les absorptions de Ps, Pu et de l'étalon à 530 nm, en équilibrant le spectrophotomètre avec le témoin.

Calcul

Dans le sérum:

$$\text{mg créatinine /100 ml de sérum} = (A_{PS} / A_E) \times 2$$

Dans l'urine:

$$\text{g de créatinine / 24 heures} = (A_{PU} / A_E) \times 2 \times \text{le volume d'urine (L) par 24 heures}$$

Valeurs normales:

Sérum: 0,4 - 1,5 mg/dl

Urine: 1 - 1,8 g/24 heures

Valeurs pathologiques

La créatinine augmente dans la **maladie rénale aiguë et chronique**, les maladies consomptibles graves, les maladies affectant les muscles (myasthénie, dystrophie musculaire progressive).

Parce que la créatininémie dépende seulement de la masse musculaire et de son élimination par filtration glomérulaire, le dosage de la créatinine dans le sérum et l'urine et le calcul de la clairance de la créatinine endogène sont des méthodes pour évaluer la fonction rénale. La clairance est exprimée par le volume de plasma filtré par les reins dans une minute.

Calcul de la clairance de la créatinine endogène

$$\text{Clairance de la créatinine (ml / min)} = (U \times V) / (P \times 1440)$$

U = concentration de créatinine dans l'urine de 24 heures (mg/ml)

V = volume d'urine (ml) par 24 heures

P = concentration sériques de créatinine (mg/ml)
1440 = nombre de minutes dans les 24 heures

Valeurs normales: 95-150 ml / min

Valeurs pathologiques: dans les néphropathies aiguës et chroniques, la clairance de la créatinine diminue avant l'augmentation de la créatininémie (créatinine sérique).

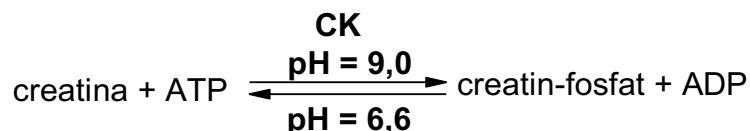
DÉTERMINATION DE LA CRÉATINE KINASE SÉRIQUE

Introduction

Après la nécrose myocardique, des nombreuses enzymes de cytolysse et aussi la myoglobine, des fragments de myosine, oligo-éléments, etc. sont libérés par les cellules et peuvent être isolés de sérum. Parmi eux, la créatine kinase (CK) et la lactate déshydrogénase (LDH), avec leurs isoenzymes, ont actuellement une utilisation clinique et, dans la mesure où les premières ne sont pas disponibles, on détermine la transaminase GOT et la myoglobine sérique.

La créatine kinase (CK) avec sa isoenzyme MB sont actuellement les plus utilisés marqueurs sériques de la nécrose myocardique dans la pratique clinique. L'augmentation de l'enzyme après l'installation de l'infarctus myocardique est rapide et la quantité d'enzyme libérée est proportionnelle à la dimension de la nécrose. L'utilisation de la CK dans l'évaluation de la nécrose myocardique aiguë est limitée par deux problèmes: le manque relatif de spécificité pour la nécrose du myocarde et les difficultés à quantifier la nécrose en cas de reperfusion myocardique. L'utilisation à la place de CK de son isoenzyme CK-MB est plus spécifique au niveau du myocarde et, normalement, résout ce problème.

La créatine kinase, CK (adénosine triphosphate créatine-N phospho-transférase, creatinphosphoryl transférase) de poids moléculaire 78500 à 85100 Da, catalyse la réaction:



La microéthérogénité de l'enzyme a été détectée par électrophorèse des enzymes musculaires purifiée, à partir de préparations de muscle cardiaque et le cerveau. L'enzyme a une structure dimère, résultant de la combinaison de deux composants, M (composante musculaire) et B (composante du cerveau).

L'enzyme a trois isoenzymes dont la structure est BB (isoenzyme du cerveau), MB (isoenzyme dans le muscle cardiaque) et MM (isoenzyme principale du muscle squelettique). Les isoformes CK sont des souformes des isoenzymes CK qui diffèrent dans leurs points isoélectriques. Jusqu'à présent, trois isoformes de CK-MM et de CK-MB ont été identifiées, mais seulement les isoformes MM ont pu être dosés reproductiblement.

L'enzyme sérique augmente après 4 à 8 heures suivant l'apparition de la nécrose, et atteint un maximum à 24-36 heures et revient à la normale dans 3-5 jours. Une détermination toutes les 12 heures, pendant deux jours et puis quotidiennement jusqu'à la normalisation, est suffisant pour une estimation significative de la dimension de la nécrose dans de nombreux cas.

Dans le myocarde, la proportion des isoenzymes CK est de 80% pour MM et 20% pour la MB. Lorsque la nécrose, dans le sang ne sera délivrée que la isoforme MM₃ qui est dégradée dans le plasma à une vitesse constante, dans les isoformes MM₂ et MM₁. Le rapport MM₃/MM₁ peut ainsi identifier le moment exact du début de la nécrose. En outre,

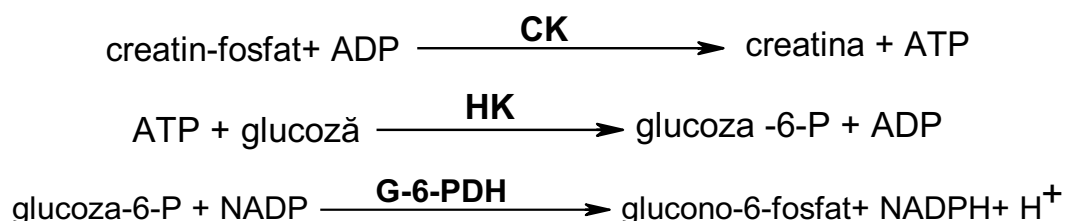
s'il existe de reperfusion, le profil de distribution des isoformes change brusquement avec une proportion croissante de MM₃. Dans le sérum, normalement, l'activité de CK-MB n'est que de 5% de l'activité CK totale de sorte qu'une augmentation de la CK-MB attire l'attention sur une lésion du myocarde.

Partie expérimentale

A. Détermination de la CK totale

Principe

La créatine kinase est rapidement inactivée par l'oxydation des groupements sulfhydryles dans le centre actif de la molécule. L'enzyme peut être réactivé par l'ajout de l'acétyl-cystéine et on fait une détermination cinétique de l'activité enzymatique de la créatine kinase réactivée par N-acétylcystéine, sur la base des réactions enzymatiques suivantes:



On mesure la variation de l'absorbance à 340 nm, dans un intervalle de temps et on calcule l'activité enzymatique. L'interférence de l'adénylate kinase est éliminée en ajoutant diadénosine 5-phosphate et AMP.

Réactifs

Réactifs du Kit Fluitest CK- NAc, Biocon:

1. **Réactif R₁ (solution tampon):** tampon imidazole 100 mmoles/l, pH = 6,7; glucose 20 mmoles/l
2. **Réactif R₂ (réactif enzymatique):** ADP 5 mmoles/l, AMP 5 mmoles/l; Diadénosine -5P 10 µmoles/l; NADP 2 mmoles/l; Créatine phosphate 30 mmoles/l; Héxokinase (HK) 2500 U/l; G-6-P-DH 1500 U/l; N- acétyl-cystéine 20 mmoles/l
3. Sérum ou plasma héparinisé

Mode opératoire

Réactif de travail : au commencement de l'analyse, R1 et R2 sont mélangés dans un rapport volumétrique de 1: 4. Ce réactif ainsi obtenu est stable pendant 10 jours à 2-8°C.

On doit tenir compte du fait que 10% de l'activité enzymatique dans le sérum est perdu en gardant le sérum un jour à 2-8°C, ou plus d'une heure à 15-25°C.

Pipetez les réactifs dans des tubes de glace comme suivante:

Réactifs, µl	Volum
Réactif de travail	500
Probe de sérum dilué 1: 5	100

Mélangez et laissez à la température de la chambre pour deux minutes. Equilibrez le spectrophotomètre avec de l'air ou de l'eau à 340 nm. Lisez l'absorbance de la probe à 340 nm à l'intervalle de 3 minutes. Calculez ΔA/min.

Calcul

On utilise la relation suivante pour calculer l'activité de l'enzyme :

$$\text{UI/L créatine kinase} = (\Delta A/\text{min}) \times 4130 \times 5$$

- ou: - 5 = coefficient de dilution
- 4130 = dépend du coefficient d'extinction molaire

Valeurs normales

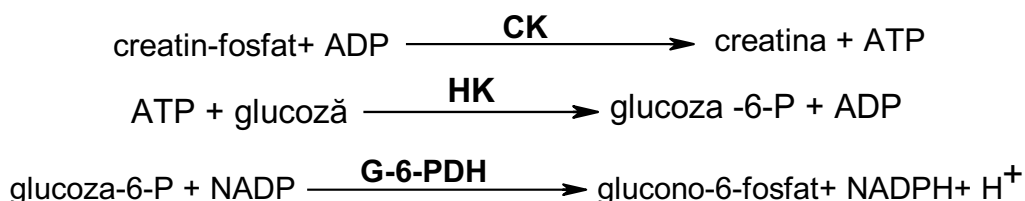
Pour les hommes < 80 U/l

Pour les femmes < 70 U/l

B. Détermination de la CK-MB sérique

Principe

La méthode de détermination de la CK totale, couramment utilisée en laboratoire, est une méthode de immunoinhibition qui est basée sur l'inactivation de la sous-unité M de l'enzyme en la liant aux anticorps anti-M, incorporés dans le réactif enzymatique, suivie par la détermination de l'activité de la sous-unité B résiduelle. La détermination de l'activité restante de sous-unité B est faite par la méthode du test optique :



L'activité CK-MB est déterminée en mesurant les changements d'absorbance à 340 nm, dans un intervalle de temps, et l'activité enzymatique est calculée sur la base de ce changement.

Réactifs

Réactifs du kit Biozyme CK-MB, Biocon:

- Réactif R₁ (solution tampon):** Tampon imidazole, pH = 6,7 - 100 mmoles/l; glucose 20 mmoles/l; acétate de magnésium 10 mmoles/l
- Réactif R₂ (réactif enzymatiques):** ADP 5 mmoles/l; AMP 5 mmoles/l; Diadénosine-5P 10 µmoles/l; NADP 2 mmoles/l; créatine phosphate 30 mmoles/l; Héxokinase (HK) 2500 U/l; G-6-P-DH 1500 U/l; N-acétyl cystéine 20 mmoles/l; anticorps de la CK-M - inhibe jusqu'à 2000 U/l CK-M
- Sérum dilué 1:5 avec de l'eau distillée

Mode opératoire

Réactif de travail : au commencement de l'analyse R1 et R2 sont mélangés dans un rapport volumétrique de 1: 4. Ce réactif ainsi obtenu est stable pendant 10 jours à 2-8°C.

On doit tenir compte du fait que 10% de l'activité enzymatique dans le sérum est perdu en gardant le sérum un jour à 2-8°C, ou plus d'une heure à 15-25°C.

Pipetez les réactifs dans des tubes comme suivante:

Réactifs, µl	Volum
Réactif de travail	500
Probe de sérum dilué 1: 5	100

Mélangez et laissez à la température de la chambre pour 5 minutes. Equilibrez le spectrophotomètre avec de l'air ou de l'eau à 340 nm. Lisez l'absorbance de la probe à 340 nm à l'intervalle de 5 minutes. Calculez $\Delta A/\text{min}$.

Avant de déterminer l'activité de la CK-MB est nécessaire de déterminer l'activité totale de CK avec la méthode de réactivation du NAc décrit ci-dessus. Si le total de l'activité des CK est supérieur à 1000 U/l, la probe de sérum doit être dilué avec une solution saline afin que son activité soit inférieure à 1000 U/l.

Calcul

L'activité enzymatique est calculée par la formule:

$$\text{UI/L creatine kinase} = \Delta A/\text{min} \times 825 \times 5 \times 2$$

Valeurs normales: < 10 U/l

La nécrose myocardique est indiquée lorsque les trois facteurs suivants sont présents:

Facteurs	Valeurs (25°C)
CK hommes	>80 U/l
CK femmes	>70 U/l
CK-MB	> 10 U/l
Activité de CK-MB entre 6%-25% de l'activité CK totale	

Modifications pathologiques:

Augmentations significatives: dans la crise cardiaque, la dermatomyosite, la dystrophie musculaire progressive, la rhabdomyolyse, la myoglobininurie.

Augmentations modérées: après injection intramusculaire et dans l'hypothyroïdie.

Parmi les facteurs possibles d'erreur dans la quantification enzymatique de la nécrose:

- Le degré de perfusion locale: la zone centrale de la nécrose, non-perfusée, ne libère pas l'enzyme de sorte que les nécroses massifs et compacts sont sous-estimés
- La vitesse de dégradation de l'enzyme dans les tissus nécrosés et en circulation
- La vitesse d'élimination rénale de l'enzyme
- L'apparition de la reperfusion du myocarde : le flux de reperfusion implique le mouvement de beaucoup d'enzymes, imitant une nécrose extensive, mais il réduit, d'autre part, par oxygénation, la masse de tissus nécrosé.

Parmi les conditions qui peuvent altérer la spécificité de la CK-MB pour infarctus aigu du myocarde et qui peuvent influencer le diagnostic on peut énumérer:

- Une augmentation de CK-MB dans d'autres cas de lyse des cardiomyocytes que l'infarctus du myocarde aigu, telles que la myocardite aiguë, la chirurgie cardiaque, traumatisme sur le cœur, le cathétérisme cardiaque, état de choc.
- Une augmentation modérée de CK-MB observée parfois après un exercice vigoureux, en particulier chez les athlètes.
- Des augmentations limitées, possibles de la CK-MB dans l'angine instable, dans l'absence d'une lyse claire des cardiomyocytes.