

Points redox

**Laboratoires des centres de référence
ACCREDITATION
Harmonisation des pratiques
Biologie & Qualité 27 novembre 2012
Mise à jour octobre 2013**

Biologie & Qualité - Mise à jour
octobre 2013

Etape pré-analytique

Procédure de prélèvement

- 1- PRESCRIPTION
- 2- PREPARATION DU PATIENT
- 3- RENSEIGNEMENTS CLINIQUES
- 4- PONCTION
- 5- TUBES DE PRELEVEMENT
- 6- PRETRAITEMENT
- 7- STABILITE
- 8- TRANSPORT
- 9- NON-CONFORMITES

1- PRESCRIPTION : indications : orientation vers une anomalie

- **de la chaîne respiratoire** : complexe I, II, III, IV, V et multiple
- **du carrefour du pyruvate** : déficit en PDH, en PC
- **de la cétogénèse**
- **de la cétolyse** : déficit en MAT ou SCOT
- **de la néoglucogénèse**
- **du métabolisme du glycogène**
- **du cycle de KREBS** : déficit en alpha cétooglutarate déshydrogénase, fumarase
- **de l'oxydation mitochondriale des acides gras**

Les dosages de lactate, pyruvate et corps cétoniques sont essentiels dans la détermination de l'état d'oxydoréduction de la cellule (point redox L/P et 3OHB/ACAC). Ils doivent impérativement être réalisés sur le même tube

2- PREPARATION DU PATIENT

- Définir le moment du prélèvement : avant repas, après repas, état de jeûne, épreuve de jeûne, épreuve de charge...
- Répéter les prélèvements avant/après repas au cours d'une journée : cycle redox

3- RENSEIGNEMENTS CLINIQUES : âge (variations en fonction de l'âge), état de jeune (durée), état nourri

- hypoglycémie, cardiomyopathie, coma, mort subite dans la fratrie, consanguinité, rhabdomyolyse, intolérance à l'effort, insuffisance hépatique...
- une fiche de demande de renseignements cliniques commune à tous les laboratoires des centres de référence et commune à tous les examens prescrits dans le cadre de MHM a été définie

4- PONCTION

- La pose d'un cathélon est recommandée pour éviter la stase sanguine (anoxie)
- Nécessité d'indiquer d'éventuelles difficultés de prélèvement

5- TUBES DE PRELEVEMENT

- Dosage du **lactate**, **pyruvate**, **acétoacétate** et **3-hydroxybutyrate**, glucose et détermination des rapports REDOX : recueil du sang dans un tube hépariné (volume prélevé souhaité : 0,5 ml), déprotéinisation immédiate
- Dosage des **acides gras libres** : prélever 0,5 ml de sang dans un tube hépariné (min : 200 µl), mettre immédiatement dans la glace

6- PRETRAITEMENT (1)

dosage du lactate, pyruvate, acétoacétate et 3-hydroxybutyrate sanguins et détermination des rapports REDOX : déprotéinisation

- elle doit être immédiate après le prélèvement (< 5 minutes)
- mesurer exactement 1 volume de sang hépariné, prélevé dans un tube contenant de l'acide perchlorique 1 M (ou trichloracétique) exactement mesuré et préalablement placé à 4°C (ex Necker : 0,5 mL de sang total + 1 mL d'acide perchlorique 1M)
- agiter vigoureusement : il se forme un coagulum de couleur marron
- placer le tube au congélateur à - 20°C, puis faire parvenir l'échantillon congelé au laboratoire dans les 24 heures qui suivent

6- PRETRAITEMENT (2)

Nécessité de vérifier la conformité de la déprotéinisation

- **Vérification visuelle des volumes**
- **Comparaison du glucose dosé dans le déprotéinisé au glucose dosé dans le plasma pour dosage des AGL**
- **Pesée des tubes**

6- PRETRAITEMENT (3)

Dosage des acides gras libres et dosage du glucose

- centrifuger les tubes rapidement (< 1 h après le prélèvement)
- décanter et congeler le plasma après avoir identifié correctement les différents tubes.
- faire parvenir au laboratoire les plasmas congelés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

7- STABILITE des métabolites dans le sang

Les métabolites instables : pyruvate et acétoacétate

Lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate, acétoacétate, (glucose)

- Sang sans ajout d'acide : quelques minutes
- Sang déprotéinisé : 10 jours à -20°C
- Après prétraitement = déprotéinisé neutralisé (filtrat) : stabilité : 5 jours à -20°C

Acides gras libres

- Avant centrifugation : stabilité dans le sang < 1 h
- Après centrifugation, décantation : stabilité dans le plasma 1 mois à 20°C

8- Transport

- **Lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate, acétoacétate , glucose** : déprotéinisé non décanté : à transporter congelé (max : 5 jours)
- **Acides gras libres** : plasma à transporter congelé (max : 1 mois)

9- Non conformités

- **Identification erronée du patient, des heures et dates de prélèvement**
- **Absence d'identification du préleveur, du prescripteur**
- **Délai écoulé entre le moment du prélèvement et la déprotéinisation > 5 min**
- **Conditions de transport incorrectes**
 - **délai**
 - **température**
 - **hygiène et sécurité**
- **Lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate et acétoacétate non quantifiés sur le même échantillon**
- **Nature de l'échantillon transmis incorrecte**
 - **Sang non déprotéinisé ou déprotéinisation incomplète**
 - **pH incorrect (rapport de volumes sang/acide, stabilité et molarité de l'acide)**
 - **volume incorrect (vérification visuelle des tubes ou par pesée)**
- **Défaut de cohérence de la glycémie avec l'état de nutrition indiqué**

Étape analytique

PROTOCOLE OPERATOIRE

Préparation des échantillons

- Les échantillons déprotéinisés parvenus congelés au laboratoire sont décongelés et centrifugés à environ **1000 g ?**, 10 minutes à **+ 4°C**
- Le surnageant acide doit être neutralisé : tampon phosphate, H_3PO_4 en poudre, ...
- Mélanger et placer 10 minutes dans un bain de glace
- Centrifuger : environ 1000 g, 10 minutes à + 4°C
- Vérifier le pH à l'aide d'un papier pH extemporanément, et, au besoin, ajuster à pH 7 avec le tampon ou la solution d'acide perchlorique (noter le volume ajouté avec précision pour en tenir compte dans les calculs ultérieurs)
- Le surnageant neutralisé est transféré dans les godets de l'automate

Évaluation des performances

- **Mode d'étalonnage : étalons ou utilisation d'un facteur basé sur l'absorption moléculaire du NADH**
- **Fidélité : répétabilité et fidélité intermédiaire**
- **Contamination**
- **Limite de détection**
- **Comparaison de méthodes**
- **CIQ**
- **EEQ**
- **Incertitude de mesure**
- **Intervalle de référence**

MODULES A DEPLOYER	DOSSIER REFEREN CES BIBLIO	Cas d'un système normalisé (CE) (vérification) PORTEE A	Cas d'un système mis au point au laboratoire (validation) PORTEE B
Fidélité (répétabilité/reproductibilité)	oui	oui	oui
Limites de linéarité	oui	Si besoin, si possible	oui
Limite de détection	si besoin	si besoin	si besoin
Justesse	oui	oui, si possible	oui, si possible
Comparaison de méthodes	oui	oui, si possible	oui, si possible
Contamination inter échantillons	oui	Oui, si besoin	Oui, si besoin
Interférences	oui	non	oui, si possible

Contrôles Internes de Qualité (CIQ)

- Échantillons SKML (Special Assay Serum) : lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate, acides gras libres (NEFA)
- Solutions préparées au laboratoire
- Autres CIQ disponibles (ex: lactate)
 - *Valeurs cibles* : se référer aux fiches établies pour chaque technique
 - *Limites d'acceptabilité* : les valeurs obtenues doivent se situer à **± 15 %** de la valeur théorique (justesse)
 - Pour chaque dosage, tracer les données : valeur de l'absorbance du blanc, des échantillons de contrôle, numéros de lots des réactifs, date de préparation des tampons, solutions mères,

Modèle de cahier de bord (Necker)

	<i>Date de préparation</i>	<i>Date de préparation</i>		<i>Valeurs trouvées en $\mu\text{mol/l}$</i>			
<i>Date</i>	<i>Solution mère</i>	<i>Tampon TRIS</i>	<i>ABS du blanc</i>	<i>P1 100l \pm10 $\mu\text{mol/l}$</i>	<i>P2 200\pm20 $\mu\text{mol/l}$</i>	<i>P3 400\pm40 $\mu\text{mol/l}$</i>	<i>n° de lot réactif</i>
01-01- 2012							
03-01- 2012							
10-01- 2012							

Évaluation externe de la qualité (EEQ)

- **EEQ : il n'existe pas de programme d'EEQ pour l'acétoacétate**
- **Des échanges inter-laboratoires n'ont pu être organisés dans des conditions satisfaisantes étant donné le défaut de stabilité constaté en milieu aqueux. Il faudrait envisager d'échanger des déprotéinisats qui permettent plus de stabilité**
- **Des essais ponctuels d'échanges inter-laboratoires d'échantillons déprotéinisés pourraient être envisagés**

Étape analytique : Causes d'erreurs

- pH du filtrat : neutralisation défectueuse : diminution du pyruvate et augmentation du L/P
- Stabilité des réactifs : diminution du domaine de mesure
- Défaut de contrôle de qualité interne
- Défaut de contrôle de qualité externe
- Étalonnage incorrect : nature et stabilité des étalons...
- Détermination des rapports redox : lactate et pyruvate, acétoacétate et 3-hydroxybutyrate doivent impérativement être dosés sur le même échantillon

Étape post-analytique

Intervalles de référence

	Lactate (L) (mmol/l)	Pyruvate (P) (mmol/l)	L/P	3OHB (mmol/l)	ACAC (mmol/l)	Corps cétoniqu es (mmol/l)	3OHB/ ACAC
Enfant (0-1 an)							
Etat nourri, 1h après repas	0,6-2,2	0,04-0,14	6-14	0,1-0,2	0,1-0,25	0,1-0,3	<1
Enfant (1-7 ans)							
Jeûne 10 h	0,7-1,8	0,09-0,17	6-14	0,02-0,3	0,04-0,2	0,02-0,6	<2,5
Etat nourri	0,9- 1,8	0,08-0,17	6-14	0,02-0,1	0,04-0,13	0,02-0,2	<1
Enfant (7-15 ans) et adulte							
Jeûne 10 h	0,7-0,9	0,04-0,12	6-14	0,02-0,3	<0,2	0,1-0,4	0,4-2,3
Etat nourri	1,0-1,55	0,08-0,16	6-14	0,02-0,1	0,04-0,14	<0,2	<1

**A. Vassault. « lactate, pyruvate, acétoacétate, 3 hydroxybutyrate ». in Blau, Duran, Gibson :
LABORATORY GUIDE TO THE METHODS IN BIOCHEMICAL GENETICS, SPRINGER 2008.**

Exemples de commentaires types

- 1- Hyperlactatémie avec augmentation du rapport lactate/pyruvate.
- 2- Hyperlactatémie sans augmentation du rapport lactate/pyruvate pouvant évoquer un déficit en PDH.
- 3- Hypoglycémie hypocétotique. Cétogénèse discordante par rapport à la lipolyse
- 4- Hypercétonémie paradoxale.
- 5- Augmentation de la lactatémie à contrôler.
- 6- Interprétation des corps cétoniques et des acides gras libres impossible en l'absence de la glycémie

Commentaires types des anomalies

6- La diminution anormale de la pyruvicémie par rapport à la lactatémie peut traduire un délai écoulé entre le moment du prélèvement et celui de la déprotéinisation supérieur aux recommandations du LBM (< 5 minutes).

Non conformité : Le pH de l'échantillon transmis n'est pas conforme aux recommandations du LBM traduisant un rapport de dilution sang / acide différent de celui préconisé. Voir protocole de prélèvement.

Conclusion

- Les dysfonctionnements pré-analytiques sont à l'origine de nombreuses vérifications car ils peuvent se traduire par des résultats pathologiques sans pathologie
- Une augmentation du rapport L/P sans hyperlactatémie associée doit être considérée comme un artefact. C'est la raison pour laquelle les mesures doivent être répétées
- Un échantillon prélevé à un moment inapproprié, dans des conditions incorrectes peut engager des investigations complémentaires lourdes, coûteuses et délétères pour le patient

Annexe

Exemple de Necker

Document COFRAC SH FORM 43 (à compléter)



FICHE TYPE QUANTITATIF

Vérification (portée A) /
validation (portée B)
d'une méthode de biologie
médicale

Référence : SH FORM 43
BIOM-F-ENR 11

Indice de révision : 00

Date d'application :

EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE : **Pyruvicémie**

DESCRIPTION DE LA METHODE

Analyte/Mesurande	pyruvate
Principe de la Mesure :	Mesure spectrophotométrique
Méthode de mesure :	Temps fixé (décroissance)
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Sang déprotéinisé
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Acide perchlorique 1M
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Déprotéinisation : 1vol sang + 2 volumes HClO4 puis neutralisation par KOH
Unités :	mmol/l
Intervalles de référence :	Jeûne 10 h : 0,04-0,12 mmol/l Etat nourri : 0,08-0,16 mmol/l
Marquage CE (Oui/Non) :	NON
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	KONELAB 30
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Préparé au laboratoire (BIOM-F-PRANA 08)
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Facteur de calcul (coefficient

Evaluation de la répétabilité

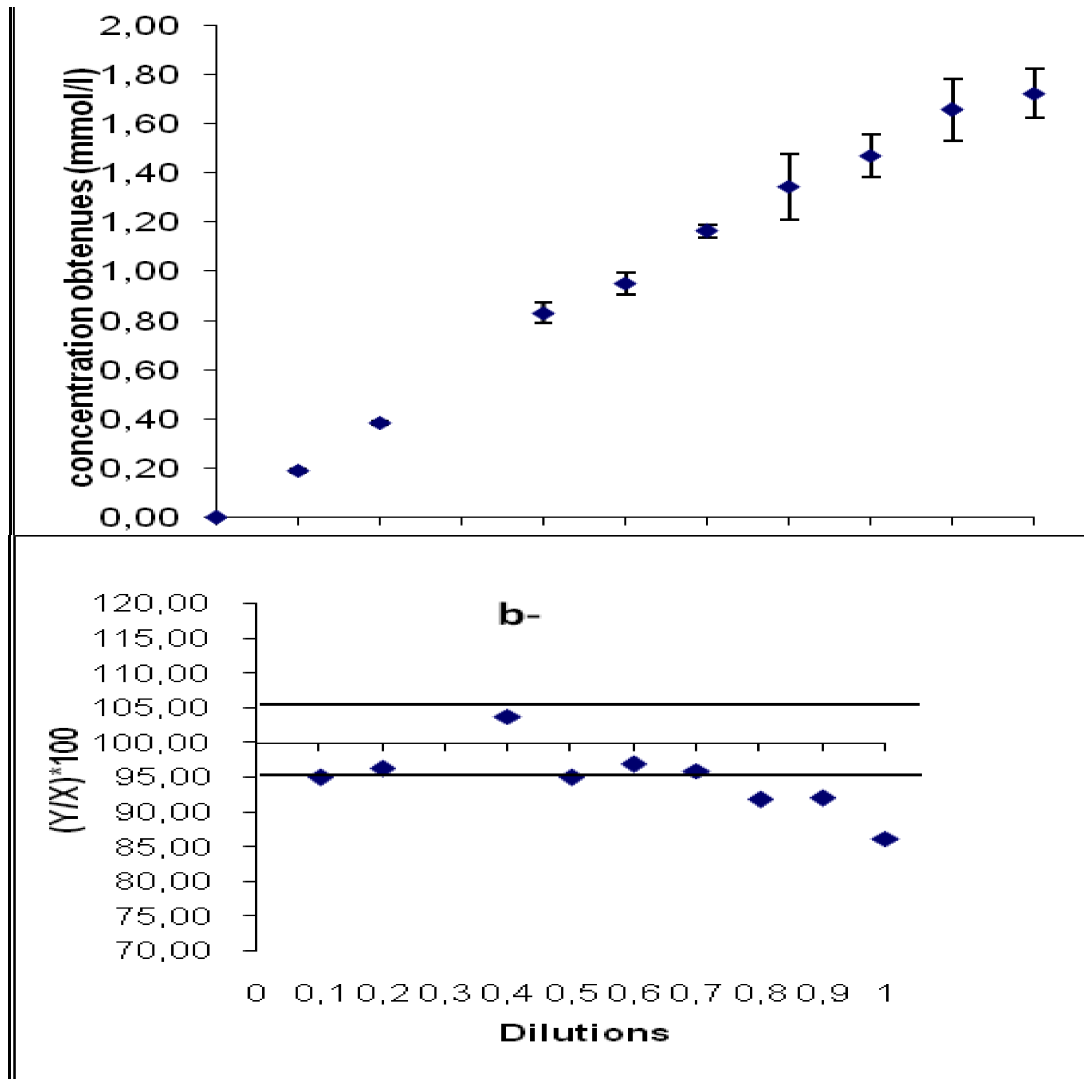
Analyte	Lactate	Pyruvate	3 OH butyrate	Acétoacétate
n	13	14	20	20
m	0,29 mmol/l	184 µmol/l	123 µmol/l	43 µmol/l
CV (%)	1,63	0,49	0,74	2.99
CV Limite (%)	< 3,5	< 3,5	< 3,5	< 3,5
Conclusion	V	V	V	V

Evaluation des performances

	ACAC	3 OHB	LACT	PYR	AGNE
Fidélité intermédiaire	m = 10 µmol/l CV : 10 % m = 50 µmol/l CV : 8 % m = 100 µmol/l CV : 6 %	m = 0,5 mmol/l CV = 2 % m = 1 mmol/l CV = 1 % m=2 mmol/l CV = 1 %	CV < 5 % (0,5 à 15 mmol/l)	CV < 5 % m=100 µmol/l m=200 µmol/l m=400 µmol/l	CV = 5 % m= 0,5 mmol/l
Limites acceptables	< 7 %	< 7 %	< 5 % (SFBC*)	< 5 %	< 7 %
Conclusion	V	V	V	V	V
Limite de détection	0,01 mmol/l	0,02 mmol/l	0,1 mmol/l	0,01 mmol/l	0,02 mmol/l
Limites de linéarité	1 mmol/l	0,02 - 2 mmol/l	0,2-15mmol/l	0,02-15 mmol/l	0,1-2,5 mmol/l

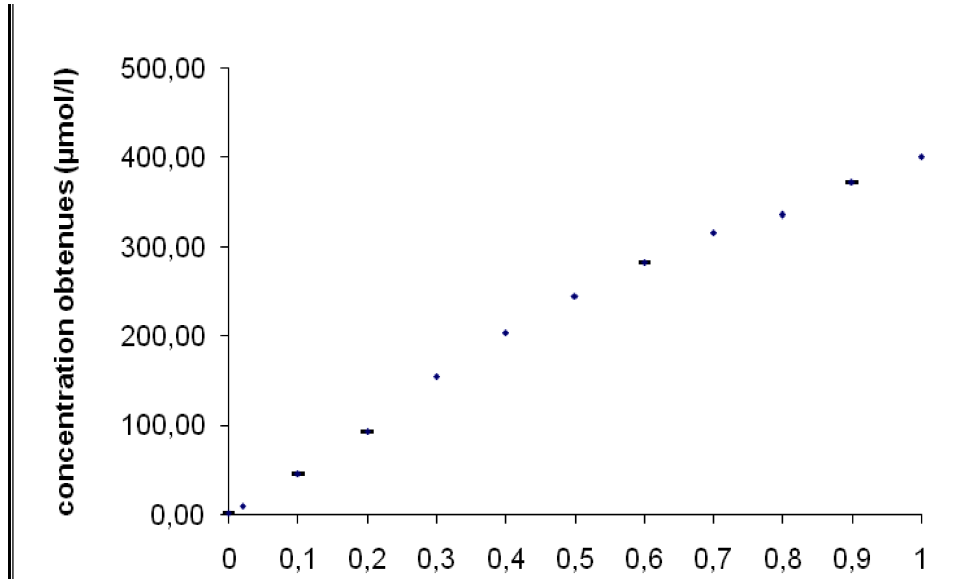
* *Ann Biol Clin 1999, 645. Normes et spécifications. A.Vassault et col*

3 Hydroxybutyrate



Domaine testé : 0,2 à 2 mmol/l .
Domaine vérifié : 0,2 à 1,4 mmol/l
Soit $4,5 \times 1,4 = 6,3$ mmol/l

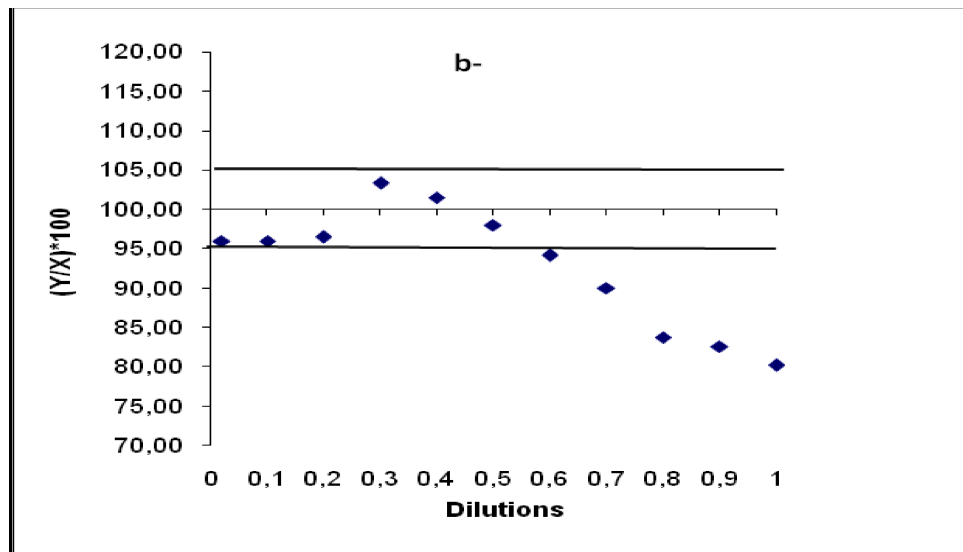
Acétoacétate



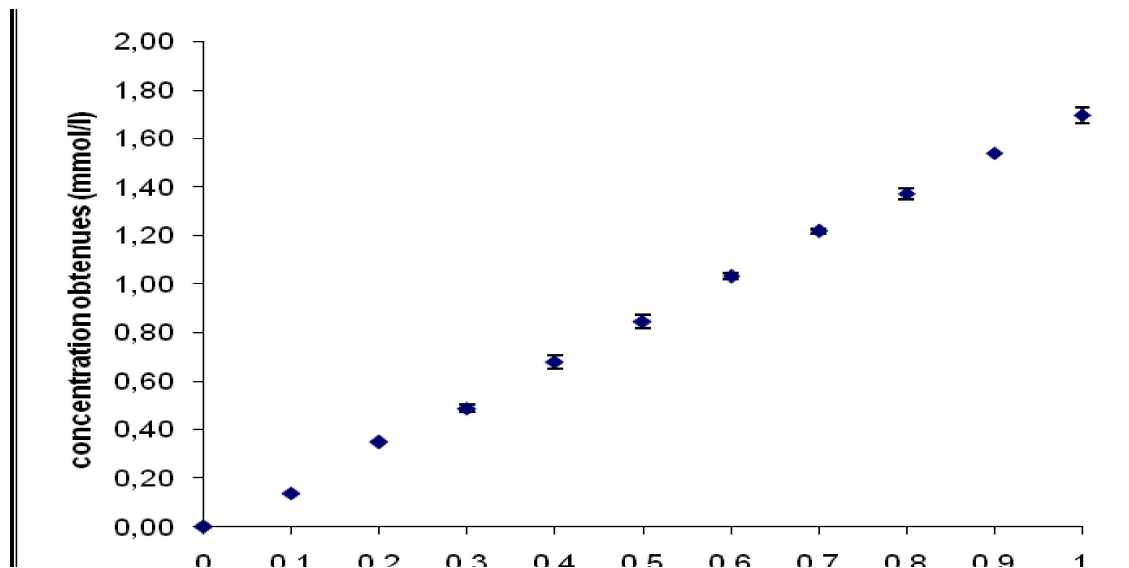
Domaine testé : 10 à 500
µmol/l.

Domaine vérifié : 10 à 300
µmol/l.

Soit $0,3 \times 4,5 = 1,35$ mmol/l

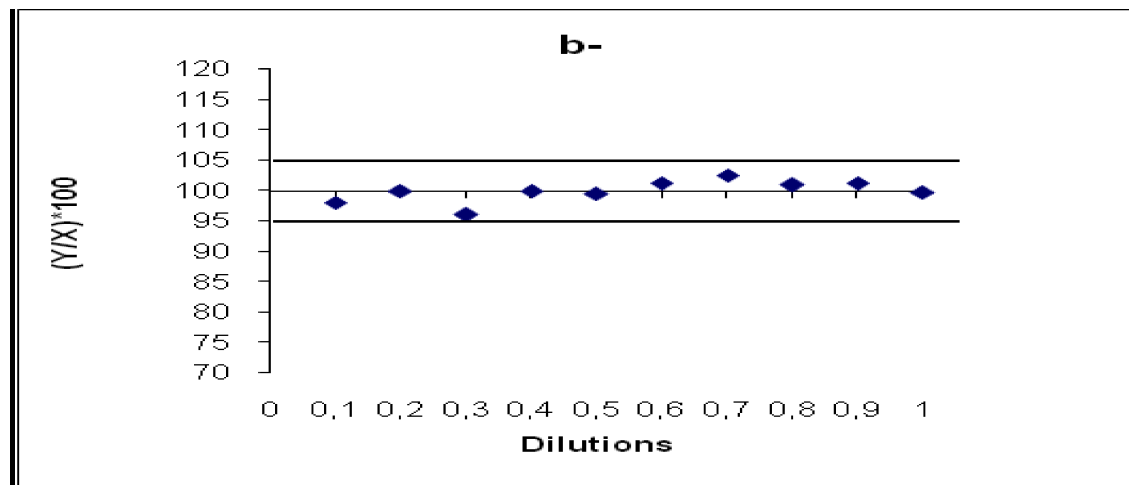


Limites de linéarité - Acides gras non estérifiés



Domaine testé : 0,14-1,7
mmol/l

Domaine testé : 0,14-1,7
mmol/l



Evaluation de la justesse

LACTATE	M	E
Valeur cible (mmol/l)	0,5	1
Technique testée moyenne (mmol/l)	0,52	1
Biais (mmol/l)	0,02	0
(%)	4	0
Limite acceptable de justesse (%)	8,7	8,7
Conclusion	V	V

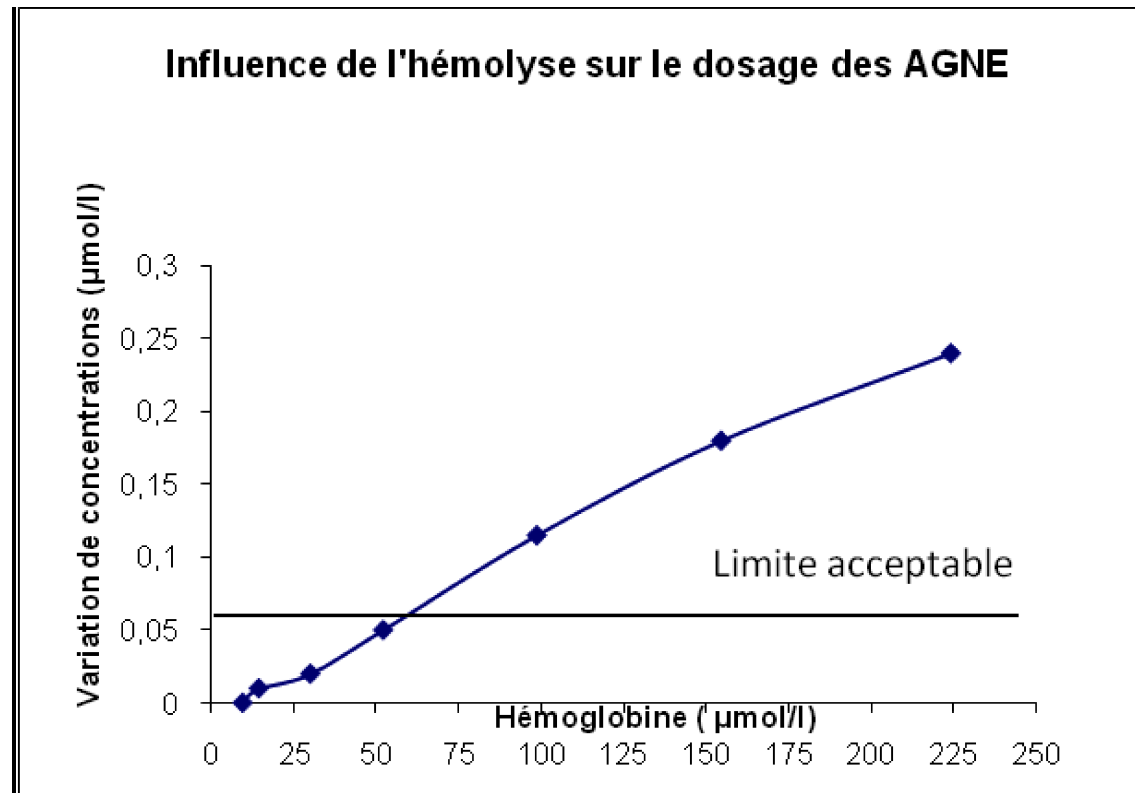
Pyruvate	B	M	E
Valeur cible (µmol/l)	100	200	400
Technique testée moyenne (µmol/l)	99	191	388
IC de la moyenne (µmol/l)	3,04	4,06	9,52
Biais (µmol/l)	1	9	12
(%)	1	4,5	3
Limite acceptable de justesse (%)	8,7	8,7	8,7
Conclusion	V	V	V

Justesse

3 hydroxybutyrate	B	M	E
Valeur cible ($\mu\text{mol/l}$)	250	500	1000
Technique testée moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	243	458	913
IC de la moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	9,63	9,51	18,24
Biais ($\mu\text{mol/l}$) (%)	7	42	87
	2,8	8,4	8,7
Limite acceptable de justesse (%)	8,7	8,7	8,7
Conclusion	V	V	V

Acétoacétate	B	M	E
Valeur cible ($\mu\text{mol/l}$)	10	50	100
Technique testée moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	9,32	47	95
IC de la moyenne ($\mu\text{mol/l}$)	0,34	1,30	1,40
Biais ($\mu\text{mol/l}$) (%)	0,68	3	5
	6,8	6	5
Limite acceptable de justesse (%)	8,7	8,7	8,7
Conclusion	V	V	V

Evaluation de l'influence de l'hémolyse - AGNE



EEQ - ERNDIM

3-Hydroxybutyrate	95	96	97	98	99	100
Résultat observé (mmol/l)	0,06	3	4,2	1,65	0,06	4,4
Valeur cible (moyenne des participants) mmol/l	0,054	3,3	4,87	1,7	0,0555	4,93
Biais (mmol/l)	0,006	0,3	0,67	0,05	0,0045	0,53
(%)	11,11	9,09	13,76	2,94	8,11	10,75
Limite acceptable d'inexactitude (%)						
Idem lactate SFBC	15	15	15	15	15	15

* *Ann Biol Clin 1999, 645. Normes et spécifications. A. Vassault et col*

Intervalles de référence

- > Lactate plasma (état nourri) : 0.6-1.9 mmol/l
- > L/P < 10 ±4
- > Blood lactate : -15 % par rapport au plasma

mg/l $\xrightarrow{\times 0,011}$ mmol/l

- > Corps cétoniques

Post-prandial :

- > **3 OHB + AcAc < 0,2 mmol/l**
- > rapport 3OHB/AcAc < 1 (quel que soit l'âge)

Après 10 heures de jeune :

- > **3 OHB + AcAc : 0,02 à 0,6 mmol/l**
- > rapport 3OHB/AcAc : 0.2 à 2.5 (varie avec l'âge)

Acidocétose : > 7 mmol/l

Valeurs normales (percentile 10-90) corps cétoniques au cours du jeûne prolongé (1-7 ans)

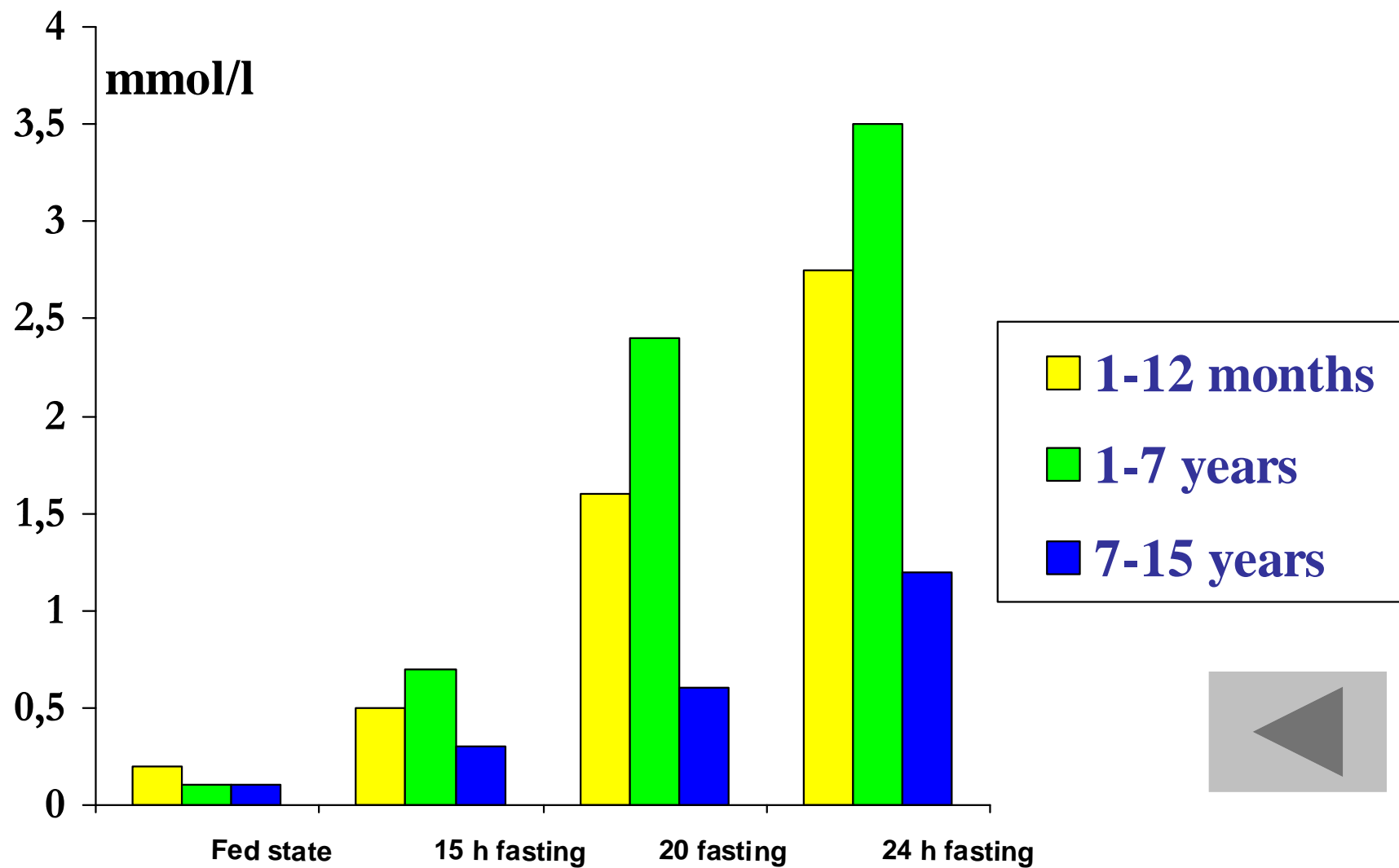
> 15 heures : 0,15 à 2 mmol/l

> 20 heures : 1,2 à 3,7 mmol/l

> 24 heures : 2,2 à 5,8 mmol/l

rapport 3OHB/AcAc : 2,7 à 3,5

CC en fonction de l'état nutritionnel et de l'âge



AN.

Bilan normal

	Avt gout er	Après gout er	avt biber on	Apr biber on
Lact ate mmol/l	1.1	1.6	1.1	0,6
L/ P	12	13	12	9
Cor ps cét oniques mmol/l	0.4	0.2	0.19	0.12
3OHB/ AcAc	1.5	0.8	0.7	0.5
AGNE mmol/l	0.4	0.3	0.6	0,1
Glycémie mmol/l	3.4	5,3	5,1	5,8

H.S. Déficit multiple CI, CIII, C IV

	Avt diner	Après diner	avt gavage	Apr gavage
Lactate mmol/l	5	8,9	5,7	8,5
L/P	28	32	24	27
Corps cétoniques mmol/l	1,35	1,5	1,75	1
3OHB/AcAc	6.9	6,4	7	6,4
AGNE mmol/l	0.7	-	1,3	0,4
Glycémie mmol/l	3,3	5,2	5,8	5

KEN. Déficit PDH

	Avt diner	Après diner	avt gavage	Apr gavage
Lactate mmol/l	5.9	7.3	5,7	7.9
L/P	7	8	7.5	7
Corps cétoniques mmol/l	0.6	0.3	0.3	0.2
3OHB/AcAc	1.3	1	1	0.5
AGNE mmol/l	0.3	0.09	0.7	0.5
Glycémie mmol/l	4.4	4.8	4.1	6.8

Déficit en bétacétothiolase

	29/05/07 mmol/l	N mmol/l
Lactate	0,63	0,7-1,8
Pyruvate	0,060	0,09 -0,17
L/P	11	6-14
3OH butyrate	7,1	0,02 – 0,30
Acétoacétate	3,9	0,04 - 0,20
CC	11	0,06 – 0,60
3OHbut/Acétoacétate	1,8	< 2,5
Glucose	8,7	4 - 5,2

→ Normalisation dès le lendemain

Points redox glycogénose Type I

- Sérum lactescent
- Hyperlactatémie majeure
- Cétonémie
- Lypolyse

Date d'enregistrement	26/07/04
N° du laboratoire	7403
Date du prélèvement	26/07/04
Heure du prélèvement	9h
Lactate (mmol/l)	8,6
Pyruvate (mmol/l)	0,44
Lactate / pyruvate	20
3-OH butyrate (mmol/l)	0,52
Acétoacétate (mmol/l)	0,31
Corps cétoniques (mmol/l)	0,83
3-OH butyrate/acétoacétate	1,7
AG non estérifiés (mmol/l)	1,66
Glucose (mmol/l)	5,4

POINTS REDOX déficit en VLCAD

Epreuve 19/04/96	Début biberon	1h après biberon	3h après	4h après	Normes 4h de jeûne (mmol/l)
L	1.5	2.2	1.5	2.3	< 14
L/P	10	12	10	13	< 14
NH4	63	58	60	64	< 40
AGL	1	0.07	1.21	3.54	0.40
BoB	0.05	0.02	0.04	0.04	0.15
AA	0.06	0.03	0.07	0.05	0.15
CC	0.11	0.05	0.11	0.09	0.30
AG/C	9.1	1.4	11	39	< 2
BB/AA	<1	< 1	< 1	< 1	< 1
Gluc	4	5.8	2.5	2.4	4-5

Relation entre lactatémie et rapport L/P

**Le rapport L/P n'est pas augmenté
sans hyperlactatémie**

Sauf en cas d'anomalie pré-analytique

Relationship between lactataemia and lactate/pyruvate ratio in children affected with respiratory chain defect

