

Influence de l'utilisation d'un antiglycolytique et de la température de conservation sur la stabilité du dosage de la glycémie avant centrifugation

Fatou Diallo¹, Mariama Fall¹, Arame Ndiaye¹, Dominique Doupa², Alassane Diatta³,
Fatou Cissé¹, Abdourahmane Samba¹, Souleymane Thiam¹, Ndene Gaston Sarr¹,
Modou Jobe⁴, Niama Diop Sall¹, Meïssa Toure¹

¹Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'odontologie, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, ²UFR Santé, Université Gaston Berger de Saint de Louis, ³UFR Santé, Université El hadji Assane Seck de Ziguinchor, ⁴Service de cardiologie, CHU Aristide Le Dantec, Dakar, Sénégal

Corresponding author : Dr Fatou Diallo, Laboratoire de Biochimie- Biologie moléculaire, Faculté de Médecine, Université Cheikh Anta Diop de Dakar

Mail : fadiallo@hotmail.com, Tel : (221)772587299

Résumé

La glycémie est un des paramètres les plus couramment demandés en biochimie, elle permet de poser le diagnostic biologique du diabète. Son dosage est simple mais sa réalisation reste confrontée à des insuffisances survenant le plus souvent lors de la phase pré-analytique. La nature du tube et le délai d'acheminement du prélèvement parmi d'autres sont autant de facteurs qui pourraient impacter sur la qualité de nos résultats. Des prélèvements de 35 volontaires supposés sains ont été effectués par ponction veineuse après consentement éclairé.

Des aliquotes sur tube héparinate de lithium et sur tube oxalate de potassium avec fluorure de sodium ont été réalisées en double pour le dosage de la glycémie aux différents temps d'étude (t_0 , t_2 , t_4 et t_6) et conservées soit à température ambiante ou à 4°C. Les aliquotes pour t_0 ont été testées immédiatement. La détermination de la glycémie est réalisée sur l'analyseur A15 (BioSystems S.A.) ® par méthode enzymatique à la glucose oxydase.

Les délais avant centrifugation étaient significativement plus longs en présence d'antiglycolytique et/ou à 4°C.

La stabilité de la glycémie avant centrifugation est influencée par la présence d'antiglycolytique du tube de prélèvement et par la température de conservation.

Mots clés : Glycémie, antiglycolytique, fluorure de sodium, héparinate de lithium

Abstract

Blood glucose is one of the most requested tests in biochemistry, and it helps in making the laboratory diagnosis of diabetes. Its testing is easy but its determination still faces shortcomings occurring most often in the pre-analytical phase. The type of tube and the time before sample processing among others are all factors that could impact on the reliability of results. Samples of 35 apparently healthy volunteers were collected by venopuncture after an informed consent.

Aliquots in lithium-heparin tubes and potassium oxalate with sodium fluoride tubes were taken in duplicate for blood glucose determination at different times during the study (t_0 , t_2 , t_4 and t_6) and stored either at room temperature or at 4°C. Aliquots for t_0 were tested immediately. Blood glucose determination was carried out using an A15 analyzer (BioSystems SA) ® by enzymatic method with glucose oxidase.

The time before centrifugation was significantly longer in the presence of an antiglycolytic agent and/or at 4°C.

The stability of blood glucose before centrifugation was affected despite the presence antiglycolytic agent in the tube and by storage temperature.

Keywords: Blood glucose, antiglycolytic, sodium fluoride, lithium heparin



Introduction

Le diabète constitue un problème de santé publique majeur dans nos pays en développement et son diagnostic est clinique et biologique. Le diagnostic biologique repose sur la détermination de la glycémie (1). Cette dernière doit être fiable pour identifier les sujets dont la glycémie est proche des seuils décisionnels.

En effet, la glycolyse induite par les cellules sanguines se poursuit *in vitro* et abaisse rapidement la glycémie. D'où l'utilisation d'inhibiteurs de la glycolyse, les antiglycolytiques, supposés stabiliser ce paramètre dans le temps. Toutefois, l'emploi de ces derniers ne semble pas suffisant pour éviter une perte significative de glucose à court terme (3, 7).

Cette présente étude se propose d'évaluer la stabilité de la glycémie sur tube avec héparinate de lithium et sur tube avec oxalate de potassium associé à un antiglycolytique, le fluorure de sodium, à différentes températures. Les résultats attendus permettront d'améliorer significativement la qualité de nos conditions de travail.

Patients et Méthodes

Les prélèvements ont été effectués sur 35 volontaires apparemment sains après consentement éclairé. Quatre tubes de 4 mL ont été prélevés par sujet par ponction veineuse sur tubes avec héparinate de lithium (TH) (deux) et sur deux tubes associant à l'anticoagulant oxalate de potassium, un antiglycolytique, le fluorure de sodium (TF) BD Vacutainer™ (BD Diagnostic Systems). Les tubes conservés à la température ambiante ont été fractionnés en quatre aliquotes dont une aliquote de chaque tube servira à la détermination de la glycémie à (t_0). Par contre, les tubes conservés à 4°C seront fractionnés en trois aliquotes.

Toutes les aliquotes ont été centrifugées au préalable pendant 10mn à 1500g, pour servir à la détermination de la glycémie aux temps (t_0) juste après le prélèvement, au bout de deux heures (t_2), quatre heures (t_4), et six heures (t_6). Le dosage de la glycémie a été réalisé par méthode enzymatique à la glucose oxydase à l'aide de l'analyseur multiparamétrique A15 (BioSystems S.A.) ®.

Analyse statistique

L'étude statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R version 3.0.0 par régression linéaire simple et régression linéaire par morceau. Le calcul des différentes pentes a permis d'estimer le délai théorique entre le prélèvement et la centrifugation correspondant à une variation de 5% de la glycémie mais aussi de déterminer l'effet du froid sur cette variation de la glycémie. Seules les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme significatives.



Résultats

Les valeurs des glycémies obtenues en mmol/L sont regroupées dans les tableaux I et II. Les équations des droites de régression (figure 1 et 2) permettent de calculer le temps théorique au-delà duquel la glycémie varie de plus de 5 %. La valeur de 5 % a été fixée dans notre étude comme étant la variation limite pour des résultats de glycémie interprétables. Nos résultats montrent que la stabilité de la glycémie est meilleure lors de la conservation du tube TH à 4°C qu'à température ambiante. En effet, on note une diminution de la glycémie qui est constante pour les tubes TH durant toute la période de l'étude à raison de 0,4038 mmol/L/h soit 7,41 %/h à la température ambiante (figure 1) et une baisse modérée à 4°C à raison de 0,1043 mmol/L/h, soit 1,89 %/h (figure 2). Par contre, la baisse de la glycémie sur tubes TF est plus faible que sur tubes TH et se déroule en deux phases.

Durant les deux premières heures, à température ambiante comme à 4°C, la baisse se fait respectivement à raison de 0,133 mmol/L/h soit 2,46 %/h et de 0,0586 mmol/L/h soit 1,08%/h. Puis, cette décroissance est deux fois plus faible durant la deuxième phase de l'étude et se stabilise (figure 1 et 2).

Tableau I : Valeurs des glycémies des tubes TH à température ambiante et à 4°C

	Tube héparinate de lithium (TH)							
	Température ambiante				4°C			
Temps(h)	0	2	4	6	0	2	4	6
Sujets								
1	6,56	5,56	5,23	5,34	6,56	5,84	5,78	5,45
2	4,78	3,50	2,22	1,17	4,78	4,00	3,89	3,39
3	5,06	3,61	2,84	1,95	5,06	4,17	3,89	3,89
4	5,06	3,84	2,95	1,89	5,06	4,50	4,45	4,17
5	5,78	4,84	3,22	2,28	5,78	5,78	5,45	5,28
6	4,78	3,73	2,78	1,83	4,78	4,73	4,34	3,89
7	5,12	4,00	3,22	2,50	5,12	4,73	4,67	4,89
8	6,12	5,12	4,50	3,22	6,12	6,00	5,84	5,84
9	6,12	4,67	3,78	3,28	6,12	5,06	4,95	4,84
10	5,78	3,78	3,84	3,06	5,78	4,89	5,84	5,34
11	6,06	3,67	3,89	2,89	6,06	5,56	5,39	5,56
12	4,67	3,61	3,56	2,45	4,67	4,56	5,95	4,89
13	5,28	4,23	3,17	2,95	5,28	4,61	4,61	4,34
14	5,12	3,95	3,67	2,84	5,12	4,78	4,73	4,06
15	6,28	5,06	4,78	4,34	6,28	5,67	5,34	5,56
16	5,95	4,78	4,06	3,39	5,95	5,95	5,34	5,06
17	4,84	3,89	3,56	3,28	4,84	4,67	4,67	4,56
18	5,45	4,67	4,06	3,50	5,45	5,45	5,06	5,06
19	5,73	4,73	4,78	3,89	5,73	5,28	5,56	5,12
20	5,89	4,50	4,00	3,56	5,89	5,84	5,12	5,06
21	6,84	5,95	5,23	4,84	6,84	6,51	6,73	6,34
22	6,51	5,56	4,95	4,34	6,51	6,06	5,84	6,00
23	5,89	5,12	4,95	4,56	5,89	5,39	5,39	5,06
24	5,17	3,78	3,11	2,61	5,17	4,28	3,95	3,73
25	5,23	3,95	2,95	2,39	5,23	4,39	4,34	4,17
26	5,84	4,89	4,11	3,11	5,84	5,39	5,34	5,12
27	5,62	4,45	4,11	2,89	5,62	5,17	5,34	5,00
28	5,50	5,00	4,56	4,17	5,50	5,12	4,89	5,12
29	5,23	4,50	3,39	3,00	5,23	5,34	5,45	5,00
30	5,12	4,06	3,00	1,67	5,12	5,00	5,00	4,67
31	5,56	4,23	3,00	2,78	5,56	5,06	5,12	4,67
32	5,39	4,61	3,95	2,95	5,39	5,39	5,12	4,84
33	4,50	3,95	2,61	1,83	4,50	4,61	4,50	4,56
34	6,39	5,56	4,89	3,95	6,39	5,78	5,50	5,62
35	5,62	5,28	4,56	3,61	5,62	5,17	5,12	5,12

Tableau II : Valeurs des glycémies des tubes TF à température ambiante et à 4°C

	Tube avec oxalate de potassium et fluorure de sodium (TF)							
	Température ambiante				4°C			
Temps(h)	0	2	4	6	0	2	4	6
Sujets								
1	6,39	6,28	6,12	6,12	6,39	6,12	5,95	5,84
2	4,67	4,34	4,17	4,17	4,67	4,50	4,34	4,39
3	4,78	4,45	4,28	4,34	4,78	4,50	4,39	4,28
4	4,84	4,45	4,17	4,34	4,84	4,67	4,50	4,45
5	5,67	5,45	5,56	5,39	5,67	5,62	5,89	5,89
6	4,61	4,73	4,17	4,28	4,61	4,45	4,23	4,39
7	5,12	4,67	4,89	2,28	5,12	4,89	5,12	5,06
8	6,00	5,84	5,67	5,67	6,00	5,89	6,00	5,84
9	5,12	5,17	5,06	5,06	5,12	5,12	5,06	5,12
10	5,73	5,78	5,73	5,62	5,73	5,73	5,67	5,67
11	5,95	5,84	5,78	5,67	5,95	5,84	5,73	5,84
12	4,61	4,56	4,84	4,45	4,61	4,50	4,56	4,50
13	5,17	4,78	4,84	4,78	5,17	5,00	4,89	4,89
14	5,00	4,73	4,61	4,61	5,00	4,89	4,67	4,73
15	6,17	5,62	5,56	5,34	6,17	5,73	5,78	5,28
16	5,67	5,23	4,95	5,23	5,67	5,67	5,34	5,39
17	4,73	4,23	4,23	4,45	4,73	4,61	4,73	4,67
18	5,34	5,17	5,39	5,28	5,34	5,39	5,28	5,17
19	5,62	5,23	5,45	5,28	5,62	5,62	5,62	5,50
20	5,73	5,62	5,73	5,62	5,73	5,67	5,62	5,62
21	6,73	6,17	6,17	6,12	6,73	6,62	6,62	6,67
22	6,51	6,12	6,06	6,28	6,51	6,17	6,12	5,89
23	5,56	5,23	5,39	5,23	5,56	5,45	5,45	5,34
24	5,06	4,56	4,28	4,61	5,06	4,61	4,39	4,06
25	5,00	4,56	4,61	4,50	5,00	4,61	4,67	4,61
26	5,73	5,28	5,23	5,45	5,73	5,56	5,73	5,73
27	5,50	5,23	5,34	4,89	5,50	5,17	5,39	5,39
28	5,39	5,28	5,34	4,73	5,39	5,39	5,39	5,06
29	5,23	5,12	4,56	4,89	5,23	5,12	4,78	5,06
30	5,12	4,89	4,73	4,61	5,12	5,56	5,28	5,17
31	5,28	5,00	4,89	4,89	5,28	5,34	5,17	5,17
32	5,28	4,89	4,95	4,84	5,28	5,34	5,45	4,95
33	4,39	4,39	4,00	3,89	4,39	4,39	4,28	4,28
34	6,28	5,89	5,89	4,89	6,28	5,84	5,56	5,67
35	5,62	4,61	4,84	4,84	5,62	5,39	5,39	5,39

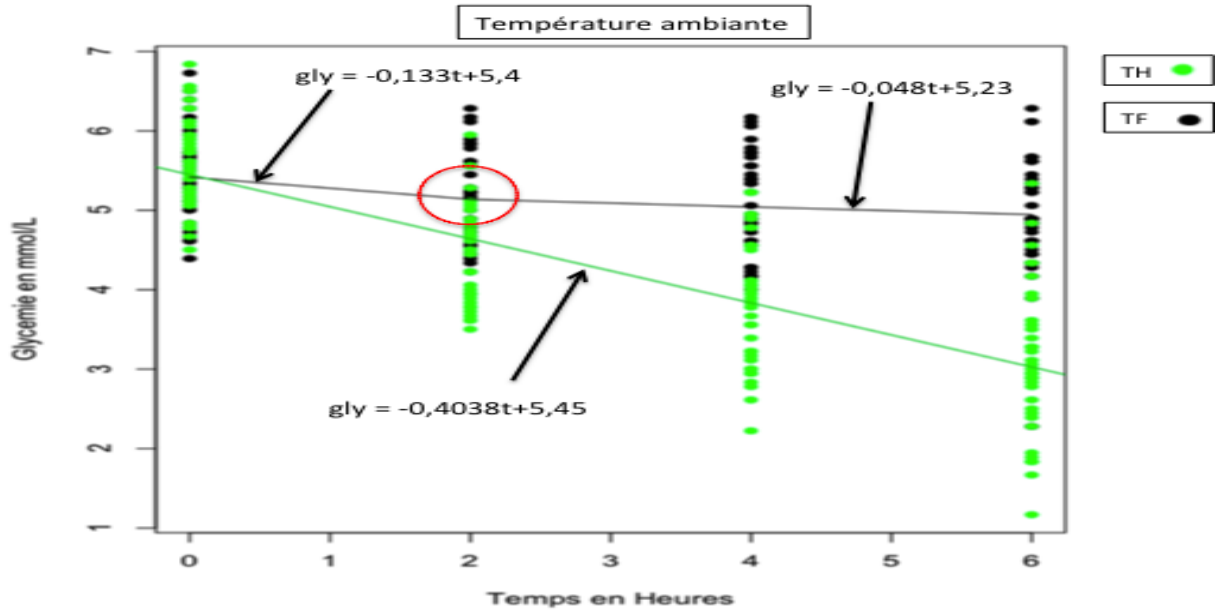


Figure 1 : Cinétique de la glycémie sur héparinate de lithium (TH) et fluorure de sodium (TF) à température ambiante. Les droites de régression correspondent aux taux de décroissance de la glycémie en mmol/L et par heure après recueil du sang veineux dans les différents tubes à la température ambiante.

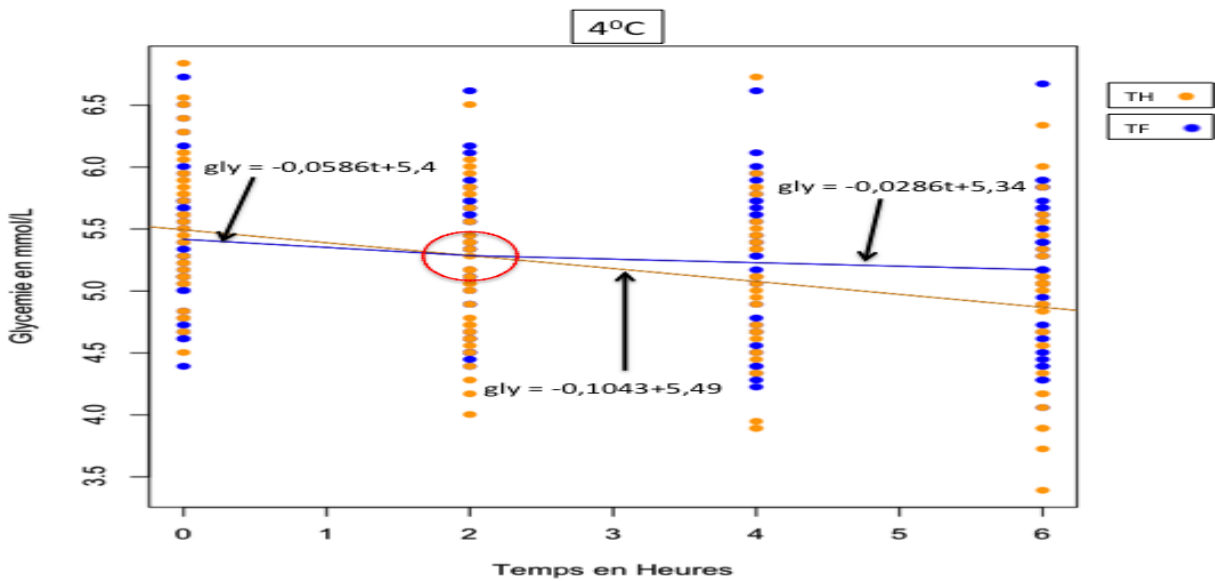


Figure 2 : Cinétique de la glycémie sur héparinate de lithium (TH) et fluorure de sodium (TF) à 4°C. Les droites de régression correspondent aux taux de décroissance de la glycémie en mmol/L et par heure après recueil du sang veineux dans les différents tubes à 4°C

Discussion

Le diagnostic biologique du diabète repose sur la détermination de la glycémie. Cette dernière reste influencée par des insuffisances survenant le plus souvent lors de la phase pré-analytique.

Nos résultats montrent que la stabilité de la glycémie avant centrifugation est influencée par la présence d'antiglycolytique du tube de prélèvement et par la température de conservation. En effet, la décroissance de la glycémie à température ambiante pour les tubes TH est constante de t₀ à t_{6h} à raison de 0,4038 mmol/L/h soit 7,41 %/h (figure 1). Cette diminution est presque le double de celle observée par Foucher (3) qui est de 0,21 mmol/L/h soit 4,16 %/h. Cette différence dans nos résultats peut être attribuée à la température ambiante 24°C (+/- 1°C) prise dans notre étude contre 20°C (+/- 1°C) notée dans l'étude de Foucher (3). Toutefois, cette décroissance de la glycémie s'écarte des valeurs décrites dans la littérature (5 % à - 7 %/h) pour les tubes sans antiglycolytique (7). En effet, une baisse de 5% est atteinte au bout de 40mn dans notre étude pour le tube TH, baisse qui respecte néanmoins le délai de 30mn recommandé avant centrifugation pour prétendre à des résultats fiables (7). La valeur de 7,41 %/h retrouvée dans notre étude limite l'utilisation des tubes TH à la température ambiante. Contrairement au tube TH, la cinétique de la glycémie pour les tubes TF de t₀ à t_{6h} observe une décroissance qui n'est pas constante. L'analyse de la figure 1 montre une décroissance de 0,133 mmol/L/h soit 2,46 %/h dans les deux heures qui suivent le prélèvement et une décroissance, deux fois et demie plus faible que la précédente, de 0,048 mmol/L soit 0,96 %/h pour les quatre dernières heures. Il apparaît ainsi que la glycémie baisse 3 fois moins vite environ sur tube TF que sur tube TH dans les deux premières heures et 8 fois moins sur les 4 heures restantes avant de se stabiliser.



Cependant, la conservation à 4°C assure une certaine stabilité de la glycémie quelque soit le tube contrairement à la température ambiante. En effet, la cinétique de la glycémie pour les tubes TH montre une décroissance constante quatre fois moindre à 4°C qu'à température ambiante durant la période d'étude (t_0 à t_6h) à raison de 0,1043 mmol/L/h soit 1,89 %/h. Pour le tube TF par contre, on note une décroissance de 0,0586 mmol/L/h soit 1,08 %/h dans les deux premières heures et une baisse, deux fois plus faible que la précédente, de 0,0286 mmol/L/h soit 0,53 %/h, sur les quatre dernières heures restantes de l'étude (figure 2). On constate ainsi que la glycémie baisse 2 fois moins vite environ sur tube TF que sur tube TH dans les deux premières heures. Puis cette baisse revient presque 4 fois plus faible sur les 4 heures restantes sur tube TF que sur tube TH. Ainsi, la baisse de la glycémie sur tube TF est deux fois moindre à 4°C par rapport à la température ambiante pendant toute la durée de l'étude.

Par conséquent, l'inhibition plus ou moins complète de la glycolyse n'est pas immédiate juste après le prélèvement en présence de fluorure de sodium à 4°C comme à température ambiante même si la stabilité de la glycémie sur tube TF semble meilleure que sur tube TH. Cependant, nos résultats montrent que sa présence semble suffisante pour entraîner une baisse de la glycémie de 5% au bout de 2h05mn sur tube TF contre 40mn sur tube TH. Cette baisse de la glycémie sur tube avec fluorure de sodium dans les premières heures qui suivent le prélèvement reflète l'action de l'énolase dans les réactions distales de la voie glycolytique (2). Cependant si l'inefficacité du fluorure du sodium juste après le prélèvement est communément partagée avec d'autres auteurs (2,7), il demeure que le délai de stabilité diffère suivant les études. Selon, Sacks (7) la glycolyse se poursuit jusqu'à la



quatrième heure à température ambiante avant stabilisation alors que nous avons relevé une baisse jusqu'à 6 heures.

En revanche, avec la conservation des tubes à 4°C la fiabilité des résultats est garantie après un délai relativement long (7h 20mn sur tube TF contre 2h 37mn sur tube TH). Ce qui laisse supposer que la conservation à 4°C des prélèvements dans les 2h37mn avant centrifugation serait un avantage dans nos conditions de travail pour se soustraire des ruptures de stocks mais surtout pour réduire les ponctions sanguines abusives des patients. Par conséquent, le potentiel stabilisateur du froid sur la glycémie même en l'absence d'antiglycolytique serait consécutive à l'inhibition des enzymes à basse température comme rapporté par certaines études (5, 6, 8, 9). L'étude de Mavioga (4) sur des tubes contenant un antiglycolytique (fluorure ou mono-iodoacétate de sodium) avait relevé que la température de conservation des prélèvements n'influençait pas la glycémie. Il découle de cette observation que la contradiction peut relever de la population d'étude portant sur des diabétiques suivis en endocrinologie et non sur des volontaires sains. En effet, les médicaments pris par ces patients diabétiques rendraient probablement les enzymes de la glycolyse moins sensibles à l'effet inhibiteur du froid.



Conclusion

La stabilité de la glycémie avant centrifugation reste influencée par la présence d'antiglycolytique du tube de prélèvement et par la température de conservation. D'après nos résultats, l'utilisation du fluorure de sodium comme antiglycolytique se justifie dans notre pratique quotidienne au laboratoire. En effet, son action, bien qu'incomplète et non immédiate, est assez suffisante pour maintenir la glycémie à des niveaux interprétables. En outre, la conservation à 4°C du prélèvement sanguin combinée à l'antiglycolytique améliore considérablement la stabilité de la glycémie.

Références

1. **American Diabetes Association. (2006).**Clinical Practice Recommendations .*Diabetes Care*.
2. **Bruns DE, Knowler WC.** (2009) Stabilization of glucose in blood samples: why it matters. *Clin Chem* ; 55:850-2.
3. **Foucher B, Pina G, Desjeux G, Cheminel V, Prevosto JM.** (2004). Stabilité de la glycémie avant centrifugation avec ou sans antiglycolytique. *Ann Biol Clin*; 62 : 601- 4.
4. **Mavioga EMK, Verret C, Le Berre JP, Ceppa F, Burnat P.** (2011). Actions du fluorure de sodium et du mono-iodoacétate de sodium comme antiglycolytiques. *Revue francophone des laboratoires*; 41 :51-4.
5. **Murphy JM, et al.**(2000). Effects of transportation and delay in processing on the stability of nutritional and metabolic biomarkers. *Nutr Cancer*;37:155–60.
6. **Oddoze C, Lombard E, Portugal H.**(2012).Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clin Biochem*; 45 : 464-9.
7. **Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, Bruns DE, Horvath AR, Kirkman MS, et al.** (2011).Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clin Chem*; 57:5- 6
8. **Stahl M, Jorgensen LGM, Hyltoft Petersen P. et al.** (2001). Optimization of preanalytical conditions and analysis of plasma glucose. Impact of the new WHO and ADA recommendations on diagnosis of diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest*; 61:169–80
9. **Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M.**(2008).Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Ann Clin Biochem*; 45. 375-9.