

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Badji Mokhtar University- Annaba
Faculty of Medicine
Vice Deanship of Post-Graduation
Scientific Research and External Relations



جامعة باجي مختار عنابة
كلية الطب
نيابة العمادة لما بعد التدرج
البحث العلمي والعلاقات الخارجية

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA

FACULTE DE MEDECINE

Département de Pharmacie

THESE

**Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat En Sciences
Médicales En Biochimie clinique**

**« Evaluation du trou de glycation chez les diabétiques
de type 2 et sa relation avec les complications du diabète »**

Par: Dr CHINE Sarra, Maître assistante hospitalo-universitaire en biochimie clinique

Directeur de thèse : Pr BENHARKAT Saddek Faculté de médecine d'ANNABA

Co-directrice: Pr BENYAHIA Samia Faculté de médecine d'ANNABA

Devant le jury composé

Présidente : Pr DJABI Farida Faculté de médecine de SETIF

Examineur: Pr NACHI Mourad Faculté de médecine d'ORAN

Examineur : Pr BAGHOUS Housseem Faculté de médecine d'ALGER

Examineur : Pr GOURI Adel Faculté de médecine d'ANNABA

ANNABA le 16 octobre 2024

Remerciement

A Monsieur le Professeur Benharkat Saddek,

Professeur en biochimie à la Faculté de Médecine d'ANNABA et chef de service de Biochimie du CHU
ANNABA

Je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant de diriger cette thèse. Votre expertise et votre patience ont constitué des piliers indispensables pour la réalisation de ce travail.

Travailler avec vous depuis 2011 a été un véritable honneur. Votre soutien indéfectible, vos conseils avisés, votre leadership bienveillant et vos orientations m'ont guidé tout au long de ces années. Vous avez fait preuve d'une générosité et d'une patience exemplaires, pour lesquelles je suis extrêmement reconnaissante.

Votre haute compétence, votre clairvoyance et vos qualités humaines m'ont beaucoup appris et resteront à jamais gravées dans ma mémoire. Elles constituent un héritage précieux pour ma vie professionnelle. Recevez, Professeur, l'expression de ma profonde gratitude et de mon éternelle reconnaissance.

A ma co-directrice, Madame la Professeure Benyahia Samia,

Professeur en biochimie à la Faculté de Médecine d'ANNABA et cheffe d'unité de Biochimie à
l'hôpital IBN SINA- CHU ANNABA-

Je vous exprime ma profonde gratitude pour vos connaissances approfondies et vos suggestions judicieuses, qui ont considérablement enrichi cette recherche.

Votre disponibilité et votre bienveillance ont été un grand réconfort.

Je suis honorée de bénéficier de vos conseils et remarques constructives, ainsi que de l'influence majeure que vous avez eu sur ma formation et mon parcours universitaire.

Votre enseignement passionné et votre mentorat ont été une source d'inspiration tout au long de mon parcours académique.

Veillez accepter, Professeure, l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

À madame la Professeure Djabi Farida,

Professeur de biochimie à la faculté de médecine de SETIF, Présidente du jury et Chef de Service du laboratoire centrale au CHU de Sétif,

Je vous exprime ma sincère gratitude pour votre expertise et votre leadership, qui ont grandement enrichi ce projet.

Votre évaluation approfondie a été extrêmement précieuse, et je suis honorée que vous ayez accepté de présider le jury de cette thèse.

Votre dévouement à la biochimie et votre exemplarité en tant qu'enseignante-chercheuse rehaussent l'importance et la qualité de mon travail.

Je vous remercie infiniment pour vos conseils et remarques constructives, qui ont été des atouts précieux pour améliorer ma recherche.

À Monsieur le Professeur Baghous Houssem,

Membre du jury et Chef de Service d'Endocrinologie et Diabétologie au CHU d'Oran,

Je suis honorée que vous ayez accepté d'apporter votre expérience à l'évaluation de ma thèse.

Je vous exprime ma sincère gratitude pour votre contribution précieuse à cette recherche.

Votre perspective spécialisée et vos commentaires constructifs ont significativement enrichi ce travail.

Votre accueil chaleureux, votre écoute attentive et votre soutien constant ont été des atouts majeurs pour la réussite de ce projet.

Veillez accepter, Professeur, l'expression de mon profond respect et de ma sincère gratitude.

À Monsieur le Professeur Nachi Mourad,

Professeur de biochimie à la faculté d'ORAN, membre du jury et Chef de Service de Biochimie à l'EHU
d'Oran,

Je suis honorée que vous ayez accepté de juger ma thèse.

Je vous remercie pour votre expertise précieuse qui a apporté une dimension essentielle à
l'évaluation de ce projet.

Je vous exprime ma sincère gratitude pour le temps que vous avez consacré à partager vos
suggestions et pour votre soutien tout au long de cette démarche.

Votre perspicacité et vos conseils constructifs ont enrichi mon travail et contribué à son
raffinement.

Veillez recevoir, Professeur, l'expression de ma très haute considération et de mon profond
respect.

À Monsieur le Professeur Gouri Adel,

Professeur de biochimie à la Faculté de Médecine d'ANNABA et chef d'unité de Biochimie à
l'hôpital IBN ROCHD - CHU ANNABA -

Je souhaite vous exprimer ma gratitude la plus profonde pour votre aide inconditionnelle et vos
conseils éclairés tout au long de ce processus.

Votre soutien a été crucial à chaque étape, et votre engagement constant a été une véritable
source d'inspiration pour moi.

Aucun mot ne saurait exprimer pleinement ma reconnaissance.

Je suis particulièrement honorée de vous avoir eu comme formateur, et d'avoir été guidée par
votre passion pour cette spécialité. Votre manière d'enseigner, de partager vos connaissances et
d'encourager la recherche a éveillé en moi un profond désir d'explorer les frontières de cette
discipline.

Votre expertise remarquable en Biochimie et votre enthousiasme contagieux ont grandement
enrichi mon parcours académique.

Grâce à vous, j'ai acquis des connaissances solides et j'ai été inspirée à mener des recherches
approfondies. Votre participation à l'évaluation de ma thèse et votre soutien constant sont des
sources d'inspiration et de motivation pour moi. Je suis honorée d'avoir bénéficié de vos
conseils éclairés.

Veillez agréer, Professeur, l'expression de mes respects les plus distingués et de ma sincère
gratitude.

Je souhaite exprimer mes plus sincères remerciements à toutes les personnes qui ont grandement contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse :

Dr Harbi Amina, Maître Assistante en Endocrinologie Diabétologie CHU ANNABA

Dr Guerfi Meriem, Médecin Généraliste à l'EPSP Annaba, pour leur précieuse participation au recrutement des patients. Votre aide a été essentielle pour mener à bien cette recherche.

Dr Lachmot Monia, Médecin Spécialiste en Biochimie Clinique, pour son aide précieuse dans le recrutement des patients et son soutien moral indéfectible. Votre amitié et votre encouragement ont été d'une grande valeur pour moi.

Tout le personnel du laboratoire de biochimie IBN SINA, sans exception, ainsi que **les résidents** qui y ont passé du temps. Votre aide et votre soutien ont été inestimables dans la réalisation de cette thèse.

Un grand merci au **Dr AHCENE DJABALLAH MONIA**, Médecin Spécialiste en Biochimie Clinique, mon amie et une partie intégrante et essentielle de l'équipe de biochimie d'Annaba. Tes contributions professionnelles ont été inestimables, allant bien au-delà du recrutement des patients. Ton soutien moral constant m'a aidé à traverser les moments les plus difficiles. Ta bienveillance et ton engagement ont été des sources d'inspiration et de réconfort tout au long de ce parcours. Merci infiniment pour ton amitié et ta collaboration précieuse.

Je tiens également à exprimer ma profonde gratitude au Monsieur le **Professeur AMOURA KAMEL**, Doyen de la Faculté de Médecine d'Annaba, pour son soutien et ses encouragements constants durant les trois années de cette recherche. Votre soutien administratif et moral a été essentiel pour la réalisation de ce projet. Merci pour votre confiance et votre engagement envers le succès de cette thèse.

Je remercie également madame **Pr TIGHA Nadia**, Professeur en médecine du travail à la faculté d'Annaba, et **Pr Gharbi Moufida**, Professeur en pharmacologie à la faculté d'Annaba. Vos encouragements et votre soutien moral ont été inestimables tout au long de ce parcours. Vous avez cru en moi et m'avez offert des conseils précieux. Votre confiance et votre soutien ont été des sources de motivation constantes, et je vous en suis profondément reconnaissante. Merci d'avoir été là à chaque étape de ce voyage académique.

Je souhaite adresser un profond remerciement à deux personnes extraordinaires dont le soutien a été crucial tout au long de ce travail :

À ma chère mère, ***Chaabna Halima,***

Je voudrais exprimer ma gratitude sincère pour votre soutien moral et physique inestimable tout au long de cette aventure. Votre présence constante et vos encouragements ont été une source inestimable de réconfort et de force. Vous avez illuminé mes moments les plus difficiles par votre dévouement sans faille, me permettant ainsi de surmonter les obstacles avec courage et détermination.

Votre soutien inconditionnel a été un pilier fondamental dans la réalisation de ce travail, et je ne pourrai jamais oublier l'ampleur des sacrifices que vous avez consentis pour m'accompagner dans cette démarche. Vous avez toujours été là pour moi, offrant votre amour et votre soutien sans réserve.

Je vous adresse tout mon amour et ma gratitude pour ces sacrifices précieux et pour l'immense rôle que vous avez joué dans mon parcours. Je prie pour que Dieu, le Tout-Puissant, vous accorde une meilleure santé, une longue vie et tout le bonheur que vous méritez. Merci d'avoir été toujours là pour moi, avec toute la tendresse et la générosité que vous déployez.

À mon cher mari, ***Sellami Mohamed Saddek,***

Je souhaite te remercier du fond du cœur pour ta confiance inébranlable et ton encouragement constant tout au long de ce voyage. Ta foi en moi et ton soutien ont été essentiels à la réalisation de ce travail.

Tu as su alléger les défis que j'ai rencontrés avec une patience et une compréhension infinies. Ta présence constante à mes côtés a été une source de motivation inestimable, me permettant de surmonter les obstacles avec sérénité.

Merci pour ton amour inconditionnel et pour avoir toujours cru en moi, même lorsque les moments étaient difficiles. Ton soutien a été un pilier fondamental dans mon parcours, et je suis profondément reconnaissante pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je t'exprime ma gratitude la plus sincère et tout l'amour que j'ai pour toi, en reconnaissant combien ta présence et ton encouragement ont enrichi cette aventure et fait de cette réalisation une réalité.

Dédicaces

À mes chers parents, ***CHAABNA Halima et CHINE Ali*** pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices et votre soutien tout au long de ma vie. Vous m'avez inculqué les valeurs du travail acharné, de la persévérance et de la détermination. Je vous dédie ce travail, fruit de vos efforts depuis ma naissance. Chaque page, chaque réalisation, et chaque succès sont le reflet de votre amour et de votre engagement envers mon avenir. Merci de m'avoir donné les moyens de réussir et de m'avoir toujours soutenu, peu importe les circonstances. Je vous suis éternellement reconnaissant et honoré d'être votre fille.

À mes enfants, ***Farah, Ines et Feras***, pour votre patience, votre compréhension et votre amour. Vous êtes ma source de motivation et ma plus grande fierté. Votre soutien silencieux et vos sourires m'ont donné la force de continuer même dans les moments les plus difficiles.

À mon mari, ***SELLAMI Mohamed Saddek***, Je te dédie ce travail en témoignage de ton amour, de ton soutien et de ta compréhension inépuisable. Ta confiance en moi et ton engagement envers notre vie commune ont été des piliers sur lesquels j'ai pu m'appuyer à chaque étape de ce parcours. Merci d'être mon partenaire et mon confident. Ensemble, nous avons surmonté les défis et célébré les succès, et ce travail est autant le fruit de ton soutien que de mes efforts. Je t'aime profondément et je suis infiniment reconnaissante.

À mes frères, ***Oussama et Imed Eddine*** et à ma belle sœur ***Karima*** pour votre soutien constant et vos encouragements. Votre confiance en moi a été une source d'inspiration et de motivation tout au long de ce parcours.

À mon grand-père ***CHAABNA Lakhder***, pour ses prières inlassables qui m'accompagnent chaque jour, m'apportant réconfort et force. Je suis profondément reconnaissant pour votre fierté en mes accomplissements, qui me pousse à donner le meilleur de moi-même. Vous êtes

un pilier essentiel de ma vie, et cette réalisation vous est dédiée en témoignage de mon immense gratitude et de mon affection éternelle.

À tous les membres des familles : **CHINE, CHAABNA et SELLAMI**, pour votre amour et votre soutien incommensurables. Vos encouragements et votre présence chaleureuse ont été d'un grand réconfort et m'ont aidée à surmonter les défis de ce voyage académique.

À tous ceux qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de cette thèse, je vous adresse mes remerciements les plus chaleureux et les plus sincères. Votre soutien, vos conseils et votre encouragement ont été des moteurs essentiels pour mener à bien ce travail. Merci infiniment.

Avec tout mon amour et ma gratitude.

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	I
Liste des tableaux.....	IV
Liste des figures	VII
Liste des annexes.....	IX
I. INTRODUCTION.....	1
REVUE DE LA LITTERATURE	5
II. LE DIABETE.....	6
II.1 Définition	6
II.2 Epidémiologie	7
II.2.1 Contexte mondial.....	7
II.2.2 En Afrique	8
II.2.3 En Algérie.....	9
II.3 Le diabète type 2	9
II.3.1 Les facteurs de risque du diabète type 2.....	10
II.3.1.1 Les facteurs génétiques	10
II.3.1.2 L'obésité	11
II.3.1.3 La sédentarité	12
II.3.2 Le mécanisme physiopathologique du diabète type 2	14
II.3.2.1 L'insulino-Résistance	14
II.3.2.2 Le dysfonctionnement des cellules Béta pancréatiques.....	16
III. LES COMPLICATIONS CHRONIQUES DU DIABETE TYPE 2.....	19
III.1 Les complications micro-vasculaires	20
III.1.1 La rétinopathie	20
III.1.2 La néphropathie diabétique	22
III.1.3 La neuropathie	23
III.2 Les complications macro-vasculaires	24
III.2.1 La coronaropathie	24

III.2.2	Les accidents vasculaires cérébraux (AVC).....	25
III.2.3	Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs (AOMI).....	25
IV.	LA GLYCATION DES PROTEINES	26
IV.1	Définition	26
IV.2	Mécanisme de glycation des protéines humaines	26
IV.3	Relation entre la glycation des protéines et les complications du diabète	29
IV.4	La déglycation des protéines.....	30
IV.5	Biomarqueurs de glycation	32
IV.5.1	L'HbA1c.....	32
IV.5.1.1	Structure et définition.....	32
IV.5.1.2	Méthodes de dosages.....	33
IV.5.1.2.1	Méthode de référence:.....	33
IV.5.1.2.2	Les méthodes immunochimiques	34
IV.5.1.2.3	Les méthodes chromatographiques	34
IV.5.1.3	Standardisation des méthodes du dosage	34
IV.5.1.4	Intérêt du dosage	35
IV.5.1.5	Les valeurs de référence	35
IV.5.1.6	Les difficultés d'interprétation	36
IV.5.2	La fructosamine	38
IV.5.2.1	Structure et définition.....	38
IV.5.2.2	Méthodes de dosage	38
IV.5.2.3	Les valeurs de référence	39
IV.5.2.4	Les difficultés d'interprétation	39
IV.6	La variabilité biologique de glycation	41
IV.6.1	L'index de glycation de l'hémoglobine :.....	41
IV.6.2	Le trou de glycation.....	42
IV.6.3	Facteurs influençant la variabilité biologique de glycation :.....	43

PARTIE PRATIQUE	44
I. RAPPEL SUR LES OBJECTIFS.....	45
II. MATERIEL ET METHODES	46
II.1 Type de l'étude	46
II.2 Population de l'étude	46
II.2.1 Critères de sélection.....	46
II.2.1.1 Critères d'inclusion.....	46
II.2.1.2 Critères de non –inclusion	46
II.2.1.3 Critères d'exclusion	46
II.2.2 Taille de la population d'étude	47
II.3 Déroulement de l'étude.....	47
II.3.1 Le recrutement des patients et la collecte des données	47
II.3.2 La réalisation des prélèvements sanguins et urinaires.....	48
II.3.3 L'analyse des échantillons sanguins et urinaires	48
II.3.4 La saisie des données.....	48
II.4 Le matériel	49
II.4.1 Le matériel biologique.....	49
II.4.1.1 Les prélèvements sanguins	49
II.4.1.2 Les prélèvements urinaires	49
II.4.2 Les équipements	49
II.4.3 Financement et subvention	50
II.5 Les paramètres étudiés	50
II.6 Les méthodes	51
II.6.1 Les mesures anthropométriques	51
II.6.1.1 Le tour de taille	51
II.6.1.2 Le poids.....	52
II.6.1.3 La taille	52
II.6.1.4 Calcul de l'indice de masse corporelle	52

II.6.2	Les méthodes de dosage biochimiques.....	53
II.6.2.1	Le glucose	53
II.6.2.2	La Créatinine.....	53
II.6.2.3	L'urée	53
II.6.2.4	L'acide urique	54
II.6.2.5	Le cholestérol total.....	54
II.6.2.6	Le cholestérol-HDL	55
II.6.2.7	Le cholestérol- LDL.....	56
II.6.2.8	Les triglycérides.....	56
II.6.2.9	Les protéines totales.....	57
II.6.2.10	L'HbA1c.....	57
II.6.2.11	La fructosamine.....	59
II.6.2.12	L'homocystéine	59
II.6.2.13	La vitamine B12	61
II.6.2.14	La vitamine B9	61
II.6.2.15	La micro-albuminurie.....	62
II.6.3	Le calcul du rapport micro albuminurie sur créatininurie (RAC)	63
II.6.4	Le calcul du débit de filtration glomérulaire	63
II.6.5	Le calcul des indices d'athérogénicité.....	64
II.6.5.1	Atherogenic index of plasma (AIP)	64
II.6.5.2	Le cholestérol non-HDL	65
II.6.6	Le trou de glycation ; glycation gap	65
II.6.7	Les méthodes statistiques utilisées	65
II.6.7.1	L'analyse descriptive	65
II.6.7.2	L'analyse bi variée	66
III.	Les considérations éthiques.....	68
III.1	Le consentement	68
III.2	L'anonymat et la confidentialité	68

III.3	Conflit d'intérêt.....	68
IV.	Résultats	69
IV.1	Description des caractéristiques sociodémographiques de la population	69
IV.1.1	Le sexe de la population	69
IV.1.2	L'âge de la population	69
IV.1.3	L'activité physique	70
IV.2	Description des caractéristiques anthropométriques de la population	71
IV.2.1	L'indice de masse corporelle	71
IV.2.2	Le tour de taille.....	72
IV.3	Description des caractéristiques cliniques de la population	72
IV.3.1	L'ancienneté du diabète.....	72
IV.3.2	Le traitement antidiabétique en cours.....	73
IV.3.3	Les antécédents familiaux du diabète type 2	74
IV.4	Statistiques descriptives des caractéristiques biochimiques de la population d'étude	75
IV.4.1	Evaluation de l'équilibre glycémique.....	76
IV.4.1.1	L'HbA1c.....	76
IV.4.1.2	La fructosamine.....	77
IV.4.2	Evaluation des marqueurs prédictifs de complications	78
IV.4.2.1	Le taux de l'homocystéine	78
IV.4.2.2	Bilan lipidique et indices d'athérogénécité	78
IV.4.2.2.1	Le cholestérol total.....	78
IV.4.2.2.2	Le cholestérol-HDL	79
IV.4.2.2.3	Le cholestérol-LDL	79
IV.4.2.2.4	Les triglycérides.....	80
IV.4.2.2.5	Le cholestérol non-HDL :	80
IV.4.2.2.6	L'indice d'athérogénécité plasmatique	81
IV.4.2.3	Le débit de filtration glomérulaire estimé	82
IV.4.2.4	Le rapport micro albuminurie sur créatininurie (RAC).....	82

IV.5	Etude de la corrélation entre l'HbA1c et la fructosamine.....	83
IV.6	Evaluation du trou de glycation de la population de l'étude	84
IV.6.1	Le calcul du trou de glycation	84
IV.6.2	Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques sociodémographiques :	84
IV.6.2.1	Trou de glycation et le sexe.....	84
IV.6.2.2	Trou de glycation et l'âge.....	85
IV.6.2.3	Trou de glycation et l'activité physique	85
IV.6.3	Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques anthropométriques	86
IV.6.3.1	Trou de glycation et l'IMC.....	86
IV.6.3.2	Trou de glycation et le tour de taille	86
IV.6.4	Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques cliniques.....	87
IV.6.4.1	Trou de glycation et l'ancienneté du diabète	87
IV.6.4.2	Trou de glycation et le type de traitement antidiabétique en cours.....	88
IV.6.4.3	Trou de glycation et les antécédents familiaux du diabète type 2.....	89
IV.6.5	Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques biochimiques	89
IV.7	Evaluation du profil de glycation de la population d'étude	97
IV.7.1	Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques sociodémographiques	97
IV.7.2	Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques anthropométriques.	98
IV.7.2.1	L'IMC et le profil de glycation	98
IV.7.2.2	Le tour de taille et le profil de glycation	99
IV.7.3	Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques cliniques	101
IV.7.3.1	L'ancienneté du diabète et le profil de glycation	101
IV.7.3.2	Le traitement antidiabétique en cours et le profil de glycation	101
IV.7.3.3	Les antécédents familiaux du diabète type 2 et le profil de glycation	102
IV.7.4	Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques biochimiques	102
IV.7.4.1	L'équilibre glycémique et le profil de glycation	102

IV.7.4.1.1 L'HbA1c :	102
IV.7.4.1.2 La fructosamine.....	105
IV.7.4.2 Les paramètres de la fonction rénale et le profil de glycation	106
IV.7.4.2.1 La créatinine et l'urée.....	106
IV.7.4.2.2 Le DFG.....	107
IV.7.4.2.3 Le rapport micro-albuminurie sur créatininurie	108
IV.7.4.3 Les paramètres du bilan lipidique et le profil de glycation	110
IV.7.4.4 Le risque athérogène et le profil de glycation:	113
IV.7.4.5 L'homocystéine et le profil de glycation:	115
IV.7.4.6 L'acide urique et le profil de glycation:	118
V. Discussion	120
V.1 Les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude :	122
V.1.1 Le sexe :.....	122
V.1.2 L'âge.....	124
V.1.3 L'activité physique :	126
V.2 Les caractéristiques anthropométriques et profil de glycation :	127
V.2.1 L'indice de masse corporelle :.....	128
V.2.2 Le tour de taille :.....	129
V.3 Les caractéristiques cliniques :	129
V.3.1.1 L'ancienneté du diabète :	130
V.3.2 Le traitement anti diabétique en cours :.....	132
V.3.3 Les antécédents familiaux du diabète :.....	133
V.4 La corrélation entre l'HbA1c et la fructosamine :	134
V.5 Le trou de glycation :	136
V.6 Les caractéristiques biochimiques :	136
V.6.1 La glycémie :	136
V.6.2 L'HbA1c et la fructosamine :	137
V.6.3 L'urée et la créatinine sanguines	139

V.6.3.1 Le DFGe :	140
V.6.3.2 La micro-albuminurie :	141
V.6.4 Le profil lipidique :	144
V.6.5 Les indices d'athérogénécité	146
V.6.6 L'homocystéine :	148
V.6.7 L'acide urique :	149
V.7 Les limites de notre étude :	152
V.8 Les points forts de notre étude :	153
VI. Conclusion.....	154
VII. Recommandations	156
VIII. Perspectives :	157
IX. Références bibliographiques	158
LES ANNEXES	170

Liste des abréviations

- **ADA** : American Diabetes Association
- **ADAG** : A1C-Derived Average Glucose
- **ADN** : Acide Désoxyribonucléique
- **ADO** : Antidiabétiques Oraux
- **AG** : Acides gras
- **AGE** : Advanced Glycation End Products (produits avancés de la glycation)
- **AMPK** : Adénosine Mono Phosphate Kinase
- **AVC** : Accident Vasculaire Cérébral
- **CLHP** : Chromatographie Liquide Haute Performance
- **DCCT** : Diabetes Control and Complications Trial
- **DFGe** : Débit de Filtration Glomérulaire Estimé
- **DNID** : Diabète Non Insulinodépendant
- **DT2** : Diabète Type 2
- **EDTA** : Acide Éthylènediaminetétraacétique
- **FL3P** : Fructoselysine-3-Phosphate
- **FN3K** : Fructosamine-3-Kinase
- **FPOX** : Fructosyl Peptide Oxydase
- **G6PD** : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
- **GK** : Glucokinase
- **GLP-1** : Glucagon-Like Peptide 1
- **GLUT** : Transporteur de Glucose
- **GG** : Glycation Gap
- **GPO** : Glucose Oxydase

- **HAS** : Haute Autorité de Santé
- **Hb** : Hémoglobine
- **HbA1c** : Hémoglobine Glyquée
- **HDL** : High-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de haute densité)
- **HTA** : Hypertension Artérielle
- **IDM** : Infarctus du Myocarde
- **IFCC** : International Fédération of Clinical Chemistry
- **IGH** : Index de glycation de l'hémoglobine
- **IMC** : Indice de Masse Corporelle
- **LC-MS/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse
- **LDL** : Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de basse densité)
- **MCV** : Maladie Cardiovasculaire
- **MDRD** : Modification of Diet in Renal Disease
- **NGSP** : National Glycohemoglobin Standardisation Program
- **NO** : Monoxyde d'azote
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **PKC** : Protéine Kinase C
- **POD** : Peroxydase
- **PTM** : Modifications Protéiques Post-Traductionnelles
- **RAC** : Rapport Albumine/Créatinine urinaire
- **RCV** : Risque Cardiovasculaire
- **RD** : Rétinopathie Diabétique
- **RI** : Résistance à l'insuline
- **SFD** : Société Francophone du Diabète

- **SGLT-2** : Sodium-Glucose Cotransporter 2
- **UKPDS** : United Kingdom Prospective Diabetes Study
- **UV** : UltraViolet
- **VLDL** : Very Low-Density Lipoprotein (Lipoprotéine de très basse densité)

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères diagnostiques du diabète selon l'OMS	7
Tableau 2 : La prévalence du diabète en 2021 et les projections pour 2030 et 2045	8
Tableau 3: Les différentes fractions de l'hémoglobine glyquée.....	33
Tableau 4: Objectifs glycémiques selon SFD 2023	36
Tableau 5: Critères d'interprétation de l'IMC selon l'OMS	52
Tableau 6: Définitions de la micro-albuminurie et valeurs de référence selon le RAC.....	63
Tableau 7 : Classification des stades de la maladie rénale chronique selon recommandations KDIGO et HAS 2021	64
Tableau 8 : L'interprétation des valeurs du coefficient de corrélation R de Pearson	67
Tableau 9: L'âge moyen de la population d'étude selon le sexe	69
Tableau 10 : Les caractéristiques anthropométriques de la population d'étude.....	71
Tableau 11 : L'ancienneté moyenne du diabète dans la population d'étude	72
Tableau 12 : Les paramètres biochimiques dosés de la population d'étude	75
Tableau 13: Les paramètres biochimiques calculés de la population d'étude	76
Tableau 14 : Les valeurs de l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine dosée de la population d'étude	84
Tableau 15 : Résultats du calcul du trou de glycation de la population d'étude.....	84
Tableau 16: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction du sexe	84
Tableau 17: Test de corrélation entre le trou de glycation et l'âge de la population d'étude .	85
Tableau 18: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction l'âge.....	85
Tableau 19: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction l'activité physique	85
Tableau 20 : Test de corrélation de Pearson entre le G-GAP et l'IMC.....	86
Tableau 21: Comparaison des moyennes de G-GAP selon l'IMC	86
Tableau 22 : Test de corrélation de Pearson entre le G-GAP et le tour de taille	86
Tableau 23: Résultat du test t de comparaison des moyennes de G-GAP selon le tour de taille	87
Tableau 24: Test de corrélation entre le G-GAP et l'ancienneté du diabète	87
Tableau 25 : Résultats du test t de comparaison de moyenne de G-GAP selon l'ancienneté du diabète	87
Tableau 26 : Résultats de la comparaison de moyenne de G-GAP selon le type de traitement	88

Tableau 27: Analyse post hoc de comparaison du trou de glycation selon le type de traitement antidiabétique en cours	88
Tableau 28: Résultats du test t de comparaison de moyenne de G-GAP selon les antécédents médicaux.....	89
Tableau 29: Test de corrélation entre G-GAP et les paramètres biochimiques dosés.....	90
Tableau 30: Test de corrélation entre G-GAP et les paramètres biochimiques calculés	91
Tableau 31 : Comparaison des moyennes du G-GAP selon les statuts des paramètres biochimiques dosés.....	95
Tableau 32: Comparaison des moyennes du G-GAP selon les variations des paramètres biochimiques calculés	96
Tableau 33: La comparaison des caractéristiques sociodémographiques selon le profil de glycation	98
Tableau 34: Analyse post hoc de comparaison du tour de taille selon le profil de glycation	100
Tableau 35 : Comparaison des modalités du traitement antidiabétique en cours selon le profil de glycation	102
Tableau 36: Comparaison des caractéristiques cliniques selon le profil de glycation.....	102
Tableau 37: L'analyse post hoc de comparaison de l'HbA1c selon le profil de glycation. ..	103
Tableau 38 : Comparaison des statuts de l'HbA1c selon le profil de glycation	104
Tableau 39 : Analyse de concordance entre les classes de l'HbA1c et les groupes de glyqueurs	104
Tableau 40 : L'analyse post hoc de comparaison de fructosamine selon le profil de glycation.	105
Tableau 41: Comparaison des variations de la fructosamine selon le profil de glycation ...	106
Tableau 42 : Comparaison de moyennes de la créatinine et l'urée sanguines en fonction du profil de glycation	107
Tableau 43: Comparaison de moyenne des du DFGe en fonction du profil de glycation	107
Tableau 44: L'analyse post hoc de comparaison du RAC selon le profil de glycation	108
Tableau 45: Comparaison des variations du RAC selon le profil de glycation	109
Tableau 46: Analyse de concordance entre les groupes de glyqueurs et les classes du RAC	109
Tableau 47: Estimation du risque de RAC pathologique par rapport au profil de glycation	110
Tableau 48: Comparaison des moyennes des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation	111

Tableau 49: L'analyse post hoc de comparaison des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation	111
Tableau 50: Comparaison des variations des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation	112
Tableau 51: Comparaison des moyennes des indices d'athérogénécité selon le profil de glycation	113
Tableau 52: L'analyse post hoc de comparaison des indices d'athérogénécité selon le profil de glycation	114
Tableau 53: Comparaison des variations des indices d'atherogénécité selon le profil de glycation	114
Tableau 54: Estimation du risque de cholestérol non HDL pathologique par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :	115
Tableau 55 : Analyse post hoc de comparaison l'homocystéinémie selon le profil de glycation	116
Tableau 56 : Comparaison des variations de l'hyperhomocystéinémie selon le profil de glycation	116
Tableau 57: Corrélation de Kendall entre les niveaux de l'hyperhomocystéinémie et le profil de glycation	117
Tableau 58: Estimation du risque de l'homocystéinémie pathologique par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :	117
Tableau 59 : Analyse post hoc de comparaison de l'uricémie selon le profil de glycation...	118
Tableau 60: Comparaison de la variation de l'hyperuricémie selon le profil de glycation..	119
Tableau 61 : Estimation du risque de l'hyperuricémie par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :	119

Liste des figures

Figure 1: Contribution du pancréas endocrine, du foie, des muscles squelettiques et du tissu adipeux dans la pathogenèse du DT2	17
Figure 2: La formation d'amyloïde dans les îlots (flèche rouge)	18
Figure 3 : Les organes cibles des complications du diabète	19
Figure 4: Mécanisme physiopathologique de la rétinopathie diabétique	21
Figure 5: Etapes de la formation des adduits de glycation des protéines et leur transit métabolique	28
Figure 6: Mécanisme de la déglycation des protéines	31
Figure 7: Répartition de la population d'étude selon le sexe	69
Figure 8: Répartition de la population d'étude par tranche d'âge et par sexe.....	70
Figure 9 : Répartition de la population d'étude selon l'activité physique	70
Figure 10: Répartition de la population d'étude selon leur IMC.....	71
Figure 11 : Répartition de la population selon le tour de taille.....	72
Figure 12: Répartition de la population selon l'ancienneté du diabète	73
Figure 13: Répartition de la population d'étude selon le type de traitement antidiabétique .	73
Figure 14: Répartition de la population d'étude selon les antécédents familiaux du diabète type 2	74
Figure 15 : Répartition de la population d'étude selon le taux de l'HbA1c.....	76
Figure 16: Répartition de la population d'étude selon la concentration plasmatique de la fructosamine	77
Figure 17 : Répartition de la population d'étude selon le taux de l'homocystéinémie.....	78
Figure 18: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol total	78
Figure 19: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol HDL	79
Figure 20: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol -LDL.....	79
Figure 21: Répartition de la population d'étude selon le taux des triglycérides.....	80
Figure 22: Répartition de la population d'étude selon le niveau du cholestérol non HDL.....	80
Figure 23: Répartition de la population d'étude selon l'indice d'athérogénécité plasmique ..	81
Figure 24: Répartition de la population d'étude selon les valeurs de le DFGe exprimé en ml/min/m².....	82
Figure 25: Distribution de la population d'étude selon les valeurs du RAC.....	82
Figure 26 : Courbe de régression linéaire montrant la relation entre l'HbA1c et la fructosamine	83

Figure 27: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les classes de l'équilibre glycémique.....	92
Figure 28: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les niveaux de l'homocystéinémie	93
Figure 29: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les niveaux du RAC	94
Figure 30: Répartition de la population d'étude selon le profil de glycation	97
Figure 31: Comparaison des moyennes de l'IMC selon le profil de glycation	99
Figure 32: Comparaison des moyennes de tour de taille selon le profil de glycation	100
Figure 33: comparaison des moyennes de l'ancienneté du diabète selon le profil de glycation	101
Figure 34: Comparaison des moyennes de l'HbA1c selon le profil de glycation.....	103
Figure 35: Comparaison des moyennes de fructosamine selon le profil de glycation.....	105
Figure 36: Comparaison des moyennes du RAC selon le profil de glycation	108
Figure 37: Comparaison des moyennes de l'homocystéinémie selon le profil de glycation .	115
Figure 38: Comparaison des moyennes de l'acide urique sanguin selon le profil de glycation	118

Liste des annexes

ANNEXE 01: Le consentement	171
ANNEXE 02: La fiche de renseignement.....	172
ANNEXE 03: Le financement SADIAB	174
ANNEXE 04: Fiche technique du glucose	178
ANNEXE 05: Fiche technique de la créatinine	183
ANNEXE 06: Fiche technique de l'urée	191
ANNEXE 07: Fiche technique de l'acide urique.....	197
ANNEXE 08: Fiche technique du cholestérol total	203
ANNEXE 09: Fiche technique du cholestérol HDL	209
ANNEXE 10: Fiche technique du cholestérol LDL.....	215
ANNEXE 11: Fiche technique des triglycérides	221
ANNEXE 12: Fiche techniques de la fructosamine	226
ANNEXE 13: Fiche technique de l'homocystéine	230
ANNEXE 14: Fiche technique de la vitamine B12.....	235
ANNEXE 15: Fiche technique de la vitamine B9 (Folate)	241
ANNEXE 16: Fiche technique de la micro-albuminurie.....	247

I. INTRODUCTION

Le diabète est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique, résultant d'un déficit dans la sécrétion ou l'action de l'insuline. Cette pathologie affecte le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, et peut entraîner de graves complications (1,2).

La prévalence mondiale du diabète a considérablement augmenté ces dernières années. En 2019, on comptait 463 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans atteintes de cette maladie, soit 9,3 % de cette tranche d'âge. En 2021, ce chiffre a atteint 537 millions d'adultes diabétiques, représentant 10,5 % de la population concernée, avec environ 240 millions de cas non diagnostiqués (3,4).

En Algérie, cette tendance mondiale se reflète également. L'étude stepwise de l'OMS 2016-2017 a rapporté une prévalence du diabète de 14,4 % chez les adultes âgés de 19 à 69 ans (5). En outre, la Fédération Internationale du Diabète (FID) a indiqué qu'en 2019, la prévalence du diabète chez les adultes âgés de 20 à 79 ans en Algérie était de 7,2 %, augmentant à 7,4 % en 2021, soit environ 2,4 millions de personnes touchées (3,4).

Le DT2(DT2) prédomine et représente 90 % à 95 % de tous les cas. Il pose un défi majeur à l'échelle mondiale depuis plusieurs décennies (6,7).

Ces données soulignent une progression constante et préoccupante du diabète à l'échelle mondiale et en Algérie, nécessitant une gestion renforcée de cette maladie en raison de la fréquence et de la gravité de ses complications (8).

En effet, les altérations micro et macro-angiopathiques secondaires au diabète sont les complications les plus fréquentes et affectent divers organes cibles, notamment les reins, les yeux, les pieds, le système nerveux périphérique et le système cardiovasculaire. L'apparition de ces complications est influencée par le niveau de l'hyperglycémie et la durée d'évolution du diabète (9).

Les maladies cardiovasculaires (MCV) sont la principale cause de morbidité et de mortalité chez les personnes diabétiques. Environ 21 % des diabétiques sont touchés par des coronaropathies, 10 % par des IDM et 7,6 % par des AVC. Le diabète augmente le risque de MCV à travers divers mécanismes, tels que la RI, l'inflammation, la dysfonction endothéliale et les effets toxiques du glucose sur la microvascularisation.

Ces mécanismes sont souvent accompagnés par d'autres facteurs de risque métaboliques comme l'hypertension, la dyslipidémie et l'obésité centrale (3).

Le RCV accru chez les personnes atteintes de DT2 ne peut pas être entièrement expliqué par les facteurs de risque conventionnels. Des éléments alternatifs, tels que l'homocystéine qui est un marqueur biochimique, peuvent partiellement expliquer cette augmentation (10,11). En effet, des niveaux d'homocystéinémie supérieurs à 15 $\mu\text{mol/L}$ doublent le risque de mortalité cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2 (11,12).

La néphropathie diabétique est également l'une des complications les plus fréquentes, touchant environ 40 % des patients diabétiques type 2 et peut être présente dès le diagnostic. Cette affection peut évoluer vers une insuffisance rénale terminale, nécessitant une dialyse ou une transplantation (13). À l'échelle mondiale, plus de 80 % des cas d'insuffisance rénale terminale sont causés par le diabète, l'hypertension, ou une combinaison des deux. En effet, le diabète multiplie par 10 le risque de développer une insuffisance rénale terminale par rapport à la population non diabétique (3).

La prévention des néphropathies diabétiques passe par le dépistage de l'albuminurie ou la mesure du débit de filtration glomérulaire (DFG) annuellement chez les diabétiques de type 2 (3,8).

Le rapport albumine sur créatinine urinaire, mesuré dans un échantillon recueilli lors de la première miction du matin, offre une meilleure valeur prédictive pour l'évaluation de la progression des maladies rénales. Cette méthode présente également une plus forte association avec le risque d'événements rénaux, tout en permettant de prédire le risque futur de maladie cardiaque ischémique et d'insuffisance cardiaque (14).

Les complications cardiovasculaires et rénales représentent une menace majeure pour les diabétiques. La prévention, le dépistage précoce et la gestion du diabète sont donc essentiels pour réduire l'incidence et la gravité de ces complications.

Ainsi, le contrôle glycémique du DT2 repose sur le dosage de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) effectué tous les 3 mois (8). Il s'agit d'une hémoglobine modifiée par une réaction de glycation spontanée entre le glucose et les résidus de valine N-terminaux des chaînes β de l'hémoglobine, formant le $\beta\text{N-1-désoxy fructosyl}$. Elle reste dans le sang pendant environ deux à trois mois, correspondant à la durée de vie des érythrocytes.

Le niveau d'HbA1c est stable et indépendant de l'heure de la journée, du jeûne ou de la prise alimentaire récente, ce qui en fait un bon marqueur pour le suivi du diabète sucré (15).

L'utilisation de ce marqueur a été validée par deux importantes études épidémiologiques : la DCCT (*Diabetes Control and Complication Trial*) et l'UKPDS (*United Kingdom Prospective Diabetes Study*). La première, menée auprès de patients diabétiques de type 1, a établi pour la première fois le lien entre l'équilibre glycémique, évalué par l'HbA1c, et les complications du diabète, fixant ainsi une cible d'HbA1c à atteindre pour maintenir cet équilibre à un niveau inférieur à 7 %. La seconde étude, conduite auprès de patients diabétiques de type 2, a confirmé cette relation, démontrant qu'une réduction d' 1 point de l'HbA1c entraînait une diminution de 10 à 30 % du risque de complications microangiopathiques et d'environ 15 % du risque d'infarctus du myocarde chez ces patients (16).

Diverses tentatives ont été entreprises pour évaluer la corrélation entre la glycémie moyenne sur une période de 5 à 12 semaines et les valeurs d'HbA1c. L'étude ADAG de 2008 a notamment établi une relation mathématique entre l'HbA1c et la glycémie moyenne, permettant ainsi d'exprimer et de consigner l'HbA1c sous forme de glycémie moyenne estimée, utilisant les mêmes unités (mmol/l ou g/l) que celles de l'autosurveillance glycémique (17).

Cependant, des observations ont été faites quant aux variations interindividuelles des taux d'HbA1c pour des moyennes glycémiques similaires, attribuées à des différences dans la capacité individuelle de fixer le glucose sur l'hémoglobine, souvent associées à des prédispositions génétiques, ce que l'on nomme la variation biologique de glycation (18).

En 2002, l'indice de glycation de l'hémoglobine (IGH) a été introduit comme un indicateur potentiel de variations individuelles dans le processus de glycation. Il est calculé en soustrayant de l'HbA1c mesurée celle prédite à partir d'un modèle mathématique basé sur les moyennes de glycémie (18). Une analyse secondaire de l'essai DCCT a révélé une association entre un IGH élevé et un risque accru de rétinopathie et de néphropathie chez les patients diabétiques de type 1 et 2. Ces résultats soutenaient la notion selon laquelle la variation biologique de la glycation contribue au risque de complications microvasculaires (19).

La variation biologique de glycation inclut aussi les discordances entre l'HbA1c et la fructosamine. Plusieurs études ont mesuré ces deux marqueurs chez des patients diabétiques, définissant ainsi un écart de glycation, ou "trou de glycation", qui est la différence entre l'HbA1c mesurée et l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine (20,21).

Des hypothèses ont été émises concernant l'influence du trou de glycation sur l'évolution des complications diabétiques. Des recherches ont proposé le Glycation Gap comme marqueur prédictif des complications notamment le RCV, la rétinopathie et la néphropathie (22).

Cependant, plusieurs auteurs ont souligné les ambiguïtés entourant le calcul du Glycation Gap ainsi que l'absence de standardisation dans la mesure et l'interprétation de ce paramètre. De plus, plusieurs autres facteurs non glycémiques peuvent influencer cette mesure. Tous ces arguments ont limité son utilisation et son adoption en pratique clinique (22).

En l'absence de données en Algérie sur la variabilité de la glycation, nous avons mené une étude dont l'objectif principal vise à :

- Evaluer le trou de glycation chez des patients diabétiques de type 2 compte tenu de sa fréquence par rapport au type 1.

Cette approche permettra d'explorer la possibilité d'utilisation conjointe de l'HbA1c et de la fructosamine pour mieux appréhender l'équilibre glycémique, en se basant sur la théorie du trou de glycation décrite dans diverses études précédentes.

Les objectifs secondaires de cette étude consistent à :

- Etablir la relation entre le trou de glycation et deux marqueurs prédictifs de complications : la microalbuminurie, validée comme un indicateur des complications rénales et cardiaques, et l'hyperhomocystéinémie, associée dans plusieurs études à un risque accru de maladies cardiovasculaires.
- Analyser l'impact de la variabilité de la glycation sur la micro albuminurie positive et l'hyperhomocystéinémie.

Cette étude est susceptible d'avoir des retombées socio-économiques significatives. En combinant les marqueurs de glycation tels que la fructosamine et l'HbA1c, il sera possible d'évaluer précisément le profil de glycation des patients et de personnaliser leur prise en charge. Une telle approche permettrait non seulement de prévenir l'apparition de complications, mais aussi de diminuer les coûts associés aux traitements et hospitalisations, tout en améliorant la qualité de vie des personnes atteintes de DT2.



REVUE DE LA LITTERATURE

II. LE DIABETE

II.1 Définition

Le terme « diabète sucré » provient de la combinaison du mot grec « diabetes », signifiant passer à travers, et du mot latin « mellitus », signifiant sucré. Les anciennes civilisations grecques, indiennes et égyptiennes ont identifié le caractère sucré de l'urine dans cette condition, d'où l'origine du terme « diabète sucré ». En 1889, Mering et Minkowski ont mis la lumière sur le rôle du pancréas dans le développement du diabète. L'année 1922 a marqué un tournant lorsque Banting, Best et Collip ont isolé et purifié l'insuline, une hormone produite par le pancréas des vaches à l'Université de Toronto, ouvrant ainsi la voie à un traitement efficace du diabète. Au fil du temps, des progrès significatifs ont été réalisés, aboutissant à de nombreuses découvertes et stratégies de gestion pour lutter contre ce problème croissant. Malgré cela, le diabète demeure encore aujourd'hui l'une des maladies chroniques les plus répandues dans le monde (23).

Le diabète englobe divers troubles métaboliques. Il se caractérise par une hyperglycémie, un état où la concentration de glucose dans le sang demeure élevée de manière chronique. Cela provoque des symptômes courants tels que la polyurie, la polydipsie, la fatigue, des perturbations visuelles, et une vulnérabilité accrue aux infections. Cette pathologie résulte de déficiences dans la sécrétion ou l'action de l'insuline, impliquant des dysfonctionnements du métabolisme glucidique, lipidique et protéique. Le diabète présente une évolution complexe et des manifestations variées, avec des risques de complications graves (1,2).

Le diabète est diagnostiqué si au moins un des critères établis par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) en 2006, est satisfait (Tableau 1). Les valeurs seuils pour ces critères sont utilisées pour identifier et classer les stades du diabète, allant de l'intolérance au glucose à l'anomalie de la glycémie à jeun et au diabète, en fonction des valeurs de glycémie spécifiques observées dans les tests médicaux (24).

Tableau 1 : Critères diagnostiques du diabète selon l'OMS (24).

Critères diagnostiques	Diabète	Hyperglycémie modérée à jeun	Intolérance au glucose
Glycémie à jeun après 8 heures de jeune	> 1,26 g/l (7,0mmol/l)	Entre 1,10 g/l (6,1 mmol/l) et 1,25 g/l (6,9 mmol/l)	
Confirmation de la glycémie à jeun	Vérifiée à deux reprises	Vérifiée à deux reprises	
Glycémie 2 heures après charge de 75g de glucose	≥ 2 g/l (11,1 mmol/l)		Entre 1,4 g/l (7,8 mmol/l) et 1,99 g/l (11,0 mmol/l)

En 2009, un Comité d'Experts International regroupant l'American Diabetes Association (ADA), l'Association Européenne pour l'Étude du Diabète (EASD) et la Fédération Internationale du Diabète (FID) a recommandé pour la première fois l'utilisation de l'HbA1c pour le diagnostic du diabète à un seuil d'HbA1c de 6,5 %. Cette recommandation a été adoptée dans les lignes directrices publiées par l'OMS en 2010 (25).

II.2 Epidémiologie

II.2.1 Contexte mondial

Les données sur la prévalence mondiale du diabète entre 2019 et 2021 mettent en lumière une augmentation alarmante de cette maladie (Tableau 2). En 2019, 463 millions de personnes âgées de 20 à 79 ans étaient touchées, représentant 9,3 % de cette tranche d'âge. Les projections pour 2030 et 2045 montrent une tendance à la hausse, avec des estimations de 643 millions (11,3 %) et 783 millions (12,2 %) respectivement. En 2021, le nombre d'adultes atteints de diabète est passé à 537 millions, représentant 10,5 % de cette tranche d'âge. Ces projections signalent une croissance significative de la prévalence du diabète, avec près de 240 millions de personnes vivant avec un diabète non diagnostiqué. La prévalence varie selon l'âge, avec les taux les plus bas chez les 20-24 ans (2,2 %) et les plus élevés chez les 75-79 ans (24,0 % en 2021). Les hommes ont une prévalence légèrement plus élevée que les femmes (10,8 % contre 10,2 % en 2021), avec 17,7 millions d'hommes de plus vivant avec le diabète.

Le vieillissement démographique mondial contribue à une augmentation significative des cas chez les plus de 60 ans. En 2021, près d'un adulte sur deux (44,7 % ; 239,7 millions) atteints de diabète (âgés de 20 à 79 ans) ne connaissaient pas leur état de santé. Ces estimations soulignent l'urgence d'un dépistage rapide à l'échelle mondiale. Détecter précocement la maladie revêt une importance capitale, car vivre longtemps avec un diabète non diagnostiqué peut entraîner des complications, des besoins accrus en soins de santé et des coûts associés (3,4).

Tableau 2 : La prévalence du diabète en 2021 et les projections pour 2030 et 2045 (3,4).

Aperçu	2021	2030	2045
Population mondiale totale	7,9 milliards	8,6 milliards	9,5 milliards
Population adulte (20-79 ans)	5,1 milliards	5,7 milliards	6,4 milliards
Prévalence du Diabète (20-79 ans)	10,5 %	11,3 %	12,2 %
Nombre de personnes atteintes de diabète	536,6 millions	642,7 millions	783,2 millions
Nombre de décès dus au diabète	6,7 millions	-	-

II.2.2 En Afrique

Les données de 2019 indiquent que 19,4 millions d'individus âgés de 20 à 79 ans en Afrique souffrent du diabète, correspondant à une prévalence régionale de 3,9 %. Actuellement, l'Afrique présente la prévalence la plus basse, mais cette prévalence devrait augmenter de 4,5 % en 2021 à 5,2 % en 2045, une augmentation moins significative que dans d'autres régions. Cette estimation est probablement attribuable à des niveaux d'urbanisation modestes, des problèmes de sous-nutrition et à une propension à la sous-déclaration dans la région.

Les individus âgés de 65 à 69 ans affichent les taux de prévalence les plus élevés de diabète (8,8 %) dans cette région. De surcroît, l'Afrique présente le taux le plus élevé de diabète non diagnostiqué, plus de la moitié (59,7 %) des personnes atteintes n'étant pas conscientes de leur condition médicale.

Pour les années à venir, les projections indiquent que l'Afrique connaîtra la plus forte augmentation du nombre de personnes vivant avec le diabète par rapport à d'autres régions du monde.

En 2045, on estime que le chiffre atteindra 54,9 millions parmi les adultes âgés de 20 à 79 ans. Cette progression représente plus du double du nombre enregistré en 2021 (23,6 millions) et constitue ainsi la plus importante augmentation mondiale (3,4).

II.2.3 En Algérie

L'enquête STEPwise menée en Algérie de 2016 à 2017, couvrant l'ensemble du territoire national avec une considération des variations géographiques, a révélé une prévalence alarmante du diabète dans la population générale âgée de 19 à 69 ans, évaluée à 14,4%.

Cette étude a également identifié que 8,2% des participants présentaient une hyperglycémie modérée, indiquant un risque potentiel de diabète si des mesures préventives adéquates ne sont pas mises en place. L'enquête a été menée auprès de 7450 personnes, représentant diverses régions du pays, dans le cadre de l'évaluation nationale des facteurs de risque des maladies non transmissibles (26).

Selon les données de la FID pour l'année 2019, la prévalence du diabète en Algérie chez les adultes âgés de 20 à 79 ans était de 7,2%, cette prévalence est passée à 7,4% en 2021 un pourcentage représentant environ 2,4 millions de personnes atteintes de diabète en Algérie. Ces données soulignent l'importance de stratégies de prévention et de sensibilisation pour contrôler et réduire l'incidence du diabète en Algérie (3,4).

II.3 Le diabète type 2

Le DT2(DT2) prédomine parmi les types de diabète, représentant de 90 % à 95 % de tous les cas, et pose un défi majeur à l'échelle mondiale depuis plusieurs décennies. Il se manifeste par une RI provoquée par une hyperglycémie persistante, identifiée à l'aide de tests de glycémie plasmatique. Des taux de glycémie à jeun égaux ou supérieurs à 7,0 mmol/L, ou une glycémie plasmatique deux heures après un test de tolérance au glucose oral de 75 grammes, égale ou supérieure à 11,1 mmol/L, sont considérés comme des seuils diagnostiques (6).

Le développement de cette pathologie découle principalement de deux facteurs majeurs : une déficience dans la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas et une résistance des tissus à l'insuline. La régulation précise de la libération et de l'action de l'insuline est essentielle pour répondre aux besoins métaboliques.

Tout dysfonctionnement dans ces mécanismes peut engendrer un déséquilibre métabolique conduisant à la pathogenèse du DT2 (14).

Les origines et l'évolution de cette maladie sont multifactorielles, résultant de contributions à la fois génétiques et environnementales. Alors que la prédisposition génétique au diabète peut être présente dès la naissance, l'apparition de l'hyperglycémie caractéristique du diabète survient à l'âge adulte, atteignant alors des niveaux diagnostiques.

La diversité des régimes alimentaires, le niveau d'activité physique, les stress liés à la vie familiale, professionnelle ou autres pressions et l'exposition à divers polluants et toxines, constituent autant de facteurs influençant l'expression clinique du DT2 (13).

II.3.1 Les facteurs de risque du diabète type 2

Les facteurs de risque de la DT2 comprennent une combinaison complexe de facteurs génétiques, métaboliques et environnementaux qui interagissent les uns avec les autres, contribuant à sa prévalence. Bien que la prédisposition individuelle au DT2 en raison de facteurs de risque non modifiables (ethnicité, antécédents familiaux et prédisposition génétique) ait une forte base génétique, des données issues d'études épidémiologiques suggèrent que de nombreux cas de DT2 peuvent être prévenus en améliorant les principaux facteurs de risque modifiables (obésité, faible activité physique et une alimentation riche en lipides).(27)

II.3.1.1 Les facteurs génétiques

L'héritabilité du DT2 varie de 30 à 70 %, avec un risque accru chez les frères et sœurs de patients diabétiques, multiplié par 2 à 3, en particulier chez les individus plus jeunes par rapport à ceux d'âge avancé. Certaines ethnies présentent une prévalence élevée de cette maladie. Plus de 150 gènes ou régions génétiques ont été identifiés, dont environ deux tiers sont exprimés par les cellules β , tandis qu'un nombre moindre est impliqué dans l'action de l'insuline sur ses cibles périphériques. Ces gènes fonctionnels induisent des variations quantitatives dans les paramètres qu'ils régulent. Leur impact individuel est relativement mineur, mesuré par des risques relatifs inférieurs à 1,5 pour les variants fréquents, lesquels expliquent environ 10 % de l'héritabilité de la maladie (28).

La complexité du DT2, l'hétérogénéité de la maladie, les interactions gène-gène et les mécanismes épigénétiques sont des aspects à considérer pour expliquer la majeure partie de son héritabilité.

La plupart des variants se trouvent dans des régions génomiques non codantes, et certains, comme ceux dans le gène *KCNQ1* (*canal potassique voltage –dépendant de la sous famille Q*), peuvent avoir des effets parentaux forts. Des recherches sur des variants rares, tels que les mutations de perte de fonction dans *SLC30A8* (transporteur de soluté famille 30membre 8), ouvrent des perspectives pour de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cependant, malgré ces avancées, la génétique n'a pas encore réussi à différencier efficacement les sous-classes du DT2 (29).

Les études d'association pangénomiques (GWAS : genome-wide association studies) ont permis d'identifier 90 variants génétiques associés au DT2, mais le locus de *TCF7L2* (*facteur de Transcription 7-Like 2*) représente l'effet le plus notable. Ces découvertes, bien que significatives, ne couvrent qu'une fraction de l'héritabilité du DT2. Les avancées récentes dans le séquençage nouvelle génération offrent des perspectives prometteuses en explorant des paramètres tels que les variants rares, les régions non couvertes par les SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) fréquents, ainsi que les chromosomes X, Y et l'ADN mitochondrial. Cette nouvelle ère de recherche pourrait fournir des réponses approfondies sur les mécanismes génétiques sous-jacents au DT2, ouvrant la voie à des stratégies préventives et thérapeutiques plus ciblées basées sur le profil génétique individuel (30).

II.3.1.2 L'obésité

L'obésité (indice de masse corporelle [IMC] ≥ 30 kg/m²) est le facteur de risque le plus important pour le DT2 avec une étiologie complexe d'origine génétique et environnementale. La RI se développe avec le dépôt ectopique de graisse dans le foie et les muscles. La graisse peut également s'accumuler dans le pancréas, contribuant au déclin de la fonction des cellules bêta, à l'inflammation des îlots et éventuellement à la mort des cellules bêta. Les mécanismes exacts par lesquels l'obésité induit le DT2 et la RI restent à élucider. Cependant, de nombreux facteurs jouent un rôle significatif dans le développement de ce processus pathologique, impliquant à la fois des mécanismes autonomes des cellules et des communications inter-organes.

Le DT2 survient à différents niveaux d'IMC en fonction des individus et à un IMC inférieur chez les Asiatiques et les Américains d'origine asiatique. Pour les personnes susceptibles, il peut exister un "seuil de graisse" personnel auquel survient l'accumulation de graisse ectopique, aggravant la RI et entraînant une décompensation des cellules bêta. La perte de poids améliore la sensibilité à l'insuline dans le foie et les muscles squelettiques et peut également réduire l'accumulation de graisse dans le pancréas. Les défauts dans la sécrétion d'insuline sont au moins partiellement réversibles avec la restriction énergétique et la perte de poids dans le prédiabète et le DT2 récent. Malheureusement, Le DT2 de longue durée est irréversible, même avec une perte de poids importante associée à une chirurgie bariatrique.

L'apnée obstructive du sommeil réduit la durée et la qualité du sommeil et est associée au développement de l'obésité, du syndrome métabolique et du DT2. La "culture 24 heures" moderne peut réduire la durée du sommeil et contribuer ainsi à un risque accru de DT2. Bien que des associations avec des facteurs environnementaux supplémentaires existent, aucune relation causale directe n'a été définie à ce jour (29).

II.3.1.3 La sédentarité

Un mode de vie sédentaire est un autre facteur de risque pour le DT2. L'étude Women's Health Study et l'étude Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study ont montré une réduction de 34 % et 56 % du développement du DT2 chez les participants marchant 2 à 3 heures par semaine ou au moins 40 minutes par semaine, respectivement. Il existe trois principaux avantages de l'activité physique pour retarder l'apparition du DT2. Tout d'abord, la contraction des cellules musculaires squelettiques induit une augmentation du flux sanguin vers le muscle, améliorant la captation du glucose dans le plasma. Deuxièmement, l'activité physique réduit la graisse intra-abdominale notoire, un facteur de risque connu qui favorise la RI. Enfin, l'exercice d'intensité modérée a montré une amélioration de 40 % de la captation du glucose. L'activité physique améliore la captation du glucose et la sensibilité à l'insuline, mais peut également améliorer voire inverser l'inflammation et le stress oxydatif, qui sont des facteurs prédisposant au DT2 (27).

Au cours du DT2, des molécules pro inflammatoires sont libérées dans le sang et au sein de tissus spécifiques tels que l'interleukine 6 (IL-6), la protéine C-réactive (CRP), le facteur de nécrose tumorale-alpha (TNF- α) ou l'IL-1 induisant un état inflammatoire connu sous le nom d'inflammation métabolique.

En effet, l'IL-1 est impliquée dans la réponse auto-immune aux cellules β du pancréas, l'inhibition de la fonction des cellules β et l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B), inhibant ainsi la fonction des cellules β et favorisant l'apoptose. Des données précliniques suggèrent que la résolution de l'inflammation pourrait prévenir le développement du DT2 ce qui a été étayé par des données précliniques sur des animaux.

La suppression du complexe macromoléculaire NLRP3 inflammasome, responsable de la production d'IL-1 β et d'IL-18, entraînait une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

La perte de poids délibérée demeure la thérapie fondamentale pour améliorer la sensibilité à l'insuline et, dans certaines circonstances, prévenir l'incidence du DT2 chez les personnes atteintes d'obésité et de prédiabète. L'exercice régulier et l'augmentation de l'activité physique favorisent la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL-1Ra) et le récepteur soluble du TNF (s-TNF-R), qui sont des antagonistes de l'IL-1 et du TNF- α , respectivement. Les personnes pratiquant une activité physique accrue présentent également des niveaux circulants réduits d'IL-6, d'IL-18 et de CRP, ainsi que des niveaux plus bas de leptine, une molécule associée à la CRP. L'exercice physique peut améliorer le stress oxydatif induisant le DT2 en favorisant la synthèse d'antioxydants tels que le glutathion (GSH), un antioxydant majeur non enzymatique, et d'autres enzymes antioxydantes qui entraînent une réduction à long terme des niveaux de radicaux libres.

Enfin, l'irisine est une myokine régulée par l'exercice, qui améliore la tolérance au glucose, sécrétée par le muscle squelettique et le tissu adipeux en réponse à l'exercice. Des niveaux circulants bas d'irisine ont été retrouvés chez des patients atteints du DT2 rapport aux sujets sains. De plus, les patients diabétiques atteints de MCV avaient significativement moins d'irisine sérique que les patients non atteints de MCV. Des niveaux bas d'irisine sérique ont été associés à un risque de 1,6 fois plus élevé d'incidence des MCV chez les patients atteints de DT2 (27).

II.3.2 Le mécanisme physiopathologique du diabète type 2

Selon les connaissances actuelles, les deux causes pathogènes clés responsables du DT2 sont l'insulino-résistance et le dysfonctionnement des cellules bêta. L'insulino-résistance dans les muscles squelettiques, le foie et le pancréas peut être causée par des défauts dans le transporteur du glucose et/ou la signalisation de l'insuline, tandis que le dysfonctionnement des cellules bêta est causée par le stress oxydatif et une teneur élevée en acides gras (Figure 1) (6).

II.3.2.1 L'insulino-Résistance

La RI, caractérisée par une diminution de son action inhibitrice sur la production endogène de glucose et son effet stimulant sur l'utilisation périphérique du glucose, est un trait commun à pratiquement tous les patients diabétiques de type 2. Cette condition est détectable 10 à 20 ans avant le diagnostic (31). Bien que l'insuline exerce divers effets, la sensibilité à cette hormone a été principalement explorée dans le contexte du métabolisme du glucose, au niveau du foie, des muscles (32) et le tissu adipeux (33).

L'insulino-résistance musculaire est la première anomalie identifiée dans le DT2, jouant un rôle clé dans l'insulino-résistance globale du corps. Malgré les avancées en biologie moléculaire, le mécanisme moléculaire sous-jacent au développement de la RI chez les prédisposés au DT2 reste évasif (34,35).

Des études ont clairement démontré une réduction significative de la captation du glucose par le muscle squelettique, chez les patients diabétiques de type 2 (32). Il est important de noter que la quantité de protéines responsables du transport du glucose (GLUT4) demeure normale chez les patients diabétiques et leurs descendants (17). Actuellement, l'hypothèse privilégiée est que cette perturbation du transport est plutôt due à une concentration élevée de triglycérides à l'intérieur des cellules musculaires, fréquemment observée chez ces individus "prédiabétiques" et fortement liée à leur niveau d'insulinorésistance (18). Cette modification de la composition musculaire est attribuée à un dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial des acides gras, lesquels s'accumulent dans les cellules musculaires lorsqu'ils ne sont pas correctement oxydés (33).

L'origine de l'insulinorésistance au niveau musculaire fait encore débat, mais elle est sans doute liée à une diminution de la β -oxydation, à une baisse de la densité mitochondriale et à un défaut de la voie de signalisation insulinique (36).

Simultanément, la production hépatique de glucose n'est pas suffisamment inhibée indiquant une RI au niveau hépatique (32). Ce phénomène, responsable de l'hyperglycémie des diabétiques de type 2, résulte de l'augmentation du flux de la voie de la néoglucogenèse. En effet, l'auto-régulation hépatique entre les différents flux, de la glycolyse, de la néoglucogenèse, de la glycogénolyse ou de la glycogénogenèse, est altérée par l'insulinorésistance (36).

Elle se caractérise par une diminution marquée de l'activité de la glucokinase et une augmentation catalytique de la conversion des substrats en glucose malgré la présence d'insuline. Ainsi, le foie dans le DT2 est programmé à la fois pour surproduire et sous-utiliser le glucose. Les niveaux élevés d'acides gras libres trouvés dans le DT2 pourraient également jouer un rôle dans l'augmentation de la production hépatique de glucose (37). En effet, les acyl-CoA issus du catabolisme des AG seraient capables d'activer la glucose-6- phosphatase et inhiberaient la translocation et l'activité de la glucokinase (38).

Les acides gras agiraient par le biais des DAGs (diacylglycérols) dont l'accumulation intracellulaire provoque une activation des PKC (protéine kinase C)

Celles-ci interagissent avec une multitude de signaux de transduction intracellulaire mais la cible privilégiée de ces kinases est la sous-unité β de la tyrosine kinase du récepteur à l'insuline. Ainsi, en inhibant l'autophosphorylation de ce récepteur, ce phénomène s'oppose à la transduction du signal insulinique (39,40).

De plus, des preuves récentes suggèrent un rôle important du rein dans la production de glucose par la gluconéogenèse, qui n'est pas restreinte en présence de DT2(37).

La sensibilité à l'insuline est influencée par des facteurs non génétiquement déterminés tels que le vieillissement, l'exercice et les constituants alimentaires. Cependant, malgré ces influences, une importante variation interindividuelle persiste et semble être liée à des facteurs supplémentaires. L'obésité, en particulier la répartition des graisses corporelles, apparaît comme un déterminant majeur de cette variation (41).

Diverses études suggèrent que le dépôt de graisse intra-abdominale est le principal corrélant de la sensibilité à l'insuline, bien que d'autres considèrent le dépôt de graisse sous-cutanée centrale comme le principal facteur de la réduction de cette sensibilité. Les personnes obèses avec une prédominance de graisse dans les dépôts adipeux viscéraux présentent généralement des complications métaboliques plus graves que celles avec une graisse principalement sous-cutanée (32).

L'excès de masse grasse abdominale entraîne une libération accrue d'acides gras non estérifiés (NEFA), déclenchant une réduction de la sensibilité à l'insuline au niveau hépatique et musculaire (34). Les acyls-CoA issus des acides gras libérés par le tissu adipeux, ou provenant de dépôts locaux, peuvent également entraver la captation de glucose par les tissus concernés.

Dans le foie, cela se traduit par une augmentation de la production de glucose, principalement due à une gluconéogenèse accrue, ainsi qu'une augmentation de la production de VLDL. Dans le muscle squelettique, cela résulte en une réduction de l'oxydation du glucose et du stockage du glucose sous forme de glycogène, connu sous l'effet de Randle (34,35).

Le tissu adipeux chez les individus atteints de DT2 produit une quantité accrue d'adipocytokines telles que le TNF- α , l'IL6 et la résistine, lesquelles ont pour effet d'inhiber la voie de signalisation de l'insuline. Parallèlement, la sécrétion d'adiponectine par ce tissu est diminuée, alors que cette dernière stimule normalement l'utilisation musculaire du glucose via l'activation de l'adénosine monophosphate kinase (AMPK) (31).

La RI du tissu adipeux blanc provoque, par un défaut du signal insulinaire, une diminution de la lipogenèse.

Les acides gras excédentaires sont alors stockés préférentiellement dans le muscle et le foie. Cette accumulation ectopique de graisse dans ces organes aggrave à son tour la situation en induisant des mécanismes inflammatoires et une altération de leur fonction. Au niveau du foie, cette accumulation de graisse conduit à la stéatose non-alcoolique (42).

II.3.2.2 Le dysfonctionnement des cellules Bêta pancréatiques

Pour compenser une RI à long terme et maintenir la normoglycémie, les cellules bêta pancréatiques augmentent la libération d'insuline de chaque cellule, mais le développement du diabète survient progressivement en raison d'une compensation insuffisante, telle qu'une libération d'insuline insuffisante de chaque cellule ou une masse de cellules β insuffisante. La glucotoxicité et la lipotoxicité sont deux anomalies acquises qui semblent être associées à la dysfonction de la sécrétion d'insuline. La glucotoxicité provoque l'épuisement des granules sécrétoires d'insuline dans les cellules bêta dû à une hyperglycémie chronique, réduisant la disponibilité de l'insuline pour la sécrétion. La lipotoxicité, quant à elle, se caractérise par une réduction de la sécrétion de l'insuline par la cellule bêta suite à une exposition prolongée à des niveaux élevés d'acides gras.

Ces derniers en excès entravent la croissance des cellules bêta en induisant des inhibiteurs du cycle cellulaire P16 et P18, ce qui, associé à des niveaux élevés de glucose, conduit à une réduction significative du nombre total de cellules bêta chez les patients atteints de DT2 par rapport à ceux sains. Cette diminution du nombre de cellules bêta contribue à une réponse insulinaire totale réduite. La perte de cellules bêta par apoptose semble augmenter avec la durée du diabète, et une inflammation de bas grade des cellules bêta est suggérée comme un élément contributif au développement du DT2 (6).

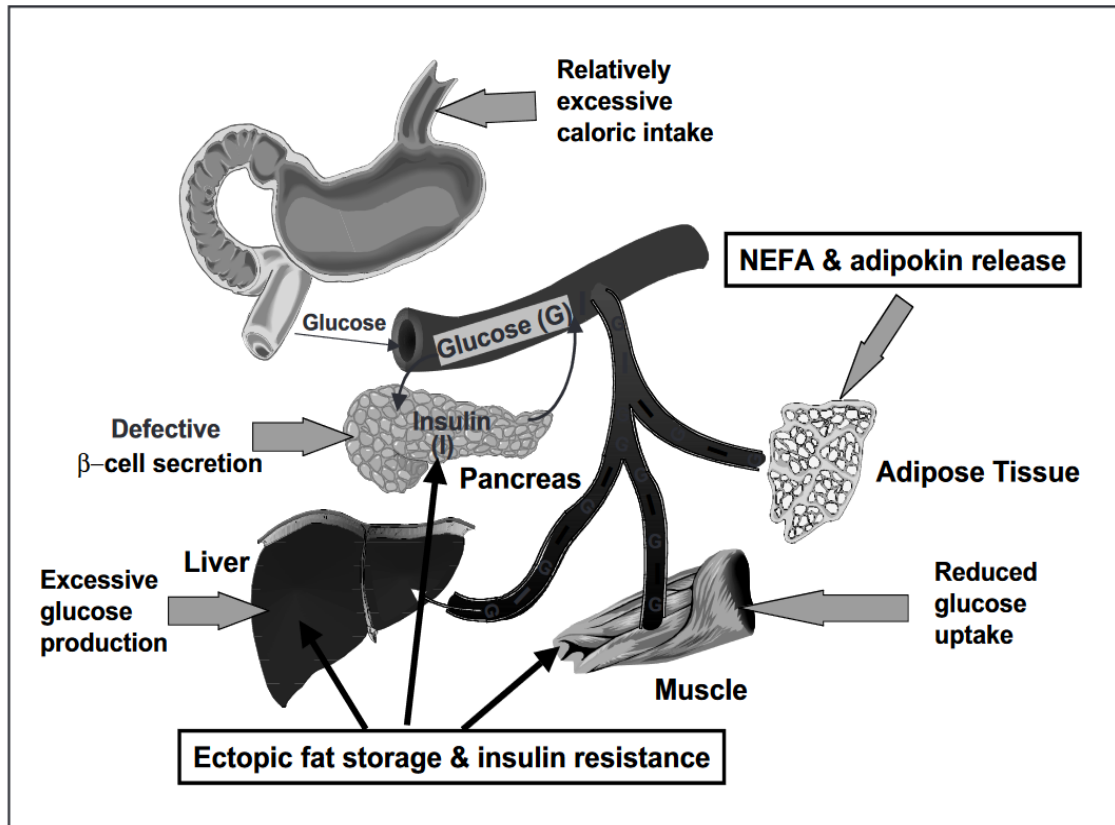


Figure 1: Contribution du pancréas endocrine, du foie, des muscles squelettiques et du tissu adipeux dans la pathogenèse du DT2 (32).

Divers mécanismes de réduction des cellules bêta ont été suggérés, incluant la mort cellulaire la trans-différenciation et la dédifférenciation. Cependant, étant donné la nature multifactorielle du diabète de type 2, les modifications pathologiques des îlots peuvent varier en fonction des différents facteurs physiopathologiques chez les patients (43,44).

Les dépôts d'amyloïde représentent des altérations pathologiques caractéristiques dans le DT2 (Figure 2).

L'amyloïde dans cette condition est composée du polypeptide amyloïde des îlots, également appelé amyline, un peptide hormonal de 37 acides aminés sécrété en tandem avec l'insuline par les cellules bêta. La formation d'amyloïde est associée à des mécanismes moléculaires complexes, notamment le clivage de la pro-amyline et la transformation du peptide en une forme normalement soluble en fibrilles insolubles.

Les dépôts d'amyloïde influent sur le microenvironnement des îlots de Langerhans, entraînant une augmentation de l'apoptose des cellules bêta. Parallèlement, les agrégats d'amyline favorisent une réponse inflammatoire, provoquant une dysfonction de la cellule bêta.

L'identification du dépôt d'amyloïde dans les îlots pourrait permettre une classification spécifique des patients atteints de diabète de type 2, indiquant des étiologies distinctes et une physiopathologie différenciée par rapport à ceux sans dépôt amyloïde.

En somme, la présence d'amyloïde dans les îlots joue un rôle crucial dans la compréhension des mécanismes pathologiques associés au DT2 (45).

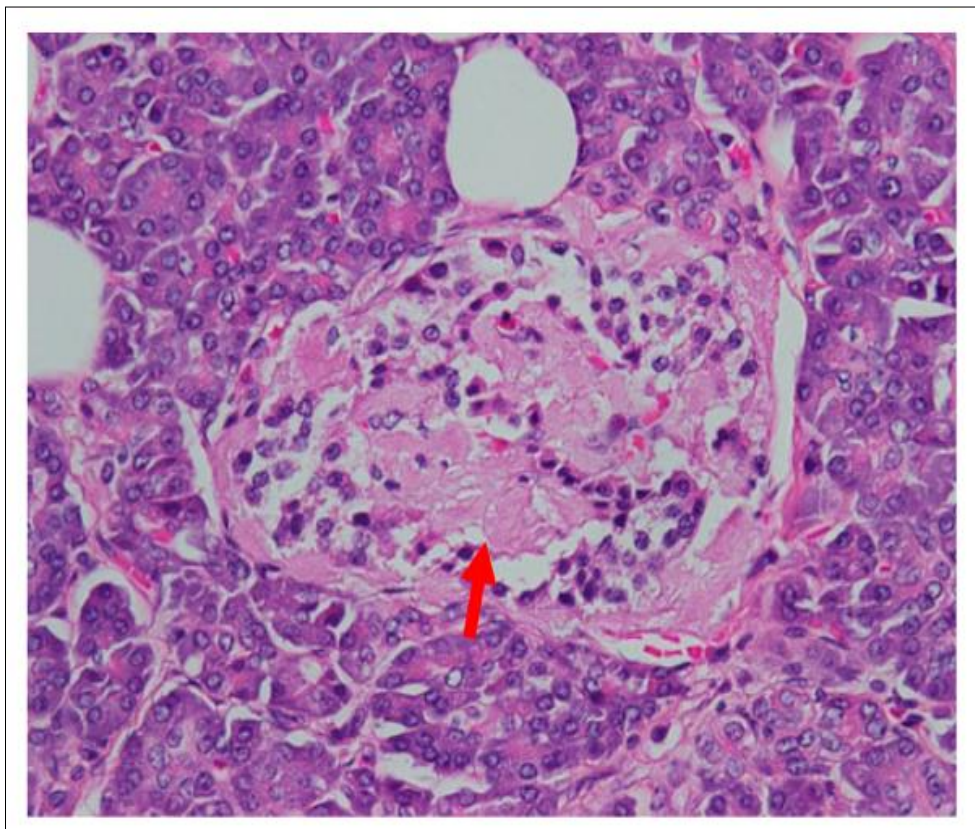


Figure 2: La formation d'amyloïde dans les îlots (flèche rouge) (45).

III. LES COMPLICATIONS CHRONIQUES DU DIABETE TYPE 2

Les complications du diabète, notamment celles découlant du diabète sucré de type 2, engendrent des altérations délétères au niveau de la fonctionnalité de pratiquement tous les organes du corps à long terme. Ainsi, la préoccupation prédominante pour les patients diabétiques réside dans les complications chroniques associées à cette pathologie. Ces dernières demeurent les principaux facteurs responsables de la morbidité et de la mortalité au sein de la population atteinte de diabète (28, 45,46).

Les complications induites par le diabète se subdivisent en deux catégories distinctes (Figure 3) : la "maladie microvasculaire," qui résulte de lésions des petits vaisseaux sanguins et des neurofibres, englobant la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie ; et la "maladie macrovasculaire," causée par des lésions au niveau des gros vaisseaux, comprenant des pathologies cardiovasculaires telles que l'IDM, l'AVC, ainsi que la maladie artériosclérotique périphérique, potentiellement mortelles (48,49).

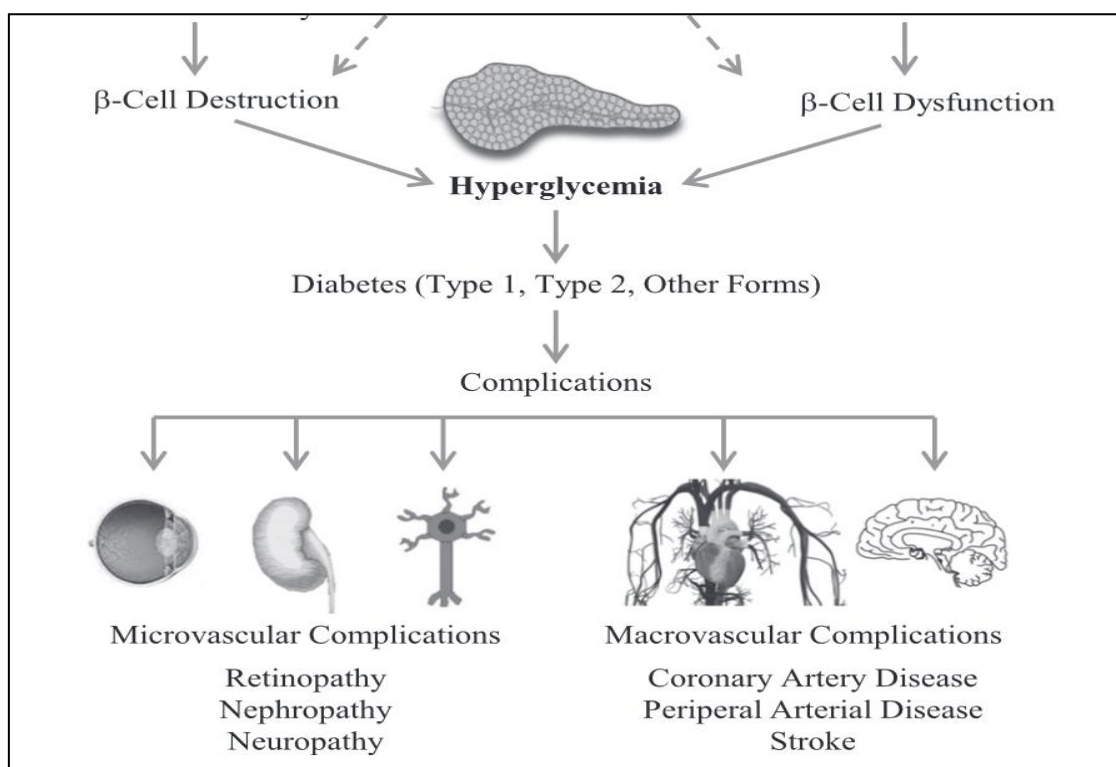


Figure 3 : Les organes cibles des complications du diabète (29).

III.1 Les complications micro-vasculaires

III.1.1 La rétinopathie

La rétinopathie diabétique (RD) est l'une des principales causes de perte de vision à l'échelle mondiale et constitue la principale cause de déficience visuelle chez les personnes âgées de 25 à 74 ans (50).

La fréquence générale de la RD chez les personnes atteintes de diabète, évaluée à l'aide de l'imagerie rétinienne, a été évaluée à 35 %. Dans 12 % de ces cas, la rétinopathie diabétique était associée à un risque pour la fonction visuelle (3).

Les effets nocifs du DT2 sur les tissus, ainsi que l'interaction complexe de divers mécanismes induisent deux altérations fondamentales au niveau des vaisseaux rétinien, à savoir une perméabilité anormale et une occlusion avec ischémie, suivie de néovascularisation (Figure 4).

Les contributions relatives de ces mécanismes varient à différentes étapes de la rétinopathie et d'un individu à l'autre. Les voies biochimiques telles que la glycation, la protéine kinase C et les voies polyol, ainsi que les altérations dans la fonction neuronale et le flux sanguin rétinien, sont particulièrement significatives dès les premiers stades de la maladie, avant même l'apparition de microanévrismes ou d'autres manifestations cliniquement visibles. Par la suite, les facteurs d'angiogenèse, tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance semblable à l'insuline 1 (IGF-1), jouent un rôle plus marqué, notamment lors du développement de la RD proliférative ou de l'œdème maculaire diabétique (50,51).

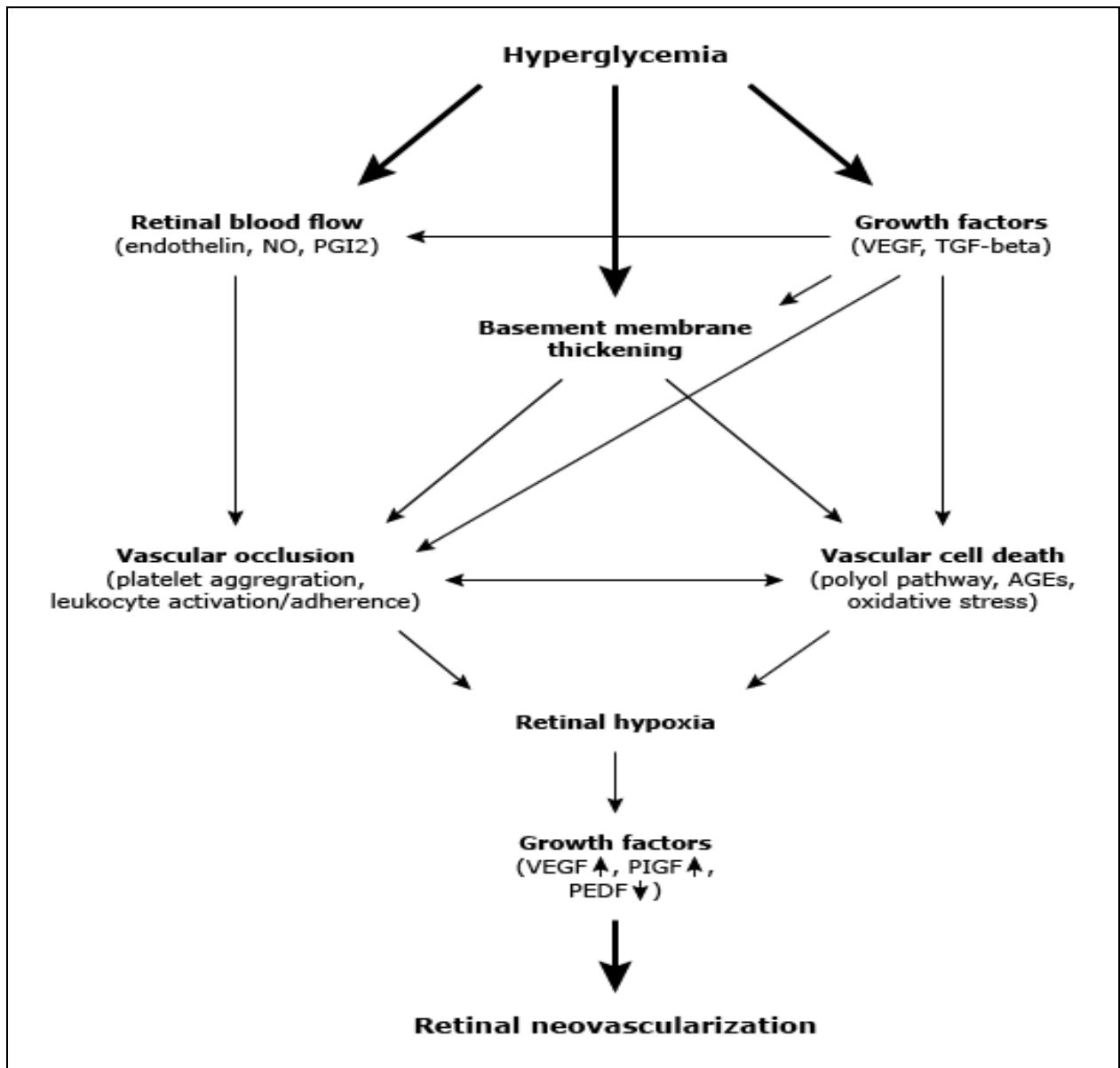


Figure 4: Mécanisme physiopathologique de la rétinopathie diabétique (50).

Des variations dans la susceptibilité génétique aux effets de l'hyperglycémie sur la rétine pourraient expliquer les différences dans la progression de la rétinopathie chez les individus diabétiques. Cette variabilité génétique peut entraîner des réponses biochimiques ou physiologiques distinctes à l'hyperglycémie à différentes étapes de la maladie. En conséquence, certains patients peuvent subir peu de dommages rétiens malgré de longues périodes d'hyperglycémie sévère, tandis que d'autres peuvent développer rapidement une rétinopathie sévère, même avec un bon contrôle de leur glycémie (50).

III.1.2 La néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique constitue une complication chronique du diabète se caractérisant par une altération graduelle des fonctions rénales. Elle se manifeste initialement par une élévation de la protéinurie, qui progresse vers une dysfonction rénale pouvant aboutir à une insuffisance rénale terminale. Les principaux facteurs de risque de cette affection sont la longue durée du diabète, un contrôle glycémique inadéquat, l'hypertension, le sexe masculin, l'obésité et le tabagisme (52,53).

La néphropathie diabétique touche 20 à 40 % des patients diabétiques, représentant la cause prédominante d'insuffisance rénale terminale. Environ 15 % des patients avec un DT2 développent une insuffisance rénale après 10 à 25 ans d'évolution de la maladie (54).

Cette pathologie résulte d'une interaction complexe de mécanismes pathophysiologiques tels que l'hyperglycémie induisant des voies métaboliques et hémodynamiques nuisibles, incluant l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, le stress oxydatif et l'inflammation.

Ces phénomènes engendrent des transformations structurelles au niveau des glomérules rénaux, ainsi que la fibrose interstitielle et l'atrophie tubulaire. Les premiers stades sont marqués par une hyperfiltration glomérulaire et une microalbuminurie évoluant vers une macroalbuminurie et une réduction du taux de filtration glomérulaire (53).

Le diagnostic repose sur l'estimation régulière de la protéinurie et l'évaluation de la fonction rénale, dès le diagnostic chez les patients de type 2. La mesure du ratio albumine/créatinine urinaire est utilisée pour détecter la microalbuminurie (52).

Le rapport albumine/créatinine obtenu à partir d'un échantillon de première urine du matin offre la meilleure valeur prédictive de la progression de la maladie rénale.

La supériorité de la capacité prédictive reflète à la fois une augmentation de l'albumine et une diminution de la génération et de l'excrétion de créatinine (14).

Un contrôle rigoureux de la glycémie et de la pression artérielle est essentiel pour ralentir la progression de la néphropathie.

III.1.3 La neuropathie

La neuropathie diabétique est une complication sérieuse du diabète qui touche les systèmes nerveux autonome et périphérique, entraînant divers troubles comme la modification du rythme cardiaque, des difficultés de régulation de la tension artérielle, des problèmes de conduction nerveuse, et d'adaptation pupillaire. Cette affection se développe progressivement et est exacerbée par un mauvais contrôle glycémique et une longue durée de la maladie. La prévalence de la neuropathie périphérique atteint environ 18 % chez les jeunes adultes avec un DT2 après huit ans de maladie, tandis que 20 % des adultes présentent des lésions nerveuses dès le diagnostic. Environ 32 % des patients peuvent développer une neuropathie 15 ans après le diagnostic de diabète de type 2. Un dépistage annuel de la neuropathie est recommandé pour tous les patients diagnostiqués avec un diabète de type 2, soulignant l'importance de la surveillance et de la gestion précoce pour prévenir l'aggravation de cette complication (55,56).

Elle est principalement causée par l'hyperglycémie chronique, qui provoque des dommages microvasculaires et limite ainsi l'apport d'oxygène et de nutriments essentiels aux nerfs. Cette condition est exacerbée par la glycation non enzymatique, où les produits finaux de glycation avancée s'accumulent et nuisent à la structure et à la fonction des tissus nerveux. Le stress oxydatif joue également un rôle critique en endommageant directement les neurones par des radicaux libres.

De plus, le manque de facteurs neurotrophiques essentiels pour la réparation neuronale et les anomalies du métabolisme de l'insuline et des lipides contribuent à la pathogenèse. Ces déficits entravent la régénération nerveuse et favorisent la dégradation des neurones. La gestion efficace du glucose et un traitement holistique du diabète sont donc cruciaux pour prévenir ou ralentir la progression de cette complication diabétique (57).

III.2 Les complications macro-vasculaires

III.2.1 La coronaropathie

La coronaropathie chez les patients diabétiques se caractérise par l'accumulation de plaques d'athérome dans les artères coronaires, ce qui conduit à une réduction du flux sanguin vers le cœur. Cette réduction peut engendrer des ischémies cardiaques et potentiellement des infarctus du myocarde, représentant ainsi une complication grave du diabète (58).

Les personnes atteintes de DT2 présentent un risque élevé de développer des maladies coronariennes, similaire à celui observé chez les non-diabétiques ayant déjà subi un événement cardiaque. Ce risque élevé s'étend même aux diabétiques sans antécédents d'infarctus, démontrant ainsi le potentiel du diabète à provoquer des lésions ischémiques importantes. Les études soulignent que jusqu'à 75% des décès chez les patients diabétiques sont causés par des maladies coronariennes, affirmant la nécessité d'une surveillance cardiovasculaire rigoureuse chez cette population (47,59).

Le développement de la coronaropathie chez les diabétiques s'explique par la combinaison de l'athérosclérose et des dysfonctionnements métaboliques spécifiques au diabète, notamment l'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'hyperhomocystéinémie. Ces conditions exacerbent un état inflammatoire systémique, augmentent la rigidité vasculaire et favorisent la formation de plaques athérosclérotiques (47,58). De plus, L'effet conjugué de l'hyperhomocystéinémie et de l'hyperglycémie chronique chez le diabétique de type 2 consiste en une atteinte athéromateuse précocement avancée. Un encrassement lipidique se forme rapidement à l'intérieur de la lumière artérielle conduisant à une plaque lésionnelle d'athérome.

En effet, le taux de mortalité sur cinq ans chez les diabétiques de type 2 hyperhomocystéinémiques est estimé à 90 % (60).

III.2.2 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC)

Les personnes atteintes de DT2 présentent un risque élevé de subir des AVC, principalement de type ischémique, dû à l'impact néfaste de l'hyperglycémie sur les vaisseaux cérébraux. Cette hyperglycémie favorise l'athérosclérose et des troubles microvasculaires, conduisant à la formation de plaques et une propension accrue à la thrombose en raison de la prévalence de facteurs pro-coagulants. Les conséquences des AVC sont particulièrement sévères chez les diabétiques, avec des taux de mortalité supérieurs et des séquelles plus marquées comparativement aux non-diabétiques.

La gestion efficace de la glycémie et des autres facteurs de RCV est cruciale pour réduire le risque d'AVC chez les patients diabétiques (58,59).

III.2.3 Artériopathie Oblitérante des Membres Inférieurs (AOMI)

La maladie des artères périphériques (MAP), très fréquente chez les patients diabétiques, se manifeste principalement par une réduction de la circulation sanguine dans les jambes et les pieds. Le diabète accélère le développement de la MAP en raison de facteurs de risque multiples, tels que l'hyperglycémie, l'hypertension, et la dyslipidémie, qui contribuent à l'accumulation de plaques athérosclérotiques dans les vaisseaux périphériques. Cette condition peut engendrer des douleurs sévères, des ulcérations, et dans les cas sévères, des amputations.

L'AOMI, exacerbée par le diabète à cause de l'effet de l'hyperglycémie sur les vaisseaux sanguins périphériques, provoque également une diminution significative de la perfusion artérielle des membres inférieurs, menant à des symptômes similaires. Le processus pathologique de l'AOMI comprend une augmentation de la viscosité sanguine, une accélération de l'athérosclérose, et une tendance accrue à la thrombose, augmentant la probabilité de manifestations ischémiques périphériques. La prévention et le traitement de l'AOMI chez les diabétiques nécessitent un contrôle glycémique strict, ainsi que la gestion de facteurs de risque vasculaire tels que l'hypertension et le tabagisme (52,58).

IV. LA GLYCATION DES PROTEINES

IV.1 Définition

La glycation des protéines est une réaction non enzymatique dans laquelle les groupes amine des acides aminés, des peptides et des protéines réagissent avec des sucres réducteurs pour former une famille complexe d'adduits covalents réarrangés et déshydratés. Il s'agit de la réaction de Maillard.

Elle est connue depuis longtemps dans la chimie des aliments pour expliquer la formation de la couleur brune et la perte de qualité des protéines dans les aliments cuits et stockés. Dans les années 1970 et 1980, il a été conclu que ce processus se produit également lentement in vivo (61).

La glycation n'a pas de fonction biologique certaine, contrairement à de nombreuses autres modifications post-traductionnelles qui impliquent des mécanismes régulateurs des processus cellulaires (62).

IV.2 Mécanisme de glycation des protéines humaines

La glycation des protéines est une réaction **spontanée et non enzymatique** entre les groupes amine des résidus N-terminaux des protéines humaines et des sucres réducteurs simples, principalement le glucose. Ce processus se déroule en plusieurs étapes (Figure 5) :

a) **Formation de la base de Schiff :**

Le groupe amine libre (de l'arginine, ou la lysine) d'une protéine réagit rapidement avec un composé carbonyle, tel que le glucose, pour former une base de Schiff labile. Cette réaction est initialement réversible.

b) **Formation du produit d'Amadori :**

La base de Schiff subit un réarrangement chimique pour former un dérivé fructosylé stable connu sous le nom de produit d'Amadori. Ce réarrangement est plus lent mais irréversible, favorisant la formation du produit final.

c) Glycation précoce :

La glycation des protéines par le glucose jusqu'à la formation de fructosamine (produits d'Amadori) est classée comme glycation précoce. Pour les résidus de lysine, le principal adduit est la N ϵ -1-désoxyfructosyl-lysine (FL), avec un substitut analytique appelé furosine.

d) Formation des produits finaux de glycation avancée (AGEs) :

À des stades ultérieurs, les produits d'Amadori (fructosamines) subissent des dégradations supplémentaires et des transformations chimiques pour former des adduits stables appelés produits finaux de glycation avancée (AGEs).

Ces AGEs incluent des structures réticulées et sont impliqués dans diverses complications pathologiques, notamment celles liées au diabète et au vieillissement.

En résumé, la glycation des protéines est initiée par la formation rapide et réversible de bases de Schiff, suivie par la formation plus lente et stable des produits d'Amadori, et se termine par la formation des AGEs à travers des transformations chimiques complexes (62,63).

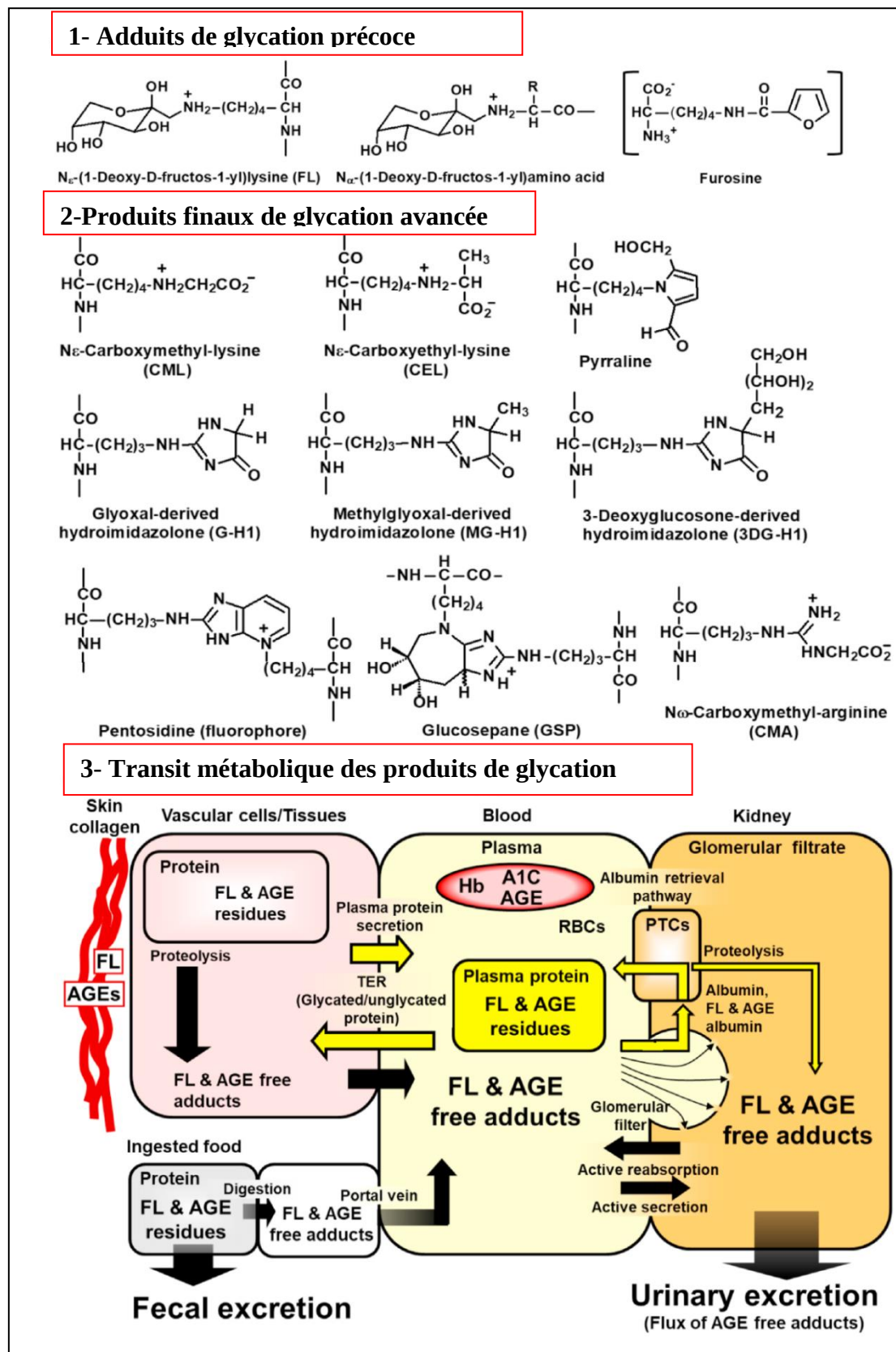


Figure 5: Etapes de la formation des adduits de glycation des protéines et leur transit métabolique (63).

IV.3 Relation entre la glycation des protéines et les complications du diabète

La glycation est cliniquement significative en raison de ses effets néfastes. Bien que les mécanismes précis ne soient pas entièrement compris, il existe de nombreuses preuves reliant la glycation au vieillissement, à l'athérosclérose et aux maladies neurodégénératives. Les produits de glycation sont connus pour jouer un rôle crucial dans les complications micro et macro-vasculaires du diabète.

Les effets de la glycation sur les protéines sont variés. Elle impacte particulièrement les protéines exposées au glucose sanguin, comme l'hémoglobine, les immunoglobulines, l'insuline, et l'albumine, ainsi que celles ayant une longue durée de vie, telles que la myéline, la tubuline et le fibrinogène, ainsi que les protéines de la matrice extracellulaire (64).

L'importance de la glycation est devenue plus reconnue avec la découverte que les protéines glyquées sont des intermédiaires pour la formation des produits finaux de glycation avancée (AGEs). Les AGEs sont un groupe chimiquement diversifié de composés formés à partir de protéines glyquées par des transformations chimiques telles que le réarrangement, l'oxydation ou la fragmentation. Il existe des preuves substantielles que la formation des AGEs est liée à la carcinogenèse, aux troubles neurodégénératifs, au vieillissement et aux maladies auto-immunes (62).

Les AGEs jouent un rôle crucial dans le développement et la progression des complications du diabète de type 1 et 2. Ils s'accumulent dans divers organes affectés par le diabète, comme les reins, exacerbant ainsi les complications. Souvent résultants d'une hyperglycémie, les AGEs induisent directement un stress oxydatif et une réponse inflammatoire, tout en renforçant indirectement la RI ou en inhibant sa sécrétion, aggravant ainsi l'hyperglycémie. Ce phénomène crée un cercle vicieux où les processus délétères s'intensifient mutuellement, menant à des complications chroniques (65).

Les produits de glycation, et les AGEs, sont des biomarqueurs importants pour le diagnostic et la gestion du diabète. Les niveaux de glycation des protéines telles que l'HbA1c et les fructosamines sont utilisés pour évaluer le contrôle glycémique sur une période donnée. De plus, la mesure des AGEs peut fournir des informations sur l'état métabolique et la progression des complications diabétiques.

Les méthodes analytiques avancées, telles que l'analyse par LC-MS/MS avec dilution isotopique stable, permettent une mesure précise des adduits de glycation, améliorant ainsi la surveillance clinique et l'évaluation des réponses au traitement.

L'accumulation d'AGEs, engendrée dans le contexte du diabète, intervient dans la pathogenèse de l'athérosclérose et des MCV à cause de son implication dans le stress oxydant et dans le processus d'inflammation. La présence de taux élevés d'AGEs dans les plaques d'athérosclérose des patients diabétiques peut être associée à la sévérité de la pathologie. Ils affectent en effet la matrice extracellulaire et contribuent à la perméabilité vasculaire, à l'inactivation du NO et causent la progression de la plaque par l'induction de cytokines pro-inflammatoires (66).

La glycation des protéines et la formation d'AGEs sont des processus essentiels à comprendre pour diagnostiquer, surveiller et traiter efficacement les complications du diabète. Les avancées dans les techniques de mesure des biomarqueurs de glycation permettent une meilleure gestion de ces complications, offrant des perspectives prometteuses pour les traitements futurs (67).

IV.4 La déglycation des protéines

Traditionnellement, la formation de protéines glyquées était considérée comme un processus biologique irréversible, conduisant inévitablement à la formation de produits de glycation avancée. Toutefois, la découverte en 2000 d'une enzyme, la fructosamine 3-kinase, a bouleversé cette vision en révélant l'existence d'un mécanisme enzymatique capable de métaboliser les fructosamines liées aux protéines. Il existe une voie catalysée par la fructosamine-3-kinase (FN3K) qui élimine les cétoamines et empêche la production d'AGE, y compris l'HbA1c (68).

La FN3K (EC 2.7.1.) est une kinase (309 AA, 37KD) qui phosphoryle la fructoselysine et une grande variété de fructosamines sur leur carbone 3, permettant ainsi de supprimer les produits de glycation avancée (AGEs) (69). Le gène codant de la FN3K est localisé sur le chromosome 17 q24 (70).

Elle est particulièrement active dans le cerveau, le cœur, les reins, les muscles squelettiques et les érythrocytes. Elle pourrait être importante pour la fonction et la survie de certaines cellules.

Son implication dans le contrôle de la glycation non enzymatique intracellulaire peut impliquer l'un ou les deux mécanismes suivants :

- 1) la phosphorylation des adduits de céto-amine sur les protéines pourrait servir de marqueur pour la dégradation des protéines glyquées par un processus protéolytique spécifique, et/ou
- 2) la formation de FL3P (frucoselysine phosphate) pourrait être un moyen d'éliminer les adduits d'Amadori des protéines glyquées (Figure 6) (69).

En conséquence, les souris avec un gène FN3K inactivé montrent une augmentation de la glycation des protéines (13). Chez l'humain, les polymorphismes nucléotidiques simples modifient l'activité de la FN3K, affectant l'HbA1c, le début du DT2 , et les mécanismes pathogéniques liés à ses complications (71).

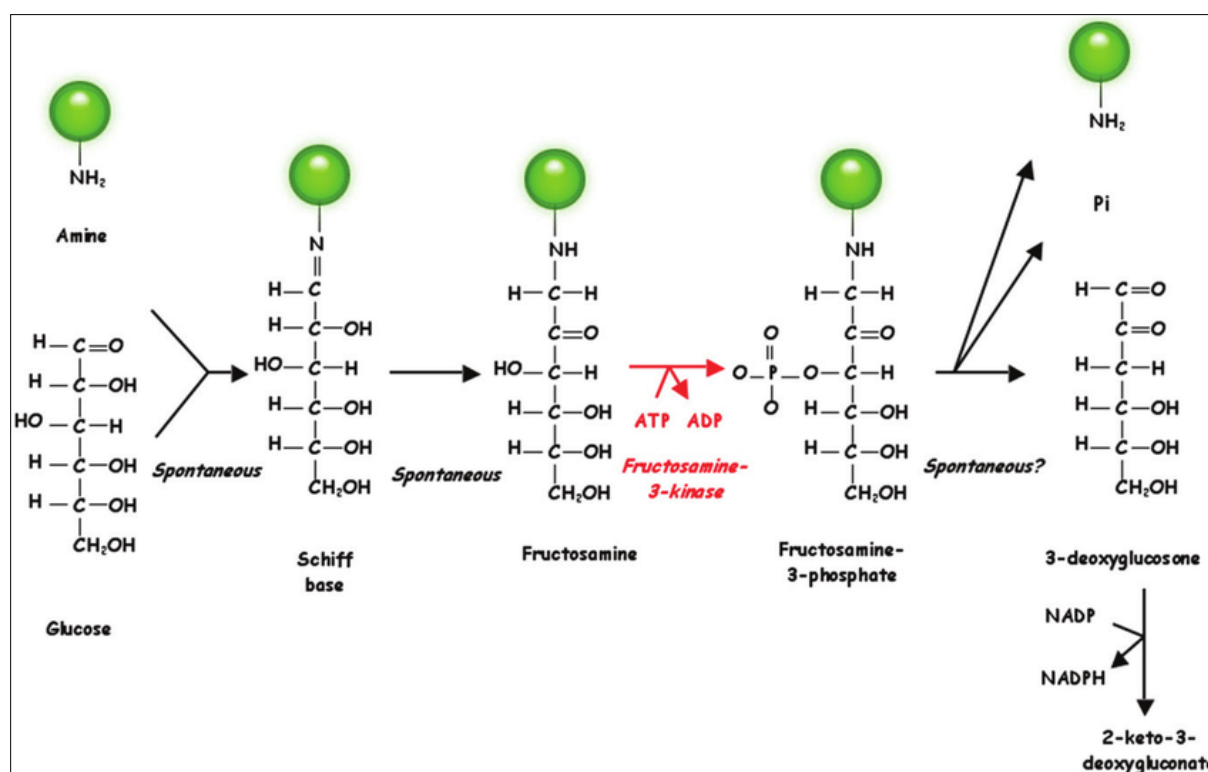


Figure 6: Mécanisme de la déglycation des protéines. (72)

IV.5 Biomarqueurs de glycation

Les biomarqueurs de glycation, comme l'HbA1c, la fructosamine, et les AGEs, sont utilisés pour évaluer le contrôle glycémique et le risque de complications diabétiques. Ces biomarqueurs sont influencés par plusieurs facteurs, y compris la concentration du substrat protéique, l'agent glyquant, la durée d'exposition, ainsi que le renouvellement et la réparation des protéines glyquées (63).

IV.5.1 L'HbA1c

L'histoire de la découverte de l'hémoglobine glyquée (HbA1c) s'étend sur près de quatre décennies. En 1968, le chercheur iranien Samuel Rahbar a découvert la présence de la molécule de l'HbA1c chez les patients atteints de diabète.

Puis, en 1976, Anthony Cerami et son équipe ont proposé l'utilisation de l'HbA1c pour la surveillance de l'équilibre glycémique chez les diabétiques ; étant donné qu'il reflétait l'exposition moyenne au glucose sanguin pendant la durée de vie des globules rouges.

Deux études épidémiologiques majeures : la DCCT en 1980 et l'UKPDS en 1991 ont validées l'utilisation de l'HbA1c comme marqueur prédictif des complications liées au diabète.(25)

La mesure de l'HbA1c est considérée comme le standard de référence pour le diagnostic et la gestion du diabète (62)

IV.5.1.1 Structure et définition

L'HbA1c est une hémoglobine qui a subi une glycation non enzymatique. Ce processus se produit lors de la réaction spontanée entre le glucose et les résidus de valine N-terminaux des chaînes β de l'hémoglobine A0, (15) ainsi que des modifications du glucose aux positions α lys-61 et β lys-66 (63) formant du β N-1-désoxy fructosyl. Le mécanisme chimique de cette glycation commence par la formation d'une base de Schiff, qui se réarrange ensuite par les réactions de Maillard, aboutissant à une molécule finale où le glucose est lié de manière covalente, appelée produit d'Amadori ou produit final de glycation avancée (AGE) (15).

Il existe d'autres formes mineures d'hémoglobine glyquée, séparées de l'A1C lors des analyses conventionnelles de chromatographie d'échange cationique utilisées en chimie clinique, représentant moins de 1 % de l'hémoglobine totale (Tableau 3) : HbA1a1, HbA1a2 et HbA1b, qui sont des adduits de β val-1 de fructose-1,6-bisphosphate, glucose-6-phosphate et pyruvate, respectivement, ainsi que HbA1d (base de Schiff aldimine) et HbA1e (adduit de fructosamine de α val-1) (63).

Tableau 3: Les différentes fractions de l'hémoglobine glyquée (63)

Nomenclature de la fraction	Pourcentage	Structure
HbA _{1a1}	0,2%	Fixation du fructose 1-6 biphosphate sur une valine située sur l'extrémité N terminale de la chaîne β
HbA _{1a2}	0,2%	Fixation glucose 6 phosphate du sur une valine située sur l'extrémité N terminale de la chaîne β
HbA _{1b}	0,5%	Fixation du pyruvate sur une valine située sur l'extrémité N terminale de la chaîne β
HbA _{1c}	4%	Fixation du glucose sur une valine située sur l'extrémité N terminale de la chaîne β
Hb glyquée diverses	1 - 1,5%	Hbglyquée sur différentes acides aminés de la chaîne α et β

Le niveau de base de l'HbA_{1c} in vivo est influencé par la déglycation des adduits de glycation par la fructosamine 3-kinase (FN3K), la durée de vie des globules rouges (environ 120 jours) et le contrôle glycémique des 90 à 120 jours précédents (68).

L'HbA_{1c} reflète la concentration moyenne de glucose sanguin sur les 120 jours précédant le test. Les niveaux de glucose des 30 jours précédant immédiatement le prélèvement sanguin représentent environ 50 % de cette valeur, tandis que ceux des 90 à 120 jours précédents ne représentent qu'environ 10 % (73).

IV.5.1.2 Méthodes de dosages

Il existe plusieurs méthodes de dosage de l'hémoglobine glyquée dont on peut trouver une méthode de référence et des méthodes courantes. Celles qui dosent spécifiquement l'HbA_{1c} et celles qui évaluent la glycation globale de la molécule

IV.5.1.2.1 Méthode de référence:

La méthode de référence couplant la CLHP à l'électrophorèse capillaire (ou à la spectrométrie de masse) a été proposée par l'International fédération of clinical chemistry (IFCC). Le paramètre mesuré est l'heptapeptide N-terminal des chaînes beta de la globine et les résultats sont exprimés en mmol d'HbA_{1c}/mol d'Hb. Cette technique est lourde, elle est utilisée pour calibrer les méthodes destinées à être utilisées par les laboratoires de routine (74).

IV.5.1.2.2 Les méthodes immunochimiques

Les anticorps monoclonaux ou poly clonaux utilisés dans ces méthodes reconnaissent le peptide N-terminale des chaînes beta modifiées par la fixation de glucose. Ces techniques ont une très bonne spécificité. Les principales interférences sont la présence de variants de l'Hb, d'Hb anormale ou d'HbF.

IV.5.1.2.3 Les méthodes chromatographiques

Le principe est fondé sur le fait que la charge nette des Hb glyquées sur l'extrémité N-terminale des chaînes beta est plus négative que celle de l'HbA0 à pH neutre. L'hémolysât est déposé sur une colonne remplie de résine chargée négativement. On élue d'abord les hémoglobines rapides: HbA1a, HbA1b, HbA1c puis la fraction principale HbA0. Le pourcentage des différentes fractions est déterminé par mesure spectrophotométrique. Cette méthode a subi depuis sa mise au point par Trivelli en 1971; de nombreuses améliorations concernant le support chromatographiques, qui ont permis des applications à la pratique clinique en utilisant des mini colonnes ou des systèmes automatisés en CLHP.

IV.5.1.3 Standardisation des méthodes du dosage

Dans les années 1990, une première tentative de standardisation a été initiée par le NGSP, utilisant une technique de chromatographie d'échange ionique. Bien que cette méthode ne soit pas entièrement spécifique à l'HbA1c, elle a longtemps été considérée comme la méthode de référence en raison de son utilisation dans de grandes études internationales telles que le DCCT.

Simultanément, la méthode IFCC a été développée. Cette technique évalue spécifiquement l'hexapeptide N-terminal glyqué des chaînes bêta de l'hémoglobine après digestion enzymatique, suivi d'une séparation et d'un dosage par CLHP en phase inverse couplée à l'électrophorèse capillaire ou à la spectrométrie de masse, ce qui la rend plus spécifique que la méthode NGSP. Cependant, les valeurs obtenues avec la standardisation IFCC sont 1,5 à 2 % plus basses que celles obtenues par NGSP/DDTC (75).

Ces différences ont suscité un débat important sur la manière d'exprimer les résultats de l'HbA1c. En réponse, lors d'une conférence de consensus en décembre 2007, les sociétés internationales de diabétologie et l'IFCC ont pris la décision suivante : toutes les méthodes de mesure de l'HbA1c doivent être basées sur la méthode IFCC et exprimées en mmol/mol d'Hb.

En 2010, de nouvelles recommandations ont confirmé l'utilisation des techniques certifiées IFCC (plus sensibles), la présentation des résultats en double unités (mmol/mol Hb et % d'HbA1c), ainsi que l'interprétation selon les seuils DCCT. La relation entre les deux méthodes de standardisation est la suivante (76):

$$\text{NGSP (\%)} = 0,0915 \times (\text{IFCC mmol/mol}) + 2,15$$

IV.5.1.4 Intérêt du dosage

Deux études épidémiologiques à grande échelle ont établi la relation entre la valeur de l'HbA1c et les complications dégénératives du diabète :

- Le DCCT (Diabetes Control and Complication Trial) chez les diabétiques type 1. Cette étude montre que la valeur d'HbA1c est corrélée au risque d'apparition des complications microvasculaires (77).
- L'UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) chez les diabétiques de type 2. Son objectif principal était de vérifier si un meilleur contrôle du diabète permettait de prévenir les complications du diabète.

Les résultats de cette étude montrent qu'une réduction de 1 % de l'hémoglobine glyquée s'accompagne d'une diminution de 30 % du risque relatif de développer des complications micro-vasculaires (néphropathie, rétinopathie, neuropathie), de 18 % du risque d'infarctus et de 25 % du risque de mortalité lié au diabète. (78)

L'HbA1c est donc un marqueur prédictif de l'apparition des complications du diabète. Ainsi, plus l'HbA1c est élevée, plus le risque de développer des complications est important (78).

La validité de l'HbA1c en tant que biomarqueur du contrôle glycémique est compromise lorsque des facteurs non glycémiques influencent les niveaux : tels que la synthèse altérée des globules rouges en cas d'insuffisance rénale, les variants instables de l'hémoglobine et le métabolisme du fer et des globules rouges dysrégulé – y compris pendant la grossesse (63).

IV.5.1.5 Les valeurs de référence

Le taux d'HbA1c chez une personne non diabétique est compris entre 4 et 6 %. Les recommandations de l'année 2023 pour les valeurs cibles de l'HbA1c sont citées dans le tableau suivant :

Tableau 4: Objectifs glycémiques selon SFD 2023(79).

Population	HbA _{1c} cible ($\leq X$ %)
DT2 sans comorbidités, EV > 5 ans	7
Cible en modifiant le mode de vie et traitements sans risque hypoglycémique	6,5
Espérance de vie < 5 ans	8
Comorbidités sévères	8
Diabète > 10 ans avec hypoglycémies ne permettant pas de tenir les 7%	8
≥ 75 ans en bonne santé	7
≥ 75 ans fragile	8
≥ 75 ans dépendante et/ou santé très altérée	9
Insuffisance rénale chronique modérée (DFG 30-59)	7
Insuffisance rénale chronique sévère ou terminale (DFG ≤ 29)	8
Patiente avec désir de grossesse	6,5
Patiente avec DT2 enceinte	6,5

EV : espérance de vie, DFG = débit de filtration glomérulaire

IV.5.1.6 Les difficultés d'interprétation

Les difficultés d'interprétation de l'HbA_{1c} peuvent être causées par plusieurs facteurs, tels que des modifications de la durée de vie des globules rouges, des altérations du processus de glycation, ou encore la présence de substances qui peuvent perturber les méthodes de mesure de l'HbA_{1c} (75,80).

a- Les surestimations :

Les conditions qui prolongent la durée de vie des globules rouges peuvent augmenter faussement les niveaux de l'HbA_{1c} :

- Anémie par carence en fer
- Anémie par carence en vitamine B12 et en acide folique due à une prolifération réduite des érythrocytes
- Asplénie fonctionnelle due à une diminution de la destruction des cellules sanguines

Les conditions qui interfèrent avec le mécanisme de glycation :

- Hypertriglycémie sévère (>1750 mg/dL)
- Hyperbilirubinémie sévère (>20 mg/dL)
- Urémie (due à la carbaminohémoglobine, 1mmol/L interfère par 0,06%)
- Consommation d'alcool (création d'un complexe avec l'acétaldéhyde)

Les médicaments et substances interférant avec les niveaux de l'HbA1c :

- Salicylates
- Opioïdes
- Intoxication au plomb

b- Les sous-estimations :

Les conditions qui raccourcissent la durée de vie des globules rouges peuvent diminuer faussement les niveaux de l'HbA1c :

- Anémie due à une perte de sang.
- Anémie hémolytique
- Splénomégalie (augmentation du renouvellement des globules rouges)
- Grossesse : effet conjugué de l'hémodilution et la durée de vie réduite des globules rouges

Les médicaments associés à une fausse diminution des niveaux de HbA1c :

- Vitamine E
- Ribavirine
- Interféron A
- Céphalosporines
- Lévofoxacine
- Pénicillines
- Anti-inflammatoires
- Quinine (peut causer une anémie hémolytique)
- Effet de la vitamine C : les résultats des différentes méta-analyses, essais cliniques sont controversés entre la diminution des niveaux d'HbA1c sous effets de la vitamine C et l'absence de modification significative.

En outre, l'HbA1c n'est pas fiable chez les patients souffrant d'hémoglobinopathie homozygote, tandis que dans les formes hétérozygotes, la fiabilité dépend de la méthode de mesure. Cependant, dans la présence de l'HbF, qu'elle soit sous forme homozygote ou hétérozygote, des valeurs faussement basses de HbA1c ont été observées. La présence d'une hémoglobinopathie doit être suspectée lorsque :

- Il existe une divergence entre la valeur de HbA1c et les mesures quotidiennes de glucose du patient
- L'HbA1c est supérieur à 15%,

Les patients atteints d'insuffisance rénale terminale présentent aussi des valeurs faussement abaissées de l'HbA1c en raison d'un taux de prolifération réduit et d'une différenciation des cellules précurseurs érythrocytaires et d'une réponse inefficace à l'érythropoïétine endogène (anémie des maladies chroniques) (75,80).

IV.5.2 La fructosamine

En plus de l'HbA1c, d'autres protéines glyquées, telles que la fructosamine et l'albumine glyquée (AG), servent de biomarqueurs pour le suivi du contrôle glycémique et la prédiction des complications diabétiques.

IV.5.2.1 Structure et définition

La fructosamine (1-amino-1-deoxy-D-fructose) ; produit de la réaction irréversible du glucose avec un acide aminé contenu dans les protéines, représentent l'ensemble des protéines plasmatiques (albumine, globulines, lipoprotéines, et autres protéines circulantes) ayant subi le phénomène de glycation et de réarrangement d'Amadori.

L'albumine représente quantitativement 60 % des protéines plasmatiques mais comme le phénomène de glycation est cumulatif et que l'albumine présente une demi-vie longue par rapport aux autres protéines plasmatiques (21 jours), le dosage de la fructosamine évalue essentiellement l'albumine (80 %) ayant subi la glycation et permet de contrôler l'équilibre glycémique sur les 2 à 3 semaines précédant le prélèvement (81).

IV.5.2.2 Méthodes de dosage

Le dosage peut être réalisé **par une méthode chimique** utilisant le bleu de nitrotétrazolium et une mesure spectrophotométrique à 540 nm du complexe formé. Les méthodes actuellement utilisées limitent les interférences causées par l'acide urique et la lipémie et sont standardisées avec une polylysine glyquée. C'est la méthode utilisée par plus de 90 % des laboratoires pratiquant ce dosage (82).

IV.5.2.3 Les valeurs de référence

Le résultat est exprimé en $\mu\text{mol/l}$ et doit être interprété en fonction de la valeur de la protéinémie totale et plus particulièrement de l'albuminémie.

Les valeurs usuelles varient selon la technique utilisée. A titre indicatif, elles sont comprises chez l'adulte non diabétique de 150 à 285 $\mu\text{mol/L}$ (méthode colorimétrique).

En cas de modification qualitative ou quantitative des protéines, elles peuvent être rapportées à la concentration des protéines totales : valeurs normales attendues : 2,8 à 3,9 $\mu\text{mol/g}$ de protéines (83).

IV.5.2.4 Les difficultés d'interprétation

a) Les variations physiologiques

Les valeurs de la fructosamine varient en fonction de plusieurs facteurs :

- Chez les enfants, les valeurs sont légèrement inférieures à celles des adultes et augmentent progressivement avec l'âge jusqu'à atteindre les niveaux adultes.
- Pendant la grossesse, les valeurs de la fructosamine peuvent être légèrement abaissées, principalement en raison de l'hémodilution relative.

Ces variations sont importantes à considérer lors de l'interprétation des résultats de la fructosamine (81).

b) Les variations pathologiques

La concentration sérique ou plasmatique des fructosamines est directement corrélée aux niveaux de glucose sanguin des deux à trois semaines précédentes. Elle est d'autant plus élevée que l'équilibre glycémique a été mauvais durant cette période.

Cependant, l'interprétation des valeurs de fructosamine peut être perturbée dans plusieurs situations pathologiques affectant le métabolisme des protéines, notamment l'albumine. Par exemple, la dysthyroïdie peut entraîner une augmentation des fructosamines en cas d'hypothyroïdie, et une diminution en cas d'hyperthyroïdie et de thyrotoxicose, en raison de la modification du turnover des protéines. De même, l'inflammation, l'insuffisance hépatique sévère, la protéinurie importante et l'insuffisance rénale (selon la méthode colorimétrique) peuvent altérer les résultats. De plus, le dosage est ininterprétable en cas de macroglobulinémie.

Les fructosamines représentent une alternative intéressante à l'HbA1c, notamment lorsque cette dernière est insuffisante pour évaluer le contrôle glycémique.

Toutefois, il n'a pas été clairement établi, contrairement à l'HbA1c, que le maintien d'un bon équilibre glycémique évalué par les concentrations circulantes de fructosamines réduisait les complications du diabète (84,85).

Dans les cas d'hypoalbuminémie, il est possible de corriger les résultats en utilisant les ratios suivants :

- Fructosamines corrigées = Fructosamines mesurées ($\mu\text{mol/L}$) x 70 / protéines totales mesurées (g/L)
- Fructosamines corrigées = Fructosamines mesurées ($\mu\text{mol/L}$) x 42 / albuminémie mesurée (g/L).

Ces ajustements permettent une interprétation plus précise des valeurs de fructosamine dans des contextes cliniques variés.

IV.6 La variabilité biologique de glycation

L'HbA1c résulte de la glycation non enzymatique des protéines intra-érythrocytaires. Son taux reflète la glycémie moyenne à laquelle les érythrocytes ont été exposés durant leur cycle de vie. En revanche, le dosage de la fructosamine évalue la glycation non enzymatique des protéines extracellulaires localisées dans le plasma, même compartiment que le glucose sanguin. Il a été observé chez 40% des patients diabétiques une discordance entre les valeurs de l'HbA1c et les moyennes glycémiques obtenues par surveillance quotidienne. Cette discordance a été également constatée entre l'HbA1c et la fructosamine. Ce phénomène est connu sous le nom de la **variabilité biologique de glycation**. Elle peut être évaluée par deux estimations l'index de glycation de l'hémoglobine (**IGH**) et le trou de glycation : glycation gap (**G-Gap**) (86).

IV.6.1 L'index de glycation de l'hémoglobine :

En 2002, l'index de glycation de l'hémoglobine (IGH) a été proposé pour la première fois comme un marqueur potentiel de différences interindividuelles de glycation. *Hempe et al.* ont calculé l'IGH comme la différence entre l'HbA1c mesurée et l'HbA1c prédite, par un modèle de régression linéaire à partir des valeurs moyennes de glycémie de 30 jours (87).

Un IGH faible correspond à une valeur d'HbA1c inférieure à celle prédite par rapport à la glycémie, suggérant un phénotype de glycation faible. En revanche, un IGH élevé indique un phénotype de glycation plus élevé de l'hémoglobine.

Une sous-étude de l'essai DCCT (Diabète Control and Complication Trial) a montré que l'IGH était un marqueur prédictif significatif de la rétinopathie et de la néphropathie. Après 7 ans de suivi, les patients appartenant aux groupes des « glyqueurs » élevés, avaient 3 fois plus de risque de rétinopathie et 6 fois plus de risque de néphropathie que le groupe des glyqueurs bas. Cette constatation appuyait le concept selon lequel la variation biologique de la glycation contribue au risque des complications micro vasculaires (88).

IV.6.2 Le trou de glycation

Cohen et al. en 2003 ont proposé une variable dérivée appelée le "Glycation Gap" (G-Gap), qui représente la différence entre l'HbA1c mesurée et l'HbA1c prédite par un modèle de régression linéaire à partir de la fructosamine (89).

Dans des études ultérieures, l'HbA1c prédite a été calculée à partir de la fructosamine mesurée simultanément, standardisée à la distribution de l'HbA1c comme suit : $FHbA1c = ((\text{Fructosamine} - \text{moyenne de la fructosamine}) / \text{écart-type de la fructosamine}) \times \text{écart-type de l'HbA1c} + \text{moyenne de l'HbA1c}$ (90,91).

Indépendamment du modèle de calcul employé pour le G-Gap, ce dernier reflétait systématiquement les variations de la capacité de glycation des protéines intracellulaires et extracellulaire.

Par conséquent, un G-Gap est négatif si l'HbA1c mesurée est plus basse que l'HbA1c calculée par rapport à la fructosamine dosée. A l'inverse, un G-Gap est positif si l'HbA1c mesurée est plus haute que l'HbA1c calculée. Enfin le GG est considéré comme nul lorsque l'HbA1c calculé et l'HbA1c dosé sont en concordance (89).

Le G-Gap a été classé en trois catégories : négatif lorsqu'il était inférieur ou égal à -1, neutre pour des valeurs comprises entre -1 et +1, et positif lorsqu'il était supérieur ou égal à +1. Cette classification correspond respectivement aux phénotypes de glycation faible, moyens et élevé (90,92).

Des hypothèses ont émergé suggérant que l'ensemble des complications diabétiques liées au déséquilibre glycémique pourrait évoluer de manière plus ou moins prononcée en fonction du trou de glycation. Plusieurs études se sont penchées sur la relation entre ce phénomène et son impact sur la macroangiopathie, le risque cardiovasculaire, ainsi que sur le développement de la rétinopathie et de la néphropathie (22,92–94).

IV.6.3 Facteurs influençant la variabilité biologique de glycation :

L'HbA1c est fortement influencée par des facteurs génétiques. Les gènes impliqués dans la modulation de l' HbA1c se situent dans des voies métaboliques affectant l'état glycémique, le métabolisme des globules rouges et d'autres processus, incluant le gène FN3K qui catalyse la déglycation de l'hémoglobine glyquée.

Chez les individus non diabétiques, la génétique explique 62 % de la variation de l' HbA1c au sein de la population, tandis que les influences environnementales et l'âge contribuent respectivement à hauteur de 23 % et 14 %. Cette influence génétique sur l' HbA1c est également observée chez les patients diabétiques (63). Un tiers de la composante héréditaire de l'A1C est partagée avec une composante héréditaire du G-Gap, suggérant un mécanisme génétiquement déterminé pour la discordance entre la fructosamine et l'A1C (67).

Un facteur déterminant de la variabilité de glycation est la perméabilité des globules rouges au glucose. Le transport du glucose à travers la membrane érythrocytaire est facilité par le transporteur GLUT1. Ce processus est réalisé en quelques secondes à température corporelle. Par conséquent, la concentration de glucose à l'intérieur des globules rouges atteint rapidement un état d'équilibre avec la concentration de glucose plasmatique. Cette concentration intracellulaire "d'équilibre" de glucose, plutôt que le taux de transport du glucose, est probablement le facteur clé influençant la glycation de l'hémoglobine.

Une différence significative du rapport [glucose intra-érythrocytaire] / [glucose plasmatique] a été observée, avec des valeurs de $0,74 \pm 0,12$ chez les glyqueurs bas et de $0,98 \pm 0,06$ chez les glyqueurs élevés ($p < 0,01$). Ces résultats suggèrent qu'il existe des différences individuelles dans la manière dont le glucose se répartit dans les globules rouges. Une variation systématique de la perméabilité au glucose pourrait ainsi constituer une source majeure de variabilité interindividuelle de l'HbA1c pour une concentration plasmatique de glucose donnée (67).



PARTIE PRATIQUE

I. RAPPEL SUR LES OBJECTIFS

- **L'objectif principal:**
 - Evaluer le trou de glycation chez les diabétiques de type 2
- **Les objectifs secondaires :**
 - Etablir la relation entre le trou de glycation et deux marqueurs prédictifs de complications : la micro albuminurie et l'homocystéinémie.
 - Analyser l'effet de la variabilité de glycation sur la micro albuminurie positive et l'hyperhomocystéinémie.

II. MATERIEL ET METHODES

II.1 Type de l'étude

Il s'agit d'une étude transversale à visée analytique réalisée chez des patients diabétiques de type 2. Le recrutement des patients a été fait lors des consultations spécialisées d'endocrinologie diabétologie dans plusieurs polycliniques, de la wilaya d'Annaba à savoir :

- Les polycliniques de la commune d'Annaba : DIDOUCHE MOURAD de la cité du 8 mai 1945 et RAHMANI MOHAMED de la cité ESAFSAF.
- La polyclinique de la commune EL BOUNI : TRAD JIRAD de la cité El-Bouni

Cette étude s'est étalée sur une période de trois ans, allant de mars 2021 à mars 2024.

II.2 Population de l'étude

L'étude a ciblé spécifiquement les sujets adultes des deux sexes atteints de diabète de type 2. Il s'agit d'un échantillonnage raisonné en définissant des critères d'inclusion spécifiques.

II.2.1 Critères de sélection

II.2.1.1 Critères d'inclusion

Ont été inclus tous les patients

- adultes des deux sexes âgés de 35 ans et plus, atteints de diabète de type 2.
- ayant au moins une année d'ancienneté de diabète sans complication connue diagnostiquée.

II.2.1.2 Critères de non –inclusion

N'ont pas été inclus dans l'étude les patients :

- atteints d'une hémoglobinopathie (drépanocytose ou thalassémie) ou d'une anémie.
- souffrant d'insuffisance rénale chronique
- fumeurs et / ou consommateurs d'alcool
- Les femmes enceintes.

II.2.1.3 Critères d'exclusion

Ont été exclus de l'étude les participants qui ne répondaient pas à l'un des critères suivants :

- La présence d'un variant de l'hémoglobine détecté sur le chromatogramme de l'HbA1c (S, C, D ou E)
- Hypovitaminose B12 et/ou B9 pouvant être à l'origine d'une hyperhomocystéinémie.

II.2.2 Taille de la population d'étude

Le nombre de sujets nécessaire dans cette étude a été calculé selon la formule :

$$n = (z)^2 p (1 - p) / d^2$$

Les paramètres de calcul sont :

- **n** = taille de l'échantillon,
- **z** = 1.96 pour un niveau de confiance de 95%
- **d** = marge d'erreur tolérée (valeur type 5%)
- **p** = prévalence estimée de la population qui présente la caractéristique.

La prévalence du diabète (types 1 et 2) en Algérie, selon l'étude STEPwise menée par l'OMS en 2017, est estimée à 14,4% chez les personnes âgées de 18 à 69 ans, tandis que la prévalence spécifique du DT2est de 12,96% (26). Pour notre étude, une taille d'échantillon de 162 participants était nécessaire, avec un niveau de confiance de 95%.

Cependant, l'étude cible une sous-population spécifique de patients atteints de DT2sans complications connues, ce qui pourrait entraîner une sous-estimation de la taille de l'échantillon. En raison de l'absence de données de prévalence spécifiques et représentatives de cette sous-population, et pour accroître la puissance statistique de l'étude, une majoration de 5 % a été appliquée, portant ainsi le nombre de participants requis à 170.

Au total, 274 sujets ont été recrutés. Parmi eux, 36 ont été exclus en raison d'une hypovitaminose B12 et/ou B9 et 68 à cause de la présence d'un variant d'hémoglobine. Finalement, 170 sujets ont été inclus dans l'étude.

II.3 Déroulement de l'étude

Les différentes étapes de l'étude comprenaient :

II.3.1 Le recrutement des patients et la collecte des données

Cette étape a été réalisée au moment des consultations médicales. Chaque patient a donné son consentement éclairé comme spécifié dans l'**ANNEXE 1**, comprenant une explication détaillée des objectifs de l'étude, des procédures impliquées, ainsi que de l'utilisation prévue des informations recueillies. Les données ont été collectées lors des entretiens médicaux à l'aide d'une fiche de renseignement structurée (**ANNEXE 2**) couvrants plusieurs items regroupés en volets :

- Identification du patient
- Situation sociodémographique
- Les habitudes de vie : l'exercice physique pratiqué par le patient qui comprend : (95)
 - **La sédentarité** : les déplacements en voiture ou en autres véhicules motorisés, les activités sédentaires (regarder la télévision, lire, écrire, travailler sur ordinateur, etc.) et toutes les activités réalisées en position allongée ou semi-allongée.
 - **Les activités physiques quotidiennes**, généralement réparties en trois catégories : *la marche, les tâches domestiques* (ménage, bricolage, jardinage, etc.), et *les activités effectuées dans un contexte professionnel ou scolaire*. Ces activités sont généralement d'intensité modérée.
 - **Les activités sportives régulières** à raison de 2 à 3 fois par semaine (aérobic, musculation, zumba....)
- Les mesures anthropométriques : incluant la taille, le poids, le tour de taille, l'indice de masse corporelle (IMC).
- Les antécédents familiaux du DT2
- Le traitement antidiabétique en cours

II.3.2 La réalisation des prélèvements sanguins et urinaires

Ils ont été effectués au laboratoire de biochimie de l'Hôpital IBN SINA par un personnel qualifié. Ces prélèvements ont été programmés sur rendez-vous préalable lors de la consultation de diabétologie, et requièrent que les patients respectent un jeûne de 10 à 12 heures. Les échantillons sanguins ont été prélevés en respectant les conditions pré-analytiques pour chaque paramètre dosé. Les échantillons urinaires ont été acheminés par les patients le jour même.

II.3.3 L'analyse des échantillons sanguins et urinaires

Cette étape a été réalisée également au laboratoire de biochimie de l'Hôpital IBN SINA. Le dosage des différents paramètres sanguins et urinaires a été réalisé par des méthodes biochimiques déjà validées et adaptées à nos auto-analyseurs.

II.3.4 La saisie des données

Les résultats des analyses effectuées ont été validés, consignés et sauvegardés directement dans le logiciel de gestion des analyses de notre laboratoire avant d'être mises à disposition des patients.

Parallèlement, un deuxième enregistrement a été entrepris en utilisant le logiciel SPSS 20, après la création d'une base de données dédiée à l'étude.

II.4 Le matériel

II.4.1 Le matériel biologique

II.4.1.1 Les prélèvements sanguins

Les échantillons ont été collectés dans des tubes spécifiques à savoir :

- **Un tube sec** (5ml de sang veineux) pour le dosage de divers paramètres dans le sérum, notamment le glucose, la créatinine, l'urée, l'acide urique, les protéines totales, le cholestérol total, le cholestérol-HDL, le cholestérol-LDL, les triglycérides, les folates, la vitamine B12.
- **Deux tubes EDTA** (3ml de sang veineux) ; un tube pour le dosage sur sang total de l'HbA1c, et un tube pour le dosage plasmatique de la fructosamine et l'homocystéine.

Il est important de noter que, pour le dosage de l'homocystéine, le prélèvement a été immédiatement placé dans de la glace pour être rapidement centrifugé en vue d'un dosage immédiat, ou conservé pour un dosage ultérieur.

II.4.1.2 Les prélèvements urinaires

Il s'agit d'échantillons d'urines matinales fraîchement émises le matin à jeun, dans des tubes secs de 5ml, acheminés par les patients le jour même du rendez-vous pour la réalisation des prélèvements sanguins.

Ces échantillons ont été destinés au dosage de la micro-albuminurie. Le dosage de la créatininurie a été réalisé après leur centrifugation et dilution au 1/10^{ème}.

Nous avons opté pour le prélèvement unique du matin, pour des raisons de difficulté de la collection des urines de 24 heures. Par conséquent, les résultats ont été exprimés par rapport à la créatininurie.

Comme pour les analyses sanguines, les dosages urinaires pouvaient être effectués le jour même ou différés. Pour chaque paramètre les conditions de conservation ont été respectées.

II.4.2 Les équipements

Pour la réalisation des analyses des paramètres de l'étude nous avons eu besoin :

- Du matériel pour les prélèvements sanguins.
- Pèse-personne mécanique (STARCARE)
- Ruban mètre.
- Centrifugeuse de paillasse.
- Micropipettes de différents volumes et les embouts adaptables respectifs.
- Portoirs.

- Congélateur -20° C.
- Les automates :
 - **L'analyseur multi paramétrique INTEGRA COBAS 400 PLUS** de la société Roche Diagnostics pour le dosage du : glucose, la créatinine (sanguine et urinaire), l'urée, l'acide urique, les protéines totales, le cholestérol total, le cholestérol-HDL, le cholestérol-LDL, les triglycérides, la fructosamine, l'homocystéine et la micro-albuminurie
 - **L'analyseur multi paramétrique COBAS E411** de la société Roche Diagnostics pour le dosage de : des folates et la vitamine B12
 - **L'analyseur D10** de la société BIORAD pour le dosage de l'HbA1c
- Les réactifs pour l'analyse des différents paramètres étudiés
- Les calibrants des méthodes utilisées pour les différents paramètres étudiés à savoir :
 - **Le calibrant multiparamétriques CFAS** : pour le dosage du glucose, la créatinine, l'urée, l'acide urique, les protéines totales, le cholestérol total, les triglycérides.
 - **CFAS lipids** pour le dosage du cholestérol-HDL et le cholestérol-LDL.
 - **CFAS PUC** pour le dosage de la micro-albuminurie
 - **Precimat fructosamine** pour le dosage de la fructosmine
 - **HCYS Calibrator Kit** pour le dosage de l'homocystéine
 - **VIT B12 Calset** pour le dosage de la vitamine B12
 - **Folate Calset** pour le dosage de la vitamine B9
- Des sérums de contrôles à deux niveaux ; normal et pathologique pour la validation des résultats.

II.4.3 Financement et subvention

Une bourse de recherche attribuée à l'occasion du 23ème congrès national de la Société Algérienne de Diabétologie (SADIAB) a été accordée pour soutenir la réalisation de cette étude. (ANNEXE 3). Le financement a été alloué par la SADIAB pour, couvrir les besoins en réactifs de laboratoire nécessaires à la conduite de l'étude entreprise.

II.5 Les paramètres étudiés

Dans le cadre de la réalisation de cette étude, divers paramètres ont été étudiés. Ils ont été classés en plusieurs catégories : sociodémographiques, anthropométriques, cliniques et biochimiques.

Les **paramètres sociodémographiques** incluant des informations telles que le sexe, l'âge, le et l'activité physique des participants. Ces données permettent d'établir des éventuelles corrélations entre les caractéristiques démographiques et le trou de glycation chez les diabétiques type 2

Les **paramètres anthropométriques** mesurent des aspects physiques des participants, notamment l'indice de masse corporelle (IMC) et le tour de taille. Ces mesures sont essentielles pour évaluer le risque associé à l'obésité.

Les **paramètres cliniques** couvrant plusieurs aspects ; comme l'ancienneté, les comorbidités associées, les antécédents familiaux du diabète, et le traitement anti-diabétique en cours.

Les **paramètres biochimiques dosés** au niveau sanguin et urinaire. Parmi lesquels, la glycémie, l'HbA1c, la fructosamine, les protéines, l'urée, la créatinine, l'homocystéine, la vitamine B12, la vitamine B9, et le bilan lipidique (cholestérol total, cholestérol HDL, LDL, et triglycérides) pour les dosages sanguins. Pour les paramètres urinaires, le dosage de la microalbuminurie et la créatininurie. Ces analyses fournissent des informations précises sur l'état métabolique et la fonction rénale des patients diabétiques.

Enfin, les **paramètres biochimiques calculés** comprennent des indices dérivés des mesures précédentes, comme le rapport albuminurie sur créatininurie, l'estimation du débit de filtration glomérulaire (DFG e), et les indices d'athérogénécité. Ces calculs permettent d'évaluer le risque de complications cardiovasculaires et rénales chez les patients diabétiques.

II.6 Les méthodes

II.6.1 Les mesures anthropométriques

II.6.1.1 Le tour de taille

Pour prendre la mesure correctement, nous avons suivi le protocole de mesure du tour de taille d'après l'OMS, 2008 :

- Effectuer la mesure à la fin d'une expiration normale, avec les bras détendus de chaque côté du corps, en suivant la ligne axillaire jusqu'au point médian entre la partie inférieure de la dernière côte palpable et la crête iliaque.
- Se positionner à côté du participant et marquer la base de la dernière côte et la crête iliaque avec un feutre fin.
- Localiser le point médian entre ces deux repères et le marquer

- Maintenir une extrémité du ruban à tension constante sur le point marqué et demander au participant d'enrouler le ruban autour de sa taille, en veillant à ce qu'il soit horizontal dans le dos et sur le ventre.
- S'assurer que les participants restent debout, les pieds joints, les bras sur les côtés avec les paumes vers l'intérieur, et leur demander d'expirer doucement.
- mesurer la circonférence de la taille et lire la mesure au dixième de centimètre sur le ruban. (96)

Nous avons retenu pour la définition de l'obésité abdominale, un tour de taille (TT) : (96)

- $TT \geq 102$ cm chez l'homme
- $TT \geq 88$ cm chez la femme

II.6.1.2 Le poids

Le poids des participants a été mesuré au laboratoire par l'enquêteur principal à l'aide d'un pèse personne. Il a été exprimé en kilogramme

II.6.1.3 La taille

La taille des participants a été mesurée au laboratoire par l'enquêteur principal à l'aide d'un stadiomètre mural. Elle a été exprimée en mètre

II.6.1.4 Calcul de l'indice de masse corporelle

Il correspond au poids en kilogrammes divisé par le carré de la taille en mètres (kg/m^2).

$$\text{IMC} = \frac{\text{Le poids (Kg)}}{\text{La taille (m}^2\text{)}}$$

Selon l'OMS, une personne dont l'IMC est égal ou supérieur à 25 est considérée comme étant en surpoids et une personne ayant un IMC de 30 ou plus est considérée comme obèse.(97)

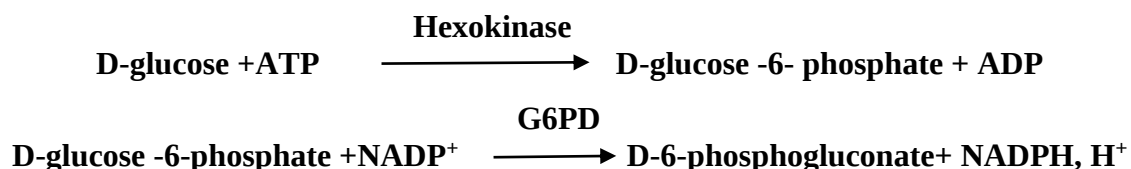
Tableau 5: Critères d'interprétation de l'IMC selon l'OMS (96)

IMC (kg/m^2)	Interprétation
< 18,5	Maigre
18,5 – 25	Normal
25 – 30	Surpoids
30 – 40	Obésité modérée
> 40	Obésité sévère

II.6.2 Les méthodes de dosage biochimiques

II.6.2.1 Le glucose

Le dosage du glucose a été réalisé par la méthode enzymatique cinétique UV à l'hexokinase, considérée comme la méthode de référence, selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 4)



G6PD= Glucose 6phosphate désyhdrogénase

La concentration de NADPH, H⁺ formé est directement proportionnelle à la concentration de glucose. Elle est déterminée en mesurant l'augmentation de l'absorbance à **340 nm**

- **Les valeurs de référence** chez l'adulte à jeun comprise entre 4,11 et 5,89 mmol /l

II.6.2.2 La Créatinine

La créatinine a été dosée par la méthode colorimétrique cinétique basée sur la méthode de Jaffé compensée selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 5)

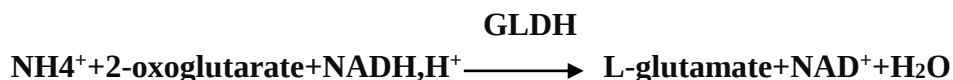
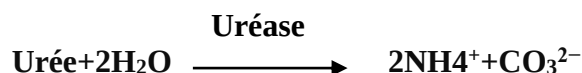


La vitesse de formation du complexe coloré est proportionnelle à la concentration en créatinine dans l'échantillon. L'absorbances est mesurée à 505 nm pendant 10 min.

- **Les valeurs de référence:**
 - Sérum : Adultes Hommes 62-106 µmol/L
Adultes Femmes 44-80 µmol/L
 - Les urines : 1ère miction du matin : Hommes 3,45-22,9 mmol/L
Femmes 2,47-19,2 mmol/L

II.6.2.3 L'urée

Le dosage de l'urée a été réalisé par la méthode enzymatique cinétique UV à l'uréase et la glutamate déshydrogénase (GDH) selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 6)



GLDH: Glutamate désyhdrogénase

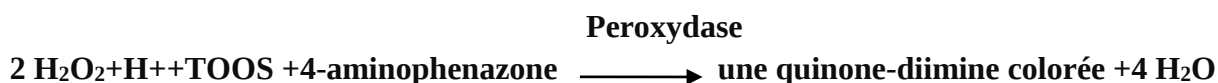
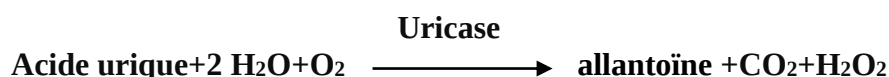
La vitesse de diminution de la concentration de NADH, H^+ est directement proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon et est mesurée photométriquement à **340nm**

- **Les valeurs de référence** : Chez l'adulte de 18 à 60 ans 2,14 – 7,14 mmol/L
Chez l'adulte de 60 à 90 ans 2,86 – 8,21 mmol/L

Quelque
soit le sexe

II.6.2.4 L'acide urique

Le dosage de l'acide urique a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique en point final (réaction du Trinder) selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 7)

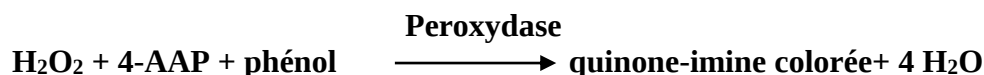
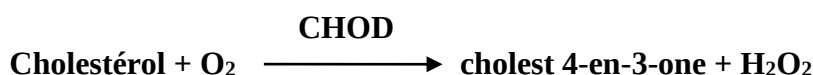
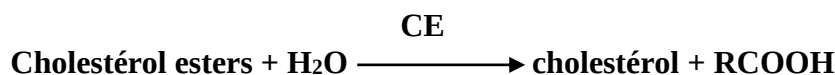


L'intensité de la coloration de la quinone-diimine formée est directement proportionnelle à la concentration d'acide urique. Elle est déterminée par la mesure de l'absorbance en à 546nm.

- **Les valeurs de référence:**
 - Hommes : 202,3 à 416,5 $\mu\text{mol/L}$
 - Femmes: 142,8 à 339,2 $\mu\text{mol/L}$

II.6.2.5 Le cholestérol total

Le dosage du cholestérol a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique en point final selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 8)



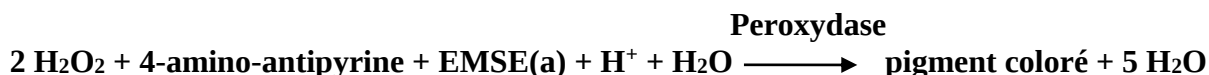
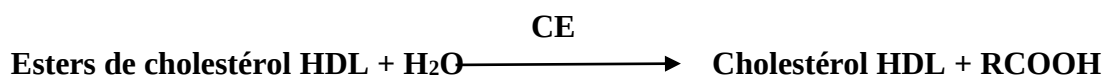
CE=Cholestérol estérase, CHOD=Cholestérol oxydase

L'intensité de la coloration de la quinone-imine formée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol. Elle est déterminée en mesurant l'absorbance à **512nm**.

- **Les valeurs de référence** du cholestérol est < 5,2 mmol/L, quelque soit le sexe.

II.6.2.6 Le cholestérol-HDL

Le dosage du cholestérol-HDL a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique homogène. Les lipoprotéines non-HDL telles que LDL, VLDL et chylomicrons sont combinées avec des polyanions et un détergent pour former un complexe soluble dans l'eau. Dans ce complexe, la réaction enzymatique de cholestérol estérase (CE) et cholestérol oxydase (CHOD) envers les lipoprotéines non-HDL est bloquée. Finalement, seules les particules de HDL peuvent réagir avec CE et CHOD selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 9)



CE=Cholestérol estérase, CHOD=Cholestérol oxydase

[(a) N-éthyl-N-(3-méthylphényl)-N'-succinylethylènediamine]

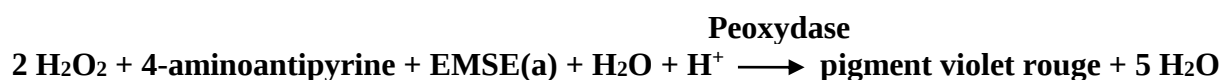
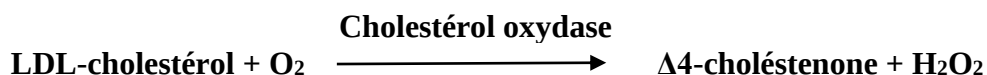
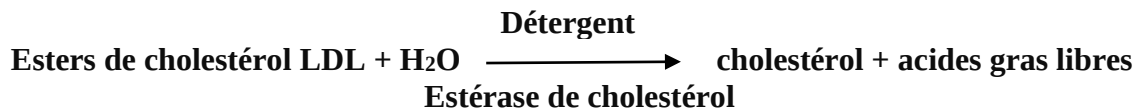
L'intensité de la couleur du pigment formé est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol et est mesurée photométriquement à **600nm**.

Les valeurs de référence: Hommes > 1,45 mmol/L

Femmes > 1,68 mmol/L

II.6.2.7 Le cholestérol- LDL

Le dosage du cholestérol-LDL a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique homogène qui utilise une cholestérol estérase et une cholestérol oxydase en présence de surfactants qui solubilisent sélectivement uniquement les LDL selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 10)



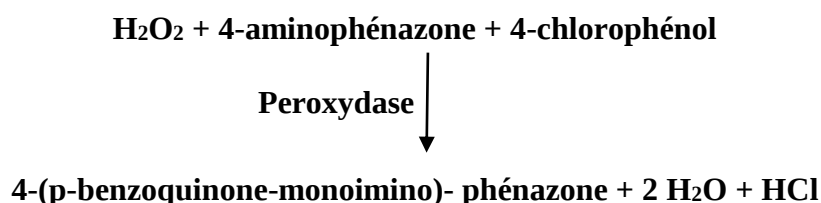
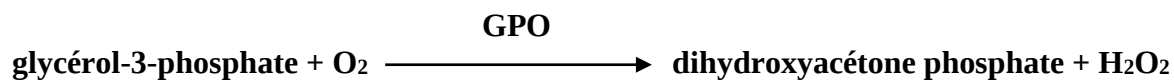
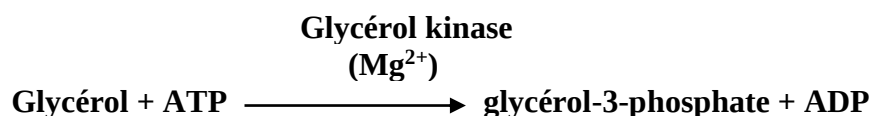
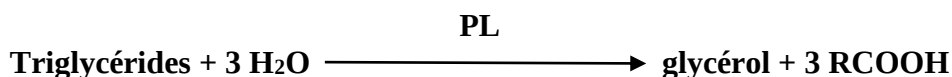
[(a) N-éthyl-N-(3-méthylphényl)-N-succinyléthylènediamine]

L'intensité de la coloration du pigment formé est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol et est mesurée photométriquement à 600 nm

Les valeurs de référence : C-LDL < 2,59 mmol/L quelque soit le sexe.

II.6.2.8 Les triglycérides

Le dosage des triglycérides a été réalisé par la méthode enzymatique colorimétrique qui utilise une lipoprotéine lipase (PL) selon le schéma réactionnel suivant : (annexe 11)



GPO= Glycérol phosphate oxydase

L'intensité de la coloration du chromogène formé est directement proportionnelle à la concentration de triglycérides et est mesurée à **505nm**

Les valeurs de référence: < 1,70 mmol/L, quelque soit le sexe

II.6.2.9 Les protéines totales

Le dosage des protéines sériques a été réalisé par la méthode colorimétrique qui utilise le réactif de biuret.

Le cuivre divalent réagit en solution alcaline avec les liaisons peptidiques des protéines de l'échantillon pour former le complexe biuret de couleur pourpre caractéristique. Le tartrate de sodium et de potassium empêche la précipitation de l'hydroxyde de cuivre et l'iodure de potassium empêche l'auto-réduction du cuivre.

L'intensité de la coloration obtenue mesurée par spectrophotométrie à 546 nm est proportionnelle à la concentration des protéines présentes dans l'échantillon.

Les valeurs de référence: 60-80 g/L, quelque soit le sexe.

II.6.2.10 L'HbA1c

- **Conservation des échantillons:**

- Le dosage de l'HbA1c a été effectué le jour même ou différé. Les échantillons de sang total ont été conservés à +4°C pendant une durée n'excédant pas les 7 jours.

- **Le principe:**

Le dosage de l'HbA1c repose sur une méthode de CLHP certifiée NGSP sur résine échangeuse de cations.

- **Le protocole de dosage :**

Les échantillons sont automatiquement dilués (2 dilutions) dans le système D-10® :

- la première dilution 1/50
- la deuxième dilution 1/2500

; puis injectés dans le circuit d'écoulement analytique et appliqués à la cartouche analytique. Le système D-10® envoie un gradient programmé de tampon de force ionique croissante dans la cartouche, les molécules d'Hb sont alors séparées en fonction de leur interaction ionique avec le matériau contenu dans la cartouche.

Elles traversent ensuite la cellule à circulation du photomètre filtre où sont mesurés les changements d'absorbance à **415 nm**. Le logiciel D-10® intègre les données brutes recueillies lors de chaque analyse. Un compte rendu d'analyse et un chromatogramme sont générés pour chaque échantillon.

L'aire du pic de l'HbA1c est calculée à l'aide d'un algorithme gaussien exponentiel qui permet d'exclure l'aire des pics dus à la base de schiff et à l'Hb carmabylée. Les résultats d'HbA1c sont présentés en pourcentage ($100 * \text{HbA1c} / \text{Hb totale}$), est obtenu en 3 min.

La méthode est linéaire entre 3,8% - 18,5%.

- **Les tampons** : La phase liquide est constituée de trois composants suivants :

- Tampon 1 : bis/tris phosphate pH=6
- Tampon 2 : bis/tris phosphate pH =6,7
- Solution de lavage / dilution (eau distillée)

- **La cartouche analytique** :

C'est une résine échangeuse de cations de 4mm×30mm. Elle permet d'effectuer jusqu'à 400 essais.

- **Les Critères de validation:**

- Aire de répartition totale doit être comprise entre 1,0 à 5,0 millions. Si la zone se trouve en dehors de cette plage, l'échantillon doit être pré dilué manuellement et redosé.
- HbF : doit être $\leq 10\%$, une valeur $> 10\%$ peut entrainer des valeurs d'HbA1c plus élevées que prévu.
- HbA1c labile doit être $\leq 6\%$.
- Hémoglobine carbamylée doit être $\leq 3,5\%$.
- Absence de variant d'Hb (S, C, D ou E)

- **Les valeurs de référence:** 4% - 6% pour cette méthode par rapport à l'Hémoglobine total

- **L'interprétation des valeurs de l'HbA1c** :

L'équilibre glycémique a été évalué sur la base du taux de l'HbA1c qui se définit par une valeur seuil $< 7\%$ selon les recommandations de l'ADA.(98)

Pour mieux évaluer l'équilibre glycémique chez la population d'étude nous avons opté pour une classification plus affinée :(99)

- HbA1c $< 7\%$: sujet équilibré
- HbA1c = $[7-8\%]$: équilibre glycémique moyen
- HbA1c = $[8-10\%]$: équilibre glycémique médiocre
- HbA1c $> 10\%$: équilibre glycémique très médiocre

II.6.2.11 La fructosamine

- **Conservation des échantillons:**

- Le dosage de la fructosamine a été effectué le jour même ou différé. Les échantillons de plasma ont été conservés à +4°C pendant une durée n'excédant pas les 15 jours.

- **Le principe :**

Le dosage de la fructosamine a été réalisé par la méthode colorimétrique au bleu de nitrotétrazolium. Elle est basée sur la capacité des céto-amines (fructosamine) à réduire le bleu de nitrotétrazolium à pH alcalin en formazane dont l'absorbance mesurée à 546 nm est directement proportionnelle à la concentration en fructosamine.

Les états dysprotéïnémiques peuvent affecter les valeurs de la fructosamine. Il est préférable de corriger la concentration de la fructosamine par rapport à la concentration des protéines totale en utilisant la formule suivante : (**annexe 12**)

$$\text{Fructosamine corrigée } (\mu\text{mol/l}) = \frac{\text{Fructosamine mesurée } (\mu\text{mol/l}) \times 72}{\text{Protéines totale (g/L)}}$$

Les valeurs de référence pour un sujet normal sont : **205-285 $\mu\text{mol/L}$** , quelque soit le sexe

II.6.2.12 L'homocystéine

- **Conservation des échantillons:**

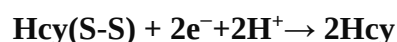
Le dosage de l'homocystéine a été effectué le jour même ou différé. Le plasma a été conservé à -20 °C pendant une durée n'excédant pas 10 mois

- **Le principe :**

Le dosage enzymatique de l'homocystéine est basé sur un principe de dosage enzymatique cyclique novateur qui évalue le produit de conversion du co-substrat au lieu d'évaluer le co-substrat ou les produits de conversion de l'homocystéine (Hcy). Dans cette méthode plusieurs étapes distinctes sont mises en jeu. (Annexe 13)

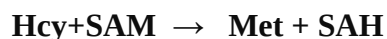
1- Réduction de l'homocystéine oxydée en homocystéine libre

L'homocystéine oxydée présente sous forme de disulfure est réduite en homocystéine libre par un processus de réduction

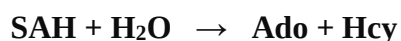


2- Transméthylation de l'homocystéine avec la S-adénosylméthionine (SAM) :

L'homocystéine réagit avec la S-adénosylméthionine (SAM) pour former de la méthionine (Met) et de la S-adénosylhomocystéine (SAH) :

**3- Régénération de l'Hcy par hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) :**

La S-adénosylhomocystéine (SAH) est hydrolysée en adénosine (Ado) et homocystéine (Hcy) par une hydrolase spécifique en présence d'une molécule d' H_2O

**4- Recyclage de l'homocystéine :**

L'homocystéine régénérée est recyclée dans une réaction de conversion spécifique pour former un cycle réactionnel qui amplifie le signal de détection.

5- Hydrolyse de l'adénosine (Ado) :

L'adénosine (Ado) est immédiatement hydrolysée en inosine et ammoniac :

**6- Réaction catalysée par l'enzyme glutamate déshydrogénase (GLDH) :**

L'ammoniac réagit avec le 2-oxoglutarate et le NADH, H^+ sous l'action de l'enzyme GLDH pour former du NAD^+ et le glutamate :



La diminution de l'absorbance NADH, H^+ à 340 nm est directement proportionnelle à la concentration d'homocystéine dans l'échantillon.

-Les valeurs de référence de l'homocystéine pour le sujet normal varient de **5 à 15 $\mu\text{mol/L}$** , quelque soit le sexe.

- Il est possible de définir différents niveaux d' hyperhomocystéinémie: (100)

- L'hyperhomocystéinémie modérée : 15 – 30 $\mu\text{mol/l}$
- L'hyperhomocystéinémie intermédiaire : 30 – 100 $\mu\text{mol/l}$
- L'hyperhomocystéinémie sévère : $\geq 100 \mu\text{mol/l}$

II.6.2.13 La vitamine B12

- **La stabilité des échantillons :**

Le dosage de la vitamine B12 a été effectué le jour même ou différé. Les sérums ont été conservé à -20 °C pendant une durée n'excédant pas 56 jours.

- **Le principe:**

La vitamine B12 a été dosée par une méthode immuno- électrochimiluminescence (ECLIA) compétitive (**Annexe 14**)

Dans ce procédé, la vitamine B12 présente dans l'échantillon entre en compétition avec une forme de la vitamine B12 marquée à la biotine pour les sites de liaison sur le complexe du facteur intrinsèque marqué au ruthénium.

Le mélange réactionnel est ensuite dirigé vers une cellule de mesure où les microparticules sont maintenues magnétiquement sur l'électrode, ce qui permet d'éliminer les substances non liées. L'application d'une tension entraîne l'excitation du ruthénium et une émission chimiluminescente, qui est détectée par un photomultiplicateur à 620 nm.

Les résultats sont obtenus à partir d'une courbe de calibration établie par l'instrument, basée sur une calibration à deux points.

-Les valeurs de référence pour l'adulte varient de **197 à 771 pg/ml**, quelque soit le sexe.

II.6.2.14 La vitamine B9

- **La stabilité des échantillons :**

Le dosage de la vitamine B9 a été effectué le jour même ou différé. Les sérums ont été conservé à -20 °C pendant une période n'excédant pas les 28 jours.

- **Le principe**

La vitamine B9 a été dosée par une méthode immuno- électrochimiluminescence (ECLIA) compétitive (**Annexe 15**)

Dans cette méthode, la vitamine B9 présente dans l'échantillon entre en compétition avec une forme de la vitamine B9 marquée à la biotine pour les sites de liaison sur le complexe de la protéine de liaison folate marquée au ruthénium

Le mélange réactionnel est aspiré dans une cellule de mesure où les microparticules sont capturées magnétiquement à la surface de l'électrode. L'application d'une tension à l'électrode induit alors l'excitation du rhétinium et une émission chimiluminescente mesurée à l'aide d'un photomultiplicateur à 620nm.

Les résultats sont évalués à partir d'une courbe de calibration spécifique, établie par un étalonnage à deux points.

- **Les valeurs de référence pour l'adulte varient de 4,6 à 34,8 ng/mL**, quelque soit le sexe.

II.6.2.15 La micro-albuminurie

- **La stabilité des échantillons :**

Le dosage de la micro-albuminurie a été effectué le jour même ou différé. Les échantillons ont été conservés à 2 ~8 °C pendant une période n'excédant pas un mois.

- **Le principe :**

La micro-albuminurie a été dosée par une méthode immunoturbidimétrique. (**Annexe 16**)

Les anticorps polyclonaux de mouton anti-sérum albumine humaine réagissent avec l'antigène présent dans l'échantillon pour former des complexes antigène/anticorps. L'absorbance de ces complexes, après agglutination, est mesurée à 340nm.

Les valeurs de référence de la micro-albuinurie pour l'adulte et quelque soit le sexe sont :

- **Pour les urine des 24H ; < 30mg/24h**
- Pour les urines de 1^{ère} miction matinal ; **μALB < 3mg/ mmol de créatininurie**

Remarque :

1) Concernant la calibration et le contrôle de qualité :

Toutes les méthodes utilisées pour le dosage des paramètres étudiés ont été calibrées et contrôlés tout au long de la période de l'étude. Une validation des résultats a été réalisée par l'utilisation de deux niveaux de contrôle de qualité, conformément aux critères de validation biochimiques exigés.

2) Concernant les Valeurs normales :

Les résultats des dosages sériques et plasmatiques des différents paramètres étudiés étaient interprétés par rapport aux valeurs de référence annoncés par le fournisseur Roche®.

II.6.3 Le calcul du rapport micro albuminurie sur créatininurie (RAC)

Les résultats de micro albuminurie sur une miction sont exprimés en milligrammes d'albumine par milli mole de créatinine

$$\text{RAC (mg/mmol)} = \frac{\text{Albumine urinaire (mg/l)}}{\text{Créatinine urinaire (mmol/l)}}$$

Tableau 6: Définitions de la micro-albuminurie et valeurs de référence selon le RAC(101)

RAC (mg/mmol)	Interprétation
< 3	Normo albuminurie (A1)
3 – 30	Micro-albuminurie (A2)
> 30	Macro-albuminurie (A3)

II.6.4 Le calcul du débit de filtration glomérulaire

Dans notre étude nous avons utilisé la version « 186 » de la formule MDRD à 4 paramètres dite « simplifiée » pour l'estimation du débit de filtration glomérulaire, exigée quand la méthode de créatinine est « non raccordée » à la méthode de référence (CG-IDMS),

$$\text{DFGe (ml/min/1,73 m}^2\text{)} = 186,3 \times [\text{Pcr } (\mu\text{mol/l)} / 88,4]^{-1,154} \times \text{âge}^{-0,203}$$

x 1,21 pour les sujets d'origine africaine (African American)

x 0,742 pour les femmes

Le DFGe est indexé à la surface corporelle (SC) du patient de façon à exprimer le résultat pour une surface corporelle de 1,73 m². Nous avons utilisé la formule de Boyd pour estimer la SC

$$\text{SC} = 0,0003207 \times \text{Poids}^{(0,7285 - 0,0188 \times \log(\text{Poids}))} \times (\text{Taille})^{0,725}$$

Tableau 7 : Classification des stades de la maladie rénale chronique selon recommandations KDIGO et HAS 2021(101)

Stade	Description	DFG (mL/min/ 1.73m ²)	A1 Normale-légère (<3 mg/mmol)	A2 Modérée (3-30 mg/mmol)	A3 Sévère (>30 mg/mmol)
G1	Normal ou haut	≥ 90	Faible risque	Risque modéré	Haut risque
G2	Légèrement Diminué	60-89	Faible risque	Risque modéré	Haut risque
G3a	Insuffisance rénale légère à modérée	45-59	Risque modéré	Haut risque	Très haut risque
G3b	Insuffisance rénale modérée à sévère	30-44	Haut risque	Très haut risque	Très haut risque
G4	Insuffisance rénale sévère	15-29	Très haut risque	Très haut risque	Très haut risque
G5	Insuffisance rénale terminale	<15	Très haut risque	Très haut risque	Très haut risque

II.6.5 Le calcul des indices d'athérogénicité

II.6.5.1 Atherogenic index of plasma (AIP)

L'indice d'athérogénicité liés aux lipoprotéines riches en TG est calculé selon la formule suivante : (102)

$$AIP = \log ([TG] \times 0,01129 [HDL - C] \times 0,02586)$$

Les seuils d'interprétation :

- Un risque athérogène cardiovasculaire bas est associé à un $AIP < 0,11$
- Un risque athérogène cardiovasculaire modéré à un AIP entre 0,11 et 0,21
- Un risque athérogène cardiovasculaire élevé à un $AIP > 0,21$.

II.6.5.2 Le cholestérol non-HDL

Il représente le taux du cholestérol compris dans les particules à Apo B. (103)

$$\text{CHOL-NON -HDL} = \text{cholestérol total} - \text{cholestérol-HDL}$$

Valeur de référence : CHOL-NON -HDL $\leq 3,36$ mmol/l quelque soit le sexe.

II.6.6 Le trou de glycation ; glycation gap

Le trou de glycation (G-GAP) est déterminé en soustrayant à l'HbA1c mesurée, l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine selon l'équation de régression HbA1c-fructosamine $y=ax+b$.: (93)

$$\text{G-GAP (\%)} = \text{HbA1c mesurée} - \text{HbA1c prédite}$$

$$\text{HbA1c prédite (\%)} = a \times \text{fructosamine} + b$$

Le calcul du trou de glycation permet de classer les sujets diabétiques en trois groupes : (104)

- Glyqueurs bas : G-GAP $< -1\%$
- Glyqueurs moyens : G-GAP = $[-1 \sim +1]\%$
- Glyqueurs hauts : G-GAP $> +1\%$

II.6.7 Les méthodes statistiques utilisées

L'analyse statistique des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS 20.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA). SPSS, acronyme de "Statistical package for the Social Sciences", qui offre une large gamme de fonctionnalités, allant de la préparation, au traitement et à l'analyse des données.

II.6.7.1 L'analyse descriptive

Les variables qualitatives recueillies dans cette étude ont été exprimées en effectif et pourcentage (%) ce qui permet de visualiser la répartition des catégories dans l'échantillon.

Les variables quantitatives sont présentées en moyenne et écart type (moyenne $\pm$ écart type) permettant ainsi d'évaluer la variabilité des données.

II.6.7.2 L'analyse bi variée

a. La distribution normale

Les tests de Kolmogorov-Smirnov et de ShapiroWilk ont été utilisés pour vérifier la distribution normale des variables quantitatives continues et déterminer ainsi les tests statistiques paramétriques ou non paramétriques appropriés à utiliser.

b. L'homogénéité des variances

Le test de Levene et le test de Bartlett ont été utilisés pour vérifier l'égalité et l'homogénéité des variances entre les groupes.

c. Les analyses comparatives

L'analyse de l'association entre les différents groupes étudiés et les différentes caractéristiques des patients a été réalisée l'aide du :

- test du Khi-2 pour la comparaison des variables qualitatives ou du test exact de Fisher dans le cas de petits effectifs,
- test t de Student pour la comparaison des variables quantitatives entre 2 groupes
- test ANOVA pour la comparaison des variables quantitatives entre 3 groupes ou le test de Kruskal-Wallis lorsque les données ne satisfont pas aux hypothèses requises pour l'ANOVA, notamment la normalité de la distribution des résidus ou l'homogénéité des variances.
- L'analyse post hoc a été effectuée pour identifier précisément les paires de groupes entre lesquelles des différences significatives existent, suite à la détection de variations globales parmi les moyennes de plusieurs groupes, elle a été réalisée à l'aide du test de Tukey après un test ANOVA significatif ou le test de Bonferroni après un test de kruskal-Wallis significatif
- Le risque de développer une maladie ou une condition entre deux groupes a été comparé par la mesure de l'Odd Ratio

d. L'analyse de corrélation :

Elle a été réalisée entre 2 variables quantitatives en utilisant le coefficient R de Pearson.

Tableau 8 : L'interprétation des valeurs du coefficient de corrélation R de Pearson

La corrélation	Parfaite	Très forte	Forte	Modérée	Faible	Nulle
R	1	>0,8	0,5 – 0,8	0,2 - 0,5	0 – 0,2	0

L'analyse de corrélation entre deux variables, une quantitative et l'autre ordinale, a été réalisée en utilisant le coefficient de Spearman (Rho)

L'analyse de concordance entre deux variables ordinales a été réalisée en utilisant la corrélation de Kendall, qui mesure la force et la direction de l'association à l'aide du calcul du coefficient Tau de beta

e. L'analyse de régression linéaire simple :

Elle sert à estimer la relation de dépendance entre deux variables quantitatives. La droite de régression permet de prévoir les variations de la variable dépendante (Y) en fonction d'une autre indépendante (X), selon la formule : $y = a x + b$

Le coefficient de Détermination (R^2) : Il mesure la proportion de la variance de la variable dépendante expliquée par le modèle. $0 < R^2 < 1$

Le seuil de significativité statistique (p) retenu est de 0,05 (seuil bilatéral) et l'intervalle de confiance (IC) est à 95%.

Les valeurs manquantes et/ou abérantes ont été remplacées par les valeurs moyennes.

III. Les considérations éthiques

Au cours de cette étude, nous avons rigoureusement respecté les considérations éthiques pour garantir le bien-être et les droits des participants, conformément aux normes éthiques établies.

III.1 Le consentement

Un consentement éclairé a été obtenu de tous les participants avant le début de l'étude, assurant la transparence des objectifs, méthodes, et le droit de retrait à tout moment.

III.2 L'anonymat et la confidentialité

L'anonymat et la confidentialité des informations personnelles des participants ont été respectés tout au long de l'étude

III.3 Conflit d'intérêt

En ce qui concerne les conflits d'intérêt liés au financement de l'étude par la Société Algérienne de Diabétologie (SADIAB), des mesures ont été mises en place pour assurer l'intégrité de la recherche. Les résultats ont été traités de manière objective, sans influence du financeur. Nous avons également confirmé ne pas avoir d'intérêts financiers personnels susceptibles d'affecter l'étude.

Ces pratiques ont été conçues pour assurer que l'étude respecte les principes éthiques fondamentaux de la personne, de bienfaisance et de justice, tel que stipulé dans les cadres réglementaires internationaux pertinents.

IV. Résultats

170 patients atteints de diabète de type 2, ne présentant aucune complication connue et diagnostiquée et ayant accepté de participer à l'étude, ont été retenus. Les résultats obtenus sont présentés ci-après. Ils ont concerné les caractéristiques sociodémographiques, cliniques et biochimiques

IV.1 Description des caractéristiques sociodémographiques de la population

IV.1.1 Le sexe de la population

La population de l'étude a été composée de 65 hommes (38,24%) et 105 femmes (61,76%) avec un sexe ratio femmes/hommes de 1,61.

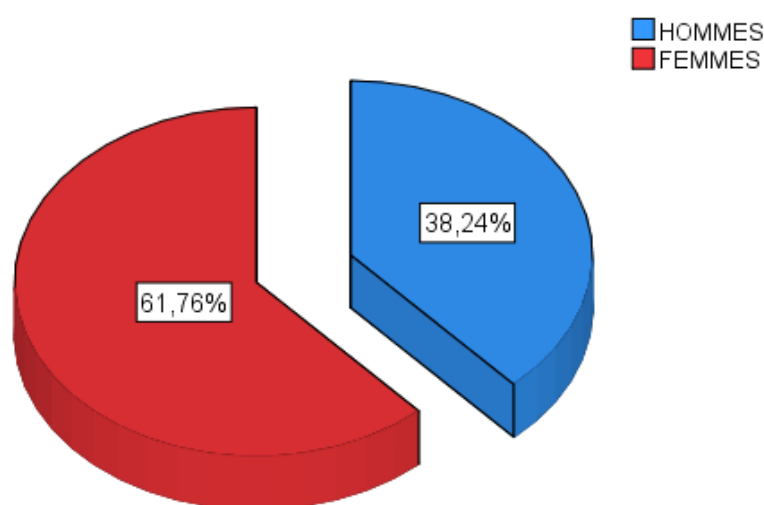


Figure 7 : Répartition de la population d'étude selon le sexe

IV.1.2 L'âge de la population

La moyenne d'âge de la population d'étude était de $60,03 \pm 9,04$ ans. La moyenne d'âge des sujets diabétiques de sexe féminin était de $59,10 \pm 8,81$ ans et celle de sexe masculin était de $61,54 \pm 9,27$ ans

Tableau 9: L'âge moyen de la population d'étude selon le sexe

Age en années	N	Min	Max	M±ET	La médiane
De la Population d'étude	170	36	81	$60,03 \pm 9,04$	60
Des hommes	65	36	81	$61,54 \pm 9,27$	/
Des femmes	105	40	80	$59,10 \pm 8,81$	/

N=effectif, M= moyenne, Min= minimum, Max=maximum, ET=écart type,

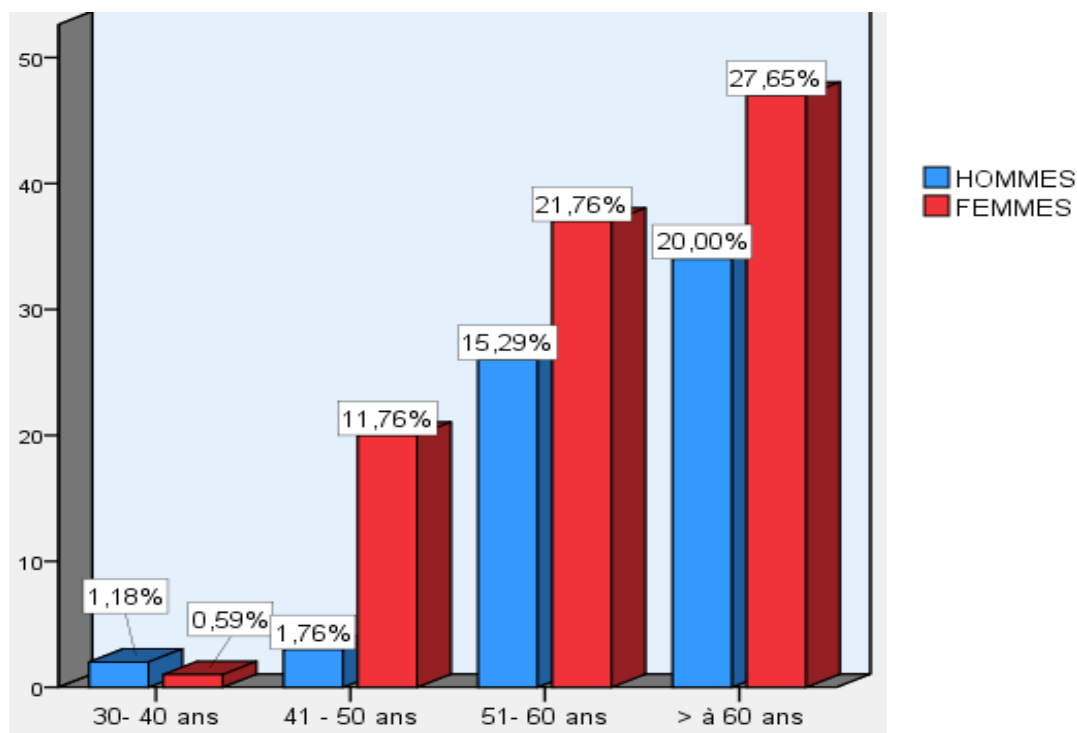


Figure 8 : Répartition de la population d'étude par tranche d'âge et par sexe

La répartition par tranches d'âge révèle une prédominance des patients âgés de plus de 60 ans, représentant 47,65% de la totalité de la population dont 27,65% sont des femmes.

IV.1.3 L'activité physique

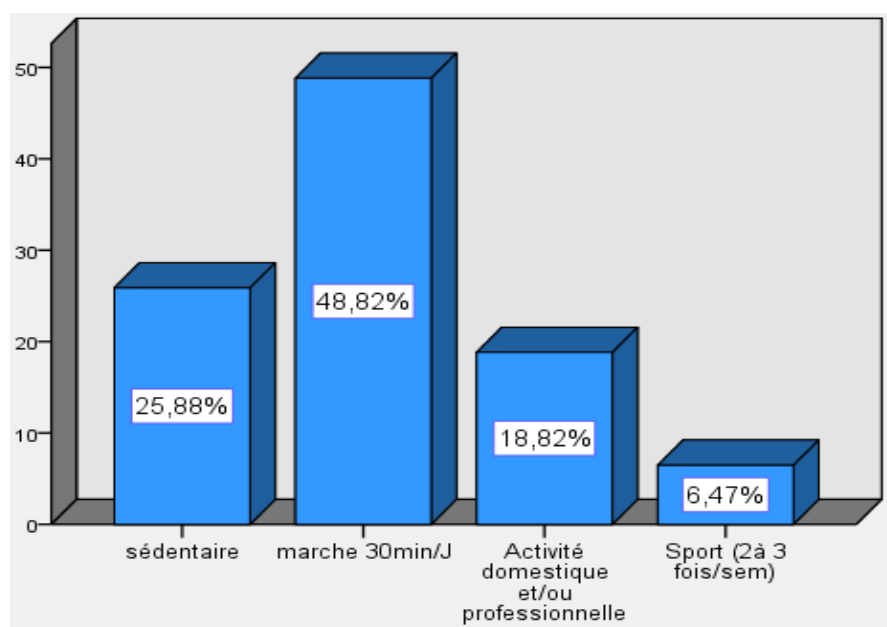


Figure 9 : Répartition de la population d'étude selon l'activité physique

Environ 25,88% des participants ont déclaré mener un mode de vie sédentaire, tandis que 48,82% pratiquaient la marche pendant au moins 30 minutes par jour.

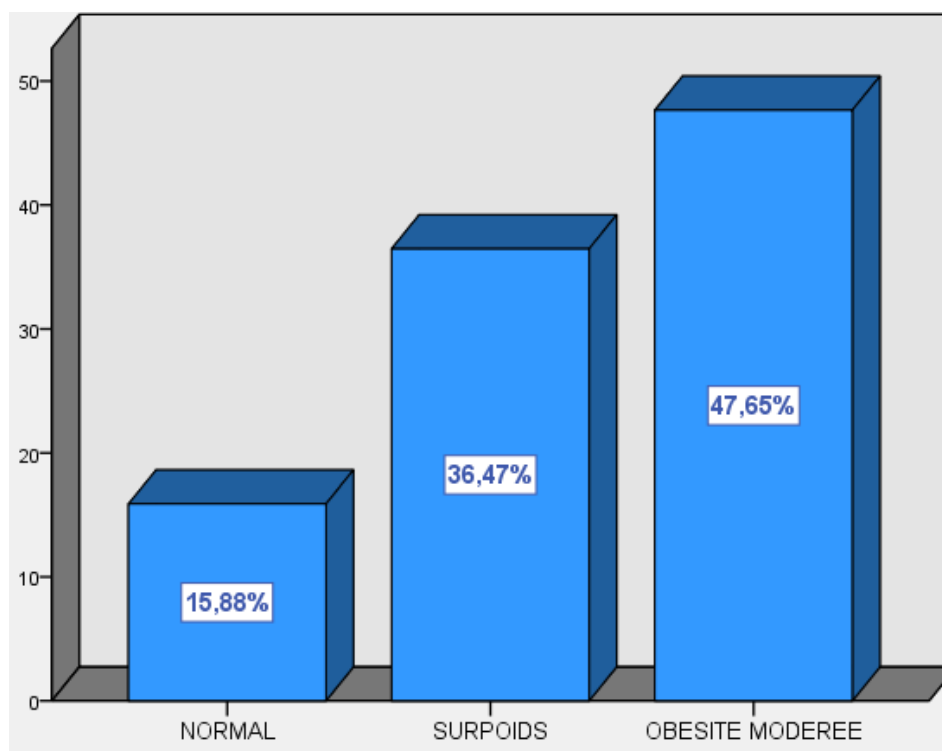
IV.2 Description des caractéristiques anthropométriques de la population

Tableau 10 : Les caractéristiques anthropométriques de la population d'étude

Paramètres	N	Min	Max	M $\pm$ ET
Le poids (Kg)	170	50,00	120,00	82,01 $\pm$ 13,47
La taille (m)	170	1,40	1,86	1,65 $\pm$ 0,08
Le tour de taille (cm)	170	78,00	135,00	97,87 $\pm$ 10,85
L'indice de masse corporelle (Kg/m ²)	170	19,42	39,06	29,50 $\pm$ 4,01

N=effectif, M= moyenne, Min= minimum, Max=maximum, ET=écart type,

IV.2.1 L'indice de masse corporelle



Normal : IMC=18,5 ~ 25 Kg/m², Surpoids : IMC= 25 ~ 30 Kg/m², obésité modérée: IMC = 30 ~ 40 Kg/m²

Figure 10: Répartition de la population d'étude selon leur IMC

L'obésité modérée a été constatée chez près de la moitié de la population d'étude soit 47,65%.

IV.2.2 Le tour de taille

La majorité des femmes souffrait d'une obésité androïde (TT > 88 cm)

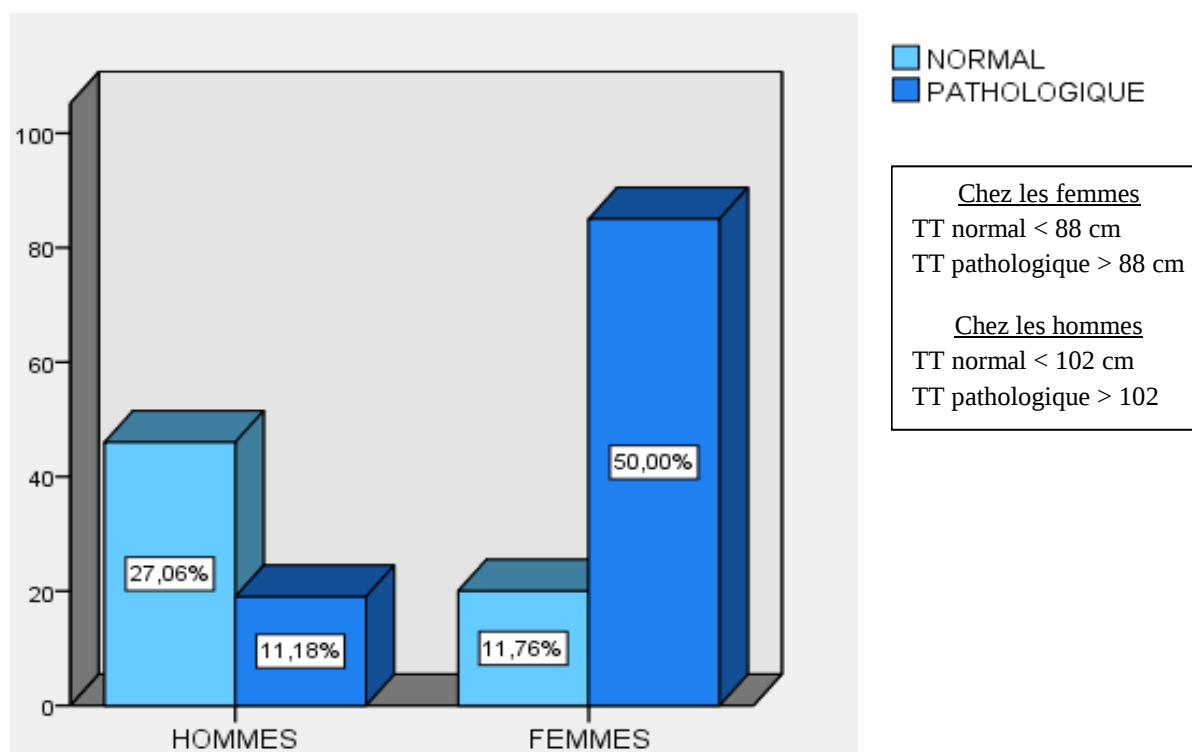


Figure 11 : Répartition de la population selon le tour de taille

IV.3 Description des caractéristiques cliniques de la population

IV.3.1 L'ancienneté du diabète

Tableau 11 : L'ancienneté moyenne du diabète dans la population d'étude

	N	Min	Max	M ± ET	Médiane
Ancienneté du diabète (années)	170	1	25	7,89 ± 5,25	7,00

L'ancienneté moyenne du diabète au sein de la population d'étude était de 7,89 ans ± 5,25 ans avec des extrêmes allant d'une année à 25ans.

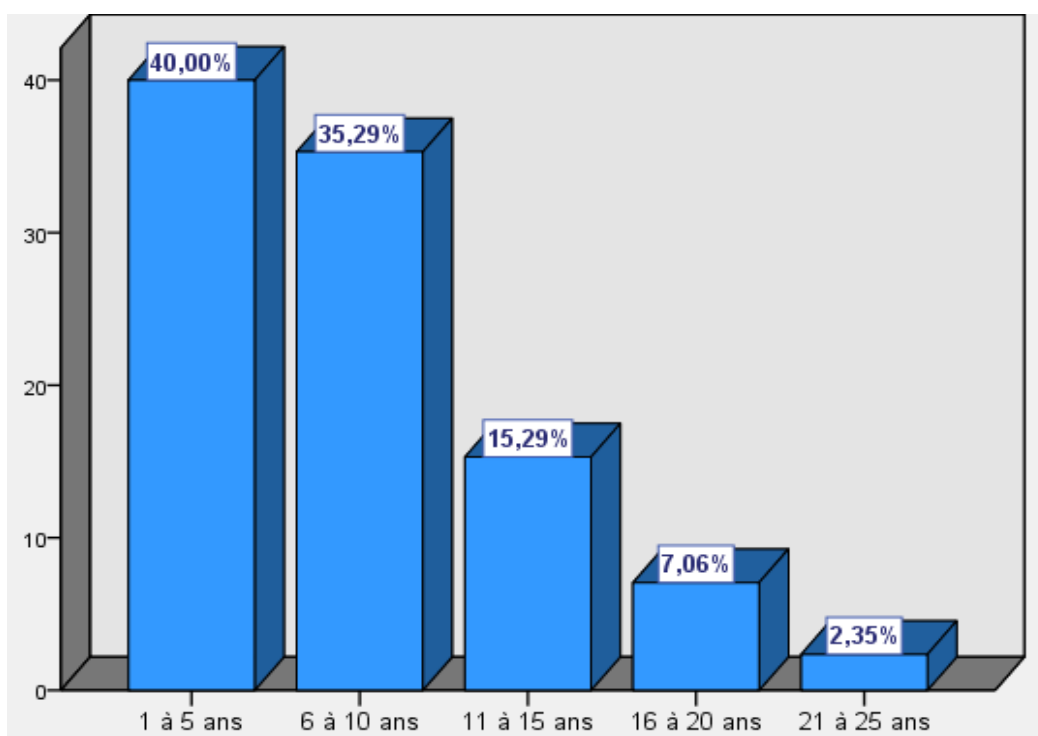


Figure 12: Répartition de la population selon l'ancienneté du diabète

La majorité des sujets de la population étaient diabétiques depuis moins 10 ans : 40% depuis 1 à 5 ans et 35,3% depuis 6 à 10 ans.

IV.3.2 Le traitement antidiabétique en cours

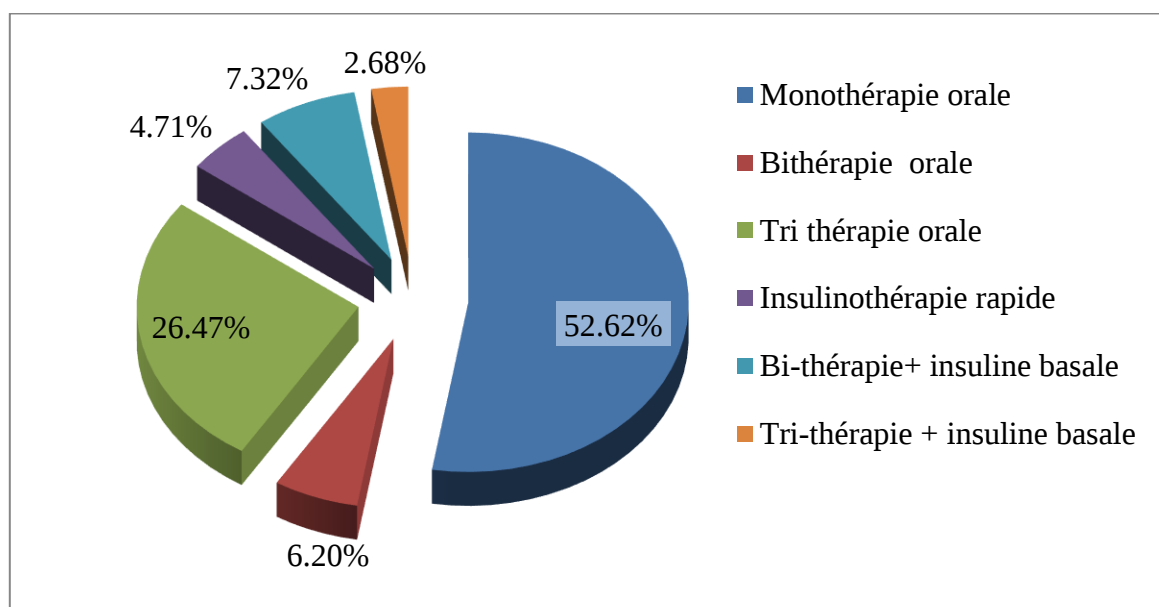


Figure 13: Répartition de la population d'étude selon le type de traitement antidiabétique

85,29% de la population d'étude, était sous antidiabétiques oraux. Parmi eux : 52,62% étaient sous monothérapie orale (Metformine 500mg ou 850mg), 6,20% suivaient une bithérapie orale et 26,47% étaient sous tri thérapie orale. Les autres traitements, incluant l'insulinothérapie rapide (4,71%) et les combinaisons de thérapies oraux avec l'insuline basale sont moins fréquents.

IV.3.3 Les antécédents familiaux du diabète type 2

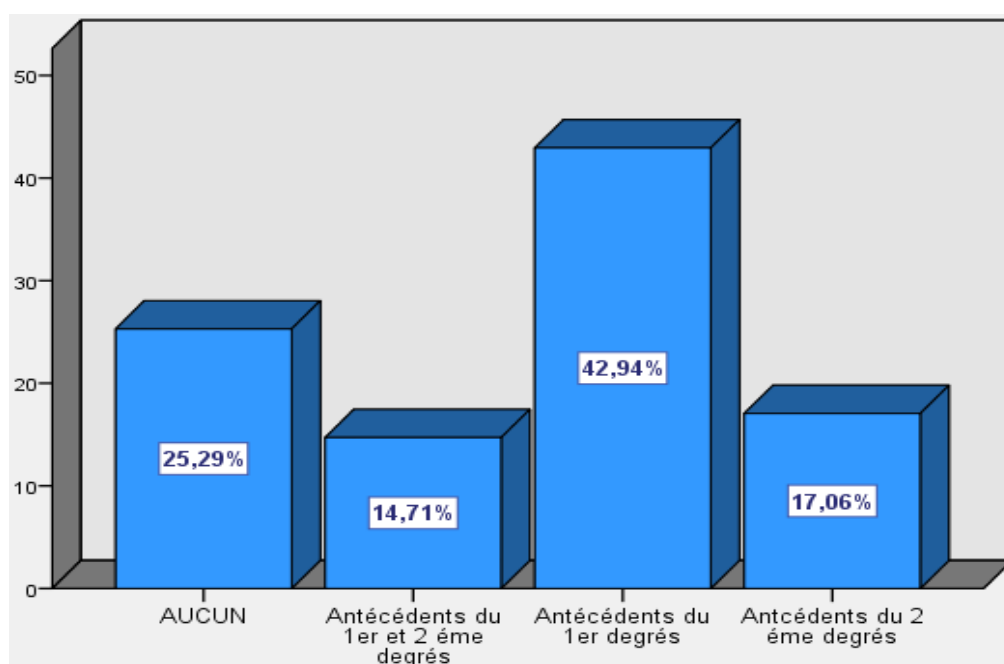


Figure 14: Répartition de la population d'étude selon les antécédents familiaux du diabète type 2

Près de la moitié de la population d'étude soit 42,94%, avait des antécédents familiaux de diabète du 1^{er} degré, tandis qu'un quart des patients (25,29%) n'avait aucun antécédent familial.

IV.4 Statistiques descriptives des caractéristiques biochimiques de la population d'étude

L'ensemble des paramètres biochimiques étudiés sont représentés dans le tableau 12 pour les paramètres dosés et le tableau 13 pour les paramètres calculés

Tableau 12 : Les paramètres biochimiques dosés de la population d'étude

Les paramètres biochimiques	N	Min	Max	M±ET
Glycémie (mmol/l)	170	3,71	28,62	8,81 ± 3,67
Créatinine sanguine (µmol/l)	170	36,00	156,00	74,92 ± 21,96
Urée sanguine (mmol/l)	170	2,05	9,99	4,91 ± 1,56
Cholestérol total (mmol/l)	170	0,59	8,56	4,34 ± 1,29
Cholestérol-HDL (mmol/l)	170	0,40	2,79	1,15 ± 0,36
Cholestérol-LDL (mmol/l)	170	0,70	6,29	2,56 ± 1,00
Triglycérides (mmol/l)	170	0,44	7,43	1,62 ± 1,00
Acide urique sanguin (mmol/l)	170	111,00	584,00	306,28 ± 91,39
HbA1c (%)	170	5,00	13,90	7,22 ± 1,54
Fructosamine plasmatique (µmol/l)	170	165,12	600,37	272,85 ± 79,15
Protéines totales (g/l)	170	43,50	85,00	67,38 ± 5,51
Homocystéine plasmatique (µmol/l)	170	6,40	131,73	20,20 ± 13,41
Vitamine B12 sanguine (pg/ml)	170	100,20	838,30	346,80 ± 149,12
Vitamine B9 sanguine (ng/ml)	170	3,62	22,42	9,40 ± 4,83

N=effectif, M= moyenne, Min= minimum, Max=maximum, ET=écart type,

Nous avons observés à travers les paramètres biochimiques dosés :

- **Une tendance à l'hyperglycémie**, avec une glycémie à jeun moyenne de 8,81 mmol/l, nettement au-dessus des valeurs normales.
- **La présence probable de dyslipidémies**, suggérée par les moyennes et les écarts des valeurs du cholestérol total, HDL, LDL, ainsi que des triglycérides.
- **Un contrôle glycémique sub-optimal**, mis en évidence par une HbA1c moyenne de 7,22 %.
- **Une hyperhomocystéinémie notable**, avec une concentration moyenne de 20,20µmol/l, ce qui pourrait accroître le risque de complications cardiovasculaires.

Tableau 13: Les paramètres biochimiques calculés de la population d'étude

Les paramètres biochimiques	N	Min	Max	M±ET
Cholestérol non-HDL (mmol/l)	170	-0,72	7,26	3,19 ± 1,23
AIP	170	-0,57	1,07	0,10 ± 0,29
DFGe (ml/min/1.73m²)	170	32,60	178,49	79,21 ± 25,37
RAC(mg/mmol)	170	0,09	10,72	1,87 ± 2,28

AIP= Atherogenic index of plasma, DFGe= Débit de filtration glomérulaire estimé,

RAC= le rapport micro- albuminurie/Créatininurie.

Nous avons observés à travers les paramètres biochimiques calculés :

- **Un risque athérogène probable**, suggéré par une moyenne et des valeurs élevées du cholestérol non-HDL
- **La présence probable d'une microalbuminurie**, indiquée par une moyenne et des valeurs élevées du rapport albumine/créatinine (RAC).

IV.4.1 Evaluation de l'équilibre glycémique

IV.4.1.1 L'HbA1c

L'équilibre glycémique a été évalué sur la base du taux de l'HbA1c qui se définit par une HbA1c < 7% selon les recommandations de l'ADA(98)

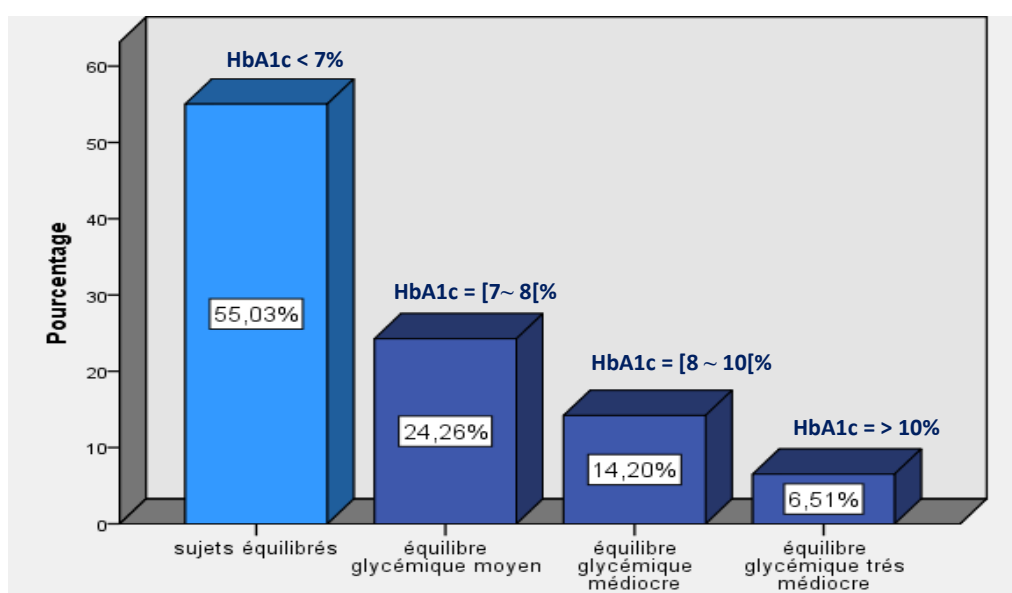


Figure 15 : Répartition de la population d'étude selon le taux de l'HbA1c

Un équilibre glycémique optimal avec une HbA1c < 7% a été retrouvé chez 55,03% de la population d'étude contre 24,26% qui ont un équilibre glycémique moyen.

IV.4.1.2 La fructosamine

L'équilibre glycémique basé sur la valeur de la fructosamine est défini par une valeur inférieure à 285 $\mu\text{mol/l}$ qui correspond à la limite supérieure des valeurs de références de ce paramètre.

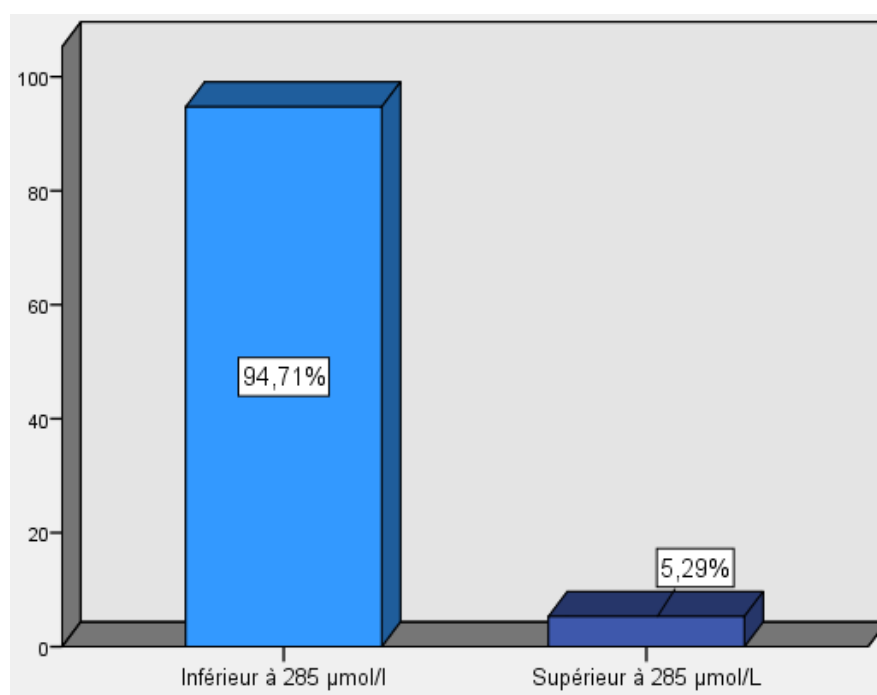


Figure 16: Répartition de la population d'étude selon la concentration plasmatique de la fructosamine

Une faible proportion de la population étudiée soit 5,29% présentaient une hyperfructosaminémie > à 285 $\mu\text{mol/l}$.

IV.4.2 Evaluation des marqueurs prédictifs de complications

IV.4.2.1 Le taux de l'homocystéine

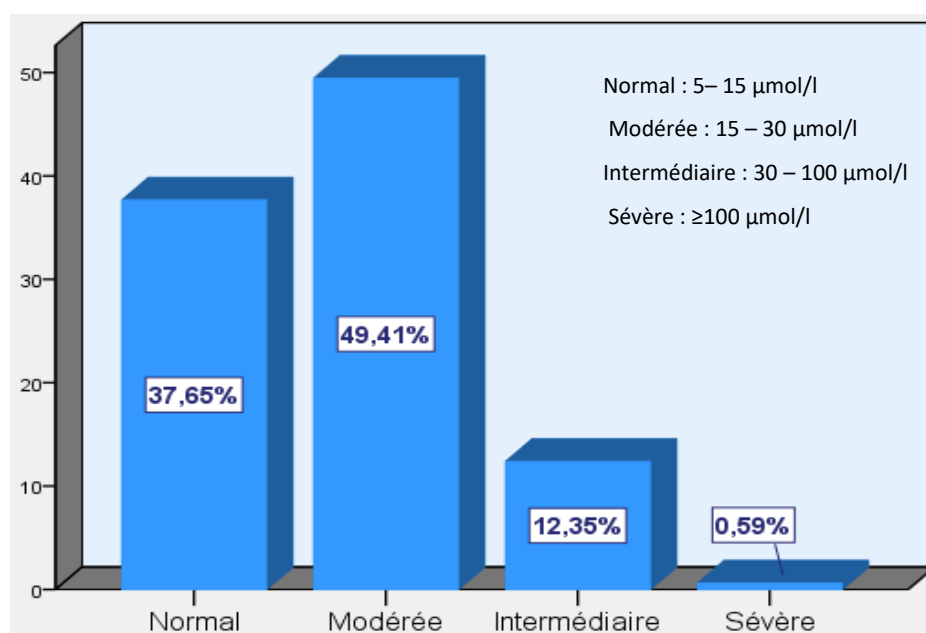


Figure 17 : Répartition de la population d'étude selon le taux de l'homocystéinémie

Près de la moitié de la population d'étude soit 49,41% présentait une hyperhomocystéinémie modérée (15~30 µmol/l) versus 37,67% présentait une normo homocystéinémie (5~15µmol/l)

IV.4.2.2 Bilan lipidique et indices d'athérogénécité

IV.4.2.2.1 Le cholestérol total

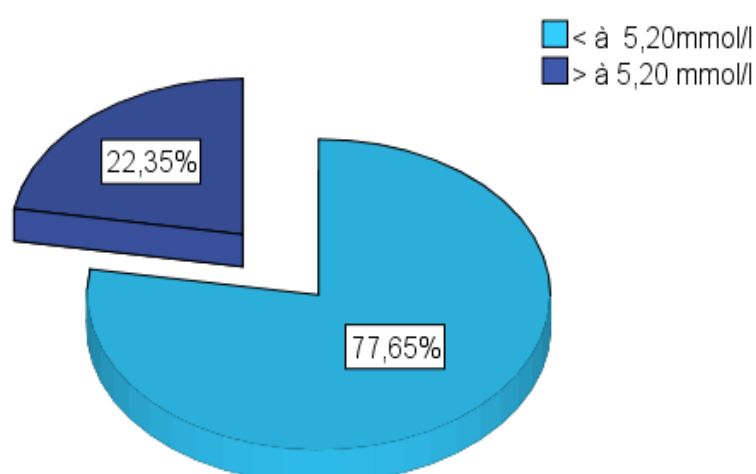


Figure 18: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol total

22,35% de la population d'étude avaient une hypercholestérolémie supérieure à 5,20 mmol/l.

IV.4.2.2.2 Le cholestérol-HDL

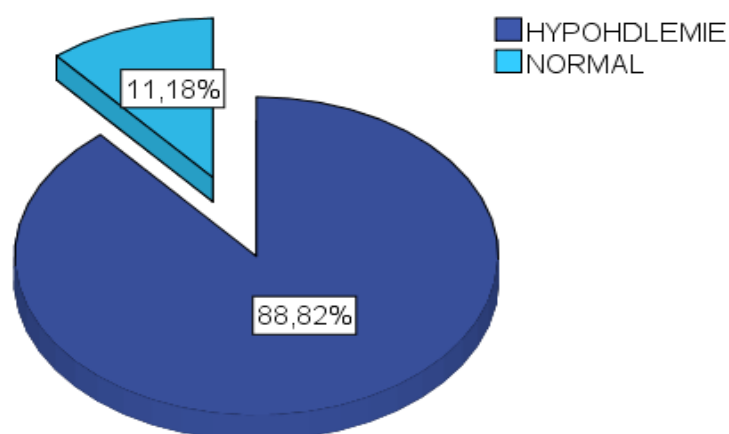


Figure 19: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol HDL

La majorité de la population d'étude soit 88,82% avait une baisse du cholestérol HDL.

IV.4.2.2.3 Le cholestérol-LDL

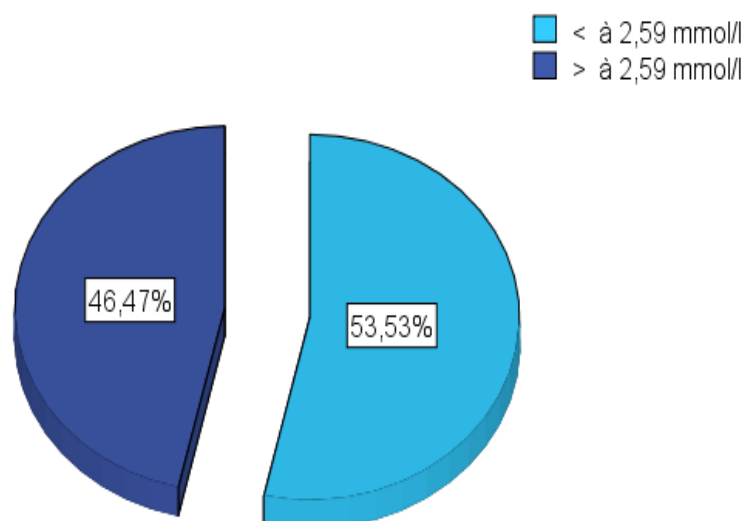


Figure 20: Répartition de la population d'étude selon le taux du cholestérol -LDL

Près de la moitié de la population d'étude soit 46,47% avait un taux de cholestérol LDL supérieur à 2,59 mmol/l

IV.4.2.2.4 Les triglycérides

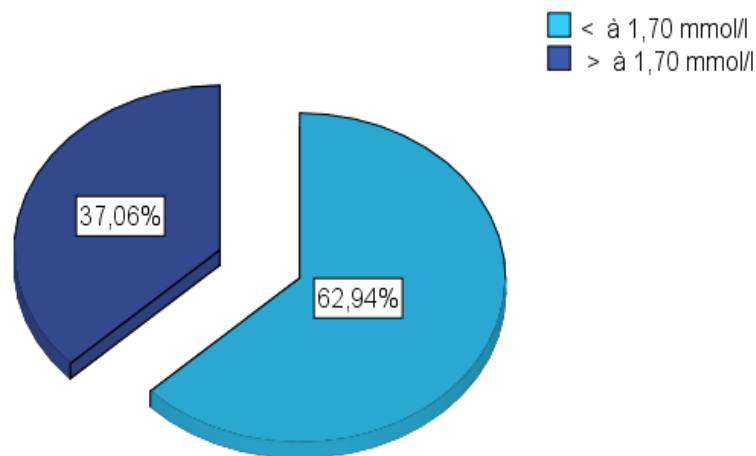


Figure 21: Répartition de la population d'étude selon le taux des triglycérides

37,06% de la population d'étude avait une hypertriglycéridémie supérieure à 1,70mmol/l

IV.4.2.2.5 Le cholestérol non-HDL :

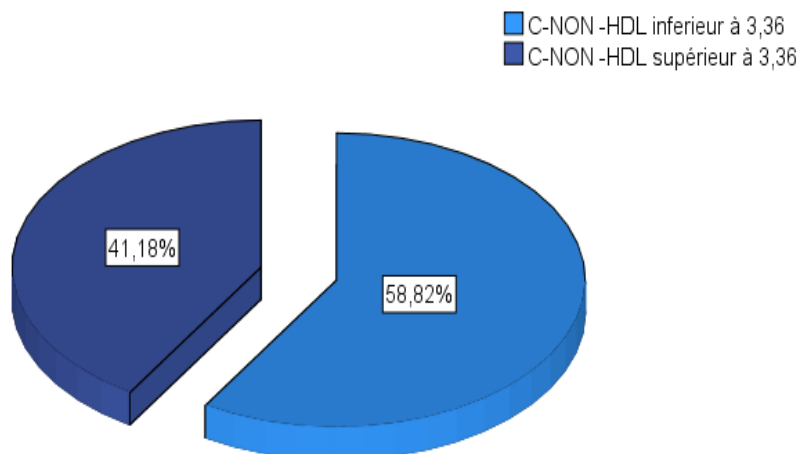


Figure 22: Répartition de la population d'étude selon le niveau du cholestérol non HDL

41,2% de la population d'étude présentaient des valeurs de Cholestérol non HDL pathologiques (> 3,36 mmol/l)

IV.4.2.2.6 L'indice d'athérogénécité plasmatique

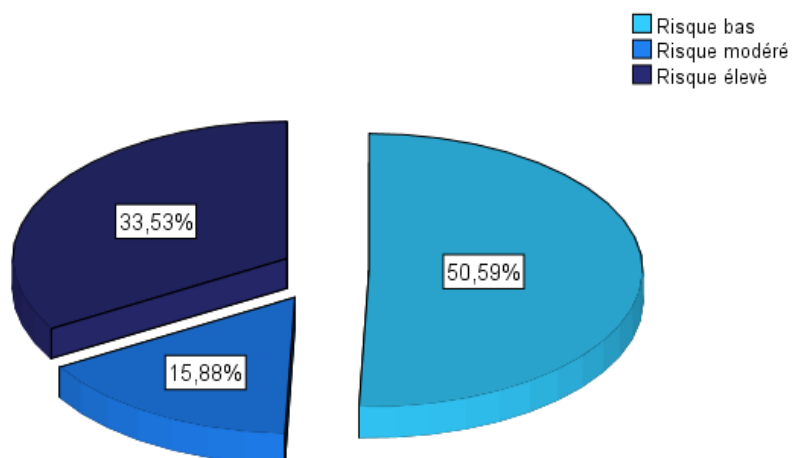


Figure 23: Répartition de la population d'étude selon l'indice d'athérogénécité plasmique

Le tiers de la population d'étude soit 33,53% présentait un risque athérogène élevé selon les valeurs de l'indice de l'athérogénécité plasmique ($IAP > 0,21$), alors que la moitié avait un risque bas ($IAP < 0,11$).

IV.4.2.3 Le débit de filtration glomérulaire estimé

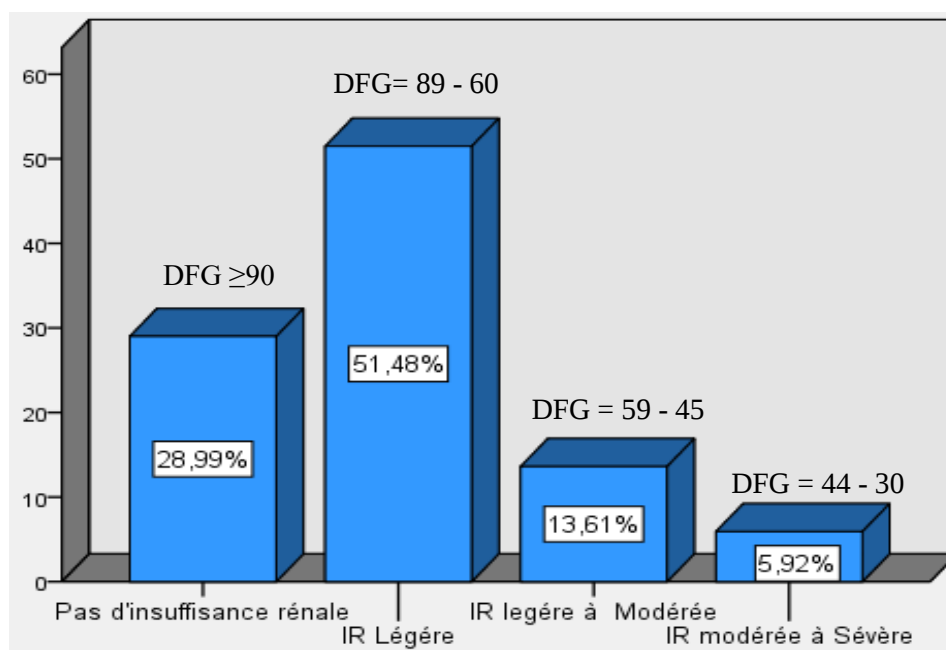
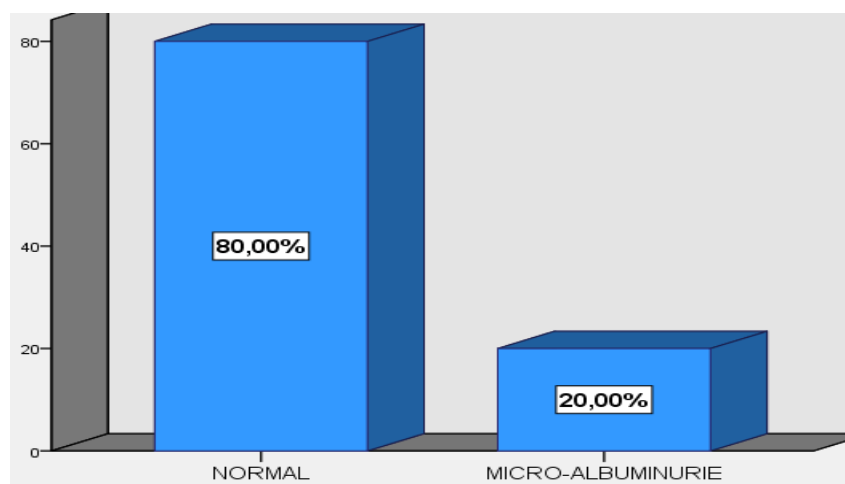


Figure 24: Répartition de la population d'étude selon les valeurs de le DFGe exprimé en ml/min/m²

Dans cette étude, 28,99% n'avaient pas d'insuffisance rénale, 51,48% présentaient un DFGe diminué et 13,61% une insuffisance rénale légère à modérée.

IV.4.2.4 Le rapport micro albuminurie sur créatininurie (RAC)



Valeur Normal : RAC = $< 3 \text{ mg/mmol}$, Micro_albuminurie : RAC = $3 \sim 30 \text{ mg/mmol}$,
Macro_albuminurie : RAC $> 30 \text{ mg/mmol}$

Figure 25: Distribution de la population d'étude selon les valeurs du RAC

La micro-albuminurie (RAC = $3 \sim 30 \text{ mg/mmol}$) était présente chez 20,00% de la population d'étude

IV.5 Etude de la corrélation entre l'HbA1c et la fructosamine

L'analyse de la corrélation entre l'HbA1c et la fructosamine des patients, a révélée l'existence d'une forte relation positive statistiquement significative ($p < 10^{-3}$) avec un coefficient de corrélation de Pearson de 0,684.

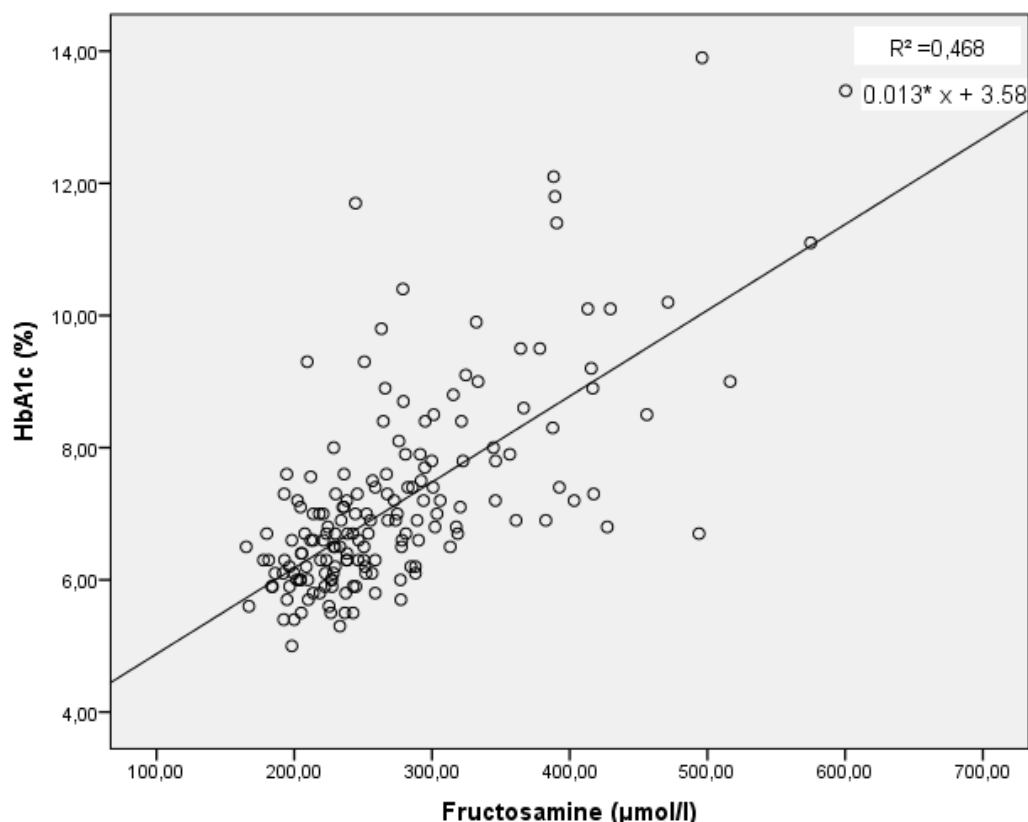


Figure 26 : Courbe de régression linéaire montrant la relation entre l'HbA1c et la fructosamine

L'analyse de régression linéaire a donné un coefficient de régression $r^2 = 0.468$ avec une droite de régression d'équation : $\text{HbA1c prédicté} = 0,013 \times \text{fructosamine} + 3,58$.

46,8% des variations des valeurs de l'HbA1c sont expliqués statistiquement par les valeurs de la fructosamine.

Cette équation a été appliquée aux patients de la population d'étude pour calculer l'HbA1c prédicté à partir de la fructosamine (F-HbA1c) représentée dans **le tableau 14**.

Tableau 14 : Les valeurs de l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine dosée de la population d'étude

	Min	Max	M±ET
F-HbA1c(%)	5,73	11,38	7,12 ± 1,02

La moyenne de l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine dans notre population d'étude était de 7,12±1,02 % avec des extrêmes allant de 5,73% à 11,38%

IV.6 Evaluation du trou de glycation de la population de l'étude

IV.6.1 Le calcul du trou de glycation

L'écart de glycation (ou trou de glycation) de chaque patient a été calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Trou de glycation (G-GAP)} = (\text{HbA1c mesurée}) - (\text{F-HbA1c})$$

Tableau 15 : Résultats du calcul du trou de glycation de la population d'étude

	Min	Max	M ± ET
G-GAP (%)	-3,30	4,94	0,08±1,12

La moyenne du G-GAP dans notre population d'étude était de 0,08±1,12 % avec des extrêmes allant de -3,30% à 4,94%

IV.6.2 Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques sociodémographiques :

La variation du trou de glycation a été évaluée en fonction du sexe, l'âge et de l'activité physique de la population d'étude, les résultats sont présentés dans les tableaux 16, 17 et 18.

IV.6.2.1 Trou de glycation et le sexe

Tableau 16: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction du sexe

Le sexe	G-GAP (%)	p-value
Hommes (n=65)	-0,04± 1,19	0,229
Femmes (n=105)	0,16± 1,07	

La comparaison des moyennes par le *test t de Student* n'a révélée aucune différence statistiquement significative ($p= 0,229$) entre les moyennes du G-GAP chez les hommes (-0,04± 1,19) et les femmes (0,16± 1,07).

IV.6.2.2 Trou de glycation et l'âge

Tableau 17: Test de corrélation entre le trou de glycation et l'âge de la population d'étude

	Age
Corrélation de Pearson	-0,182
p-Value	0,018*

* : $p < 0,05$

L'analyse de corrélation de Pearson a révélé une très faible corrélation négative statistiquement significative entre l'âge de la population d'étude et le G-GAP ($r = 0,182$, $p = 0,018$).

Tableau 18: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction l'âge

Age	G-GAP(%)	p-value
Inférieur à 60 ans (n=21)	-0,44± 1,44	0,117
Supérieur à 60 ans (n=149)	0,03± 1,06	

La comparaison des moyennes par le *test t de Student* n'a révélée aucune différence statistiquement significative ($p = 0,117$) entre les moyennes du G-GAP chez les diabétiques ayant un âge inférieur à 60 ans (-0,44± 1,44) et ceux ayant un âge supérieur à 60 ans (0,03±1,06)

IV.6.2.3 Trou de glycation et l'activité physique

Tableau 19: Comparaison des moyennes du trou de glycation en fonction l'activité physique

Activité physique	N	Min	Max	M ± ET	p-value
Sédentaires	43	-2,33	3,19	0,16±1,07	0,327
Activités de la vie quotidienne	115	-3,30	4,94	0,10±1,16	
Activité sportive régulière	12	-1,37	1,09	-0,39±0,76	

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon l'activité physique par le *test ANOVA* a révélé une moyenne du G-GAP plus basse chez les diabétiques pratiquants une activité sportive régulière (-0,39±0,76) que celle des diabétiques sédentaires (0,16±1,07) et ceux pratiquant une activité de la vie quotidienne (0,10±1,16). Cette différence était non significative ($p = 0,327$).

IV.6.3 Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques anthropométriques

La variation du trou de glycation a été évaluée en fonction de l'indice de masse corporelle (IMC) et du tour de taille de la population d'étude.

IV.6.3.1 Trou de glycation et l'IMC

a) Etude de la corrélation entre le G-GAP et l'IMC

Tableau 20 : Test de corrélation de Pearson entre le G-GAP et l'IMC

		L'indice de masse corporelle (Kg/m ²)
G-GAP	Corrélation de Pearson	0,102
	p-value	0,189

L'indice de masse corporelle a révélé **une faible corrélation positive et non significative** avec le G-GAP, ($r = 0,102$, $p = 0,189$).

b) Comparaison des moyennes de G-GAP selon le statut pondéral

Tableau 21: Comparaison des moyennes de G-GAP selon l'IMC

		N	G-GAP % (M $\pm$ ET)	p-Value
L'IMC (Kg/m ²)	Normal	27	-0,20 $\pm$ 0,80	0,334
	Surpoids	62	0,15 $\pm$ 1,23	
	Obésité modérée	81	0,12 $\pm$ 1,11	

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon l'IMC par le test *Kruskal-Wallis* n'a révélé aucune différence significative ($p = 0,338$) entre les diabétiques ayant un IMC normal (-0,20 $\pm$ 0,80), les diabétiques en surpoids (0,15 $\pm$ 1,23) et les diabétiques modérément obèses (0,12 $\pm$ 1,11)

IV.6.3.2 Trou de glycation et le tour de taille

a) Etude de la corrélation entre le G-GAP et le tour de taille

Tableau 22 : Test de corrélation de Pearson entre le G-GAP et le tour de taille

		Tour de taille (cm)
G-GAP	Corrélation de Pearson	0,401
	p-value	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

Le tour de taille a révélé **une corrélation positive modérée et significative** avec le G-GAP, ($r = 0,401$, $p < 10^{-3}$).

a) Comparaison des moyennes du G-GAP selon le tour de taille

Tableau 23: Résultat du test *t* de comparaison des moyennes de G-GAP selon le tour de taille

		N	G-GAP % (M±ET)	p-Value
Le tour de taille (cm)	Normal	66	-0,01± 1,15	0,338
	Pathologique	104	0,15± 1,10	

La comparaison des moyennes du G-GAP par le *test t de Student* n'a révélée aucune différence statistiquement significative ($p= 0,338$) entre les diabétiques ayant un tour de taille normal (-0,01± 1,15) et ceux ayant un tour de taille pathologique (0,15± 1,10)

IV.6.4 Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques cliniques

La variation du trou de glycation a été évaluée en fonction de l'ancienneté du diabète, des antécédents familiaux du DT2 et du traitement antidiabétique en cours de la population d'étude.

IV.6.4.1 Trou de glycation et l'ancienneté du diabète

a) Etude de la corrélation

Tableau 24: Test de corrélation entre le G-GAP et l'ancienneté du diabète

		Ancienneté du diabète
G-GAP	Corrélation de Pearson	0,140
	p-Value	0,069

L'analyse de corrélation de Pearson a révélé **une faible corrélation positive** ($r= 0,140$) et **non significative** ($p=0,069$) entre le G-GAP et l'ancienneté du diabète.

b) Comparaison des moyennes :

Tableau 25 : Résultats du test *t* de comparaison de moyenne de G-GAP selon l'ancienneté du diabète

Paramètres cliniques		G-GAP (M±ET)	P-value
Ancienneté du diabète (Années)	< 7 ans	-0,07 ± 0,96	0,046*
	> 7 ans	0,27 ± 1,26	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP en fonction de l'ancienneté du diabète par le test *t de Student* a révélé une moyenne de G-GAP significativement ($p=0,046$) plus élevée chez les diabétiques ayant une ancienneté du diabète supérieure à 7ans ($0,27 \pm 1,26$) par rapport à celle inférieure à 7ans ($-0,07 \pm 0,96$).

IV.6.4.2 Trou de glycation et le type de traitement antidiabétique en cours

Les résultats de la comparaison des moyennes du G-GAP en fonction du type de traitement antidiabétique en cours sont indiqués dans les tableaux 26 et 27 respectivement.

Tableau 26 : Résultats de la comparaison de moyenne de G-GAP selon le type de traitement

Le traitement en cours	G-GAP (M $\pm$ ET)	p-value
Les ADO	-0,01 $\pm$ 1,07	0,004*
Les ADO + insuline	0,50 $\pm$ 1,29	
Insuline	0,98 $\pm$ 0,91	

ADO : les antidiabétiques oraux, * : $p < 0,05$

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon le type de traitement par le test *Kruskal-Wallis* a révélé une différence significative ($p=0,004$) entre les différents traitements antidiabétiques suivis.

Tableau 27: Analyse post hoc de comparaison du trou de glycation selon le type de traitement antidiabétique en cours

G-GAP (I)	G-GAP (J)	(I-J)	Test de Bonferroni (p-Value)
Les antidiabétiques oraux	Insuline	-1,00	0,039*
	Les antidiabétiques oraux et insuline	-0,51	0,206
Insuline	Les antidiabétiques oraux et insuline	0,48	0,909

* : $p < 0,05$

L'analyse post-hoc par le Test de Bonferroni a révélé une moyenne du trou de glycation (G-GAP) significativement ($p=0,039$) plus élevée chez les diabétiques sous insuline ($0,98 \pm 0,91$) par rapport aux diabétiques sous antidiabétiques oraux ($-0,01 \pm 1,07$).

IV.6.4.3 Trou de glycation et les antécédents familiaux du diabète type 2

Les résultats de la comparaison des moyennes du G-GAP en fonction des antécédents familiaux du diabète type 2 sont indiqués dans **le tableau 28**

Tableau 28: Résultats du test *t* de comparaison de moyenne de G-GAP selon les antécédents médicaux

Paramètres cliniques		G-GAP (M±ET)	p-value
Présence Antécédents familiaux du diabète	OUI	-0,20± 1,00	0,052
	NON	0,18± 1,14	

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP en fonction des antécédents familiaux du DT2 par la test *t de Student* a révélé une moyenne de G-GAP plus élevée chez les diabétiques ayant des antécédents familiaux de DT2 (0,18± 1,14) par rapport à ceux sans antécédents (-0,20± 1,00). Cependant cette différence n'était pas statistiquement significative (p=0,052).

IV.6.5 Evaluation du trou de glycation selon les caractéristiques biochimiques

La variation du G-GAP a été évaluée en fonction de l'ensemble des paramètres biochimiques mesurés et calculés.

a) Etude de la corrélation entre le G-GAP et les paramètres biochimique

Cette corrélation a été évaluée à l'aide du test de corrélation de Pearson. Les résultats sont rapportés dans les **Tableaux 29 et 30**.

Tableau 29: Test de corrélation entre G-GAP et les paramètres biochimiques dosés

Les paramètres biochimiques dosés	G-GAP	
	Corrélation de Pearson	p- Value
Glycémie (mmol/l)	0,431	$p < 10^{-3}$ *
HbA1c (%)	0,744	$p < 10^{-3}$ *
Fructosamine ($\mu\text{mol/l}$)	0,021	0,789
Créatinine sanguine ($\mu\text{mol/l}$)	-0,031	0,693
Urée sanguine (mmol/l)	-0,075	0,331
Cholestérol total (mmol/l)	0,285	$p < 10^{-3}$ *
Cholestérol-HDL (mmol/l)	0,095	0,220
Cholestérol-LDL (mmol/l)	0,285	$p < 10^{-3}$ *
Triglycérides (mmol/l)	0,153	0,048*
Acide urique sanguin (mmol/l)	0,458	$p < 10^{-3}$ *
Homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$)	0,487	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

L'analyse de corrélation de Pearson a révélé **des associations significatives** entre le G-GAP et plusieurs paramètres biochimiques dosés :

- **Une forte corrélation positive** avec l'HbA1c ($r = 0,744$, $p < 10^{-3}$).
- **Une corrélation positive modérée** avec la glycémie à jeun ($r = 0,431$, $p < 10^{-3}$), le cholestérol total ($r = 0,285$, $p < 10^{-3}$), le cholestérol-LDL ($r = 0,285$, $p < 10^{-3}$), l'acide urique sanguin ($r = 0,458$, $p < 10^{-3}$), l'homocystéinémie ($r = 0,487$, $p < 10^{-3}$).

Cependant, **aucune corrélation significative** n'a été révélée avec la fructosamine, la créatinine et l'urée sanguines.

Tableau 30: Test de corrélation entre G-GAP et les paramètres biochimiques calculés

	G-GAP	
	Corrélation de Pearson	p- Value
Cholestérol non-HDL (mmol/l)	0,270	$p < 10^{-3}$ *
AIP	0,114	0,142
le rapport μ ALB/Créatininurie	0,472	$p < 10^{-3}$ *
DFG e (ml/min/1.73m ²)	0,012	0,873

* : $p < 0,05$

L'analyse de corrélation de Pearson a révélé que le G-GAP présentait **une corrélation positive** modérée et statistiquement significative avec le rapport μ ALB/Créatininurie ($r = 0,472$, $p < 10^{-3}$) d'une part et le cholestérol non HDL ($r = 0,270$, $p < 10^{-3}$) d'autre part.

La recherche de l'association entre le G-GAP et les différentes classes de l'équilibre glycémique évalué par l'HbA1c, les niveaux de l'hyperhomocystéinémie et ceux de l'albuminurie a été évaluée par l'analyse de corrélation de Spearman (**figure 27, 28 et 29**). Cette évaluation a pour objectif d'appuyer les résultats de corrélation de Pearson auparavant établis

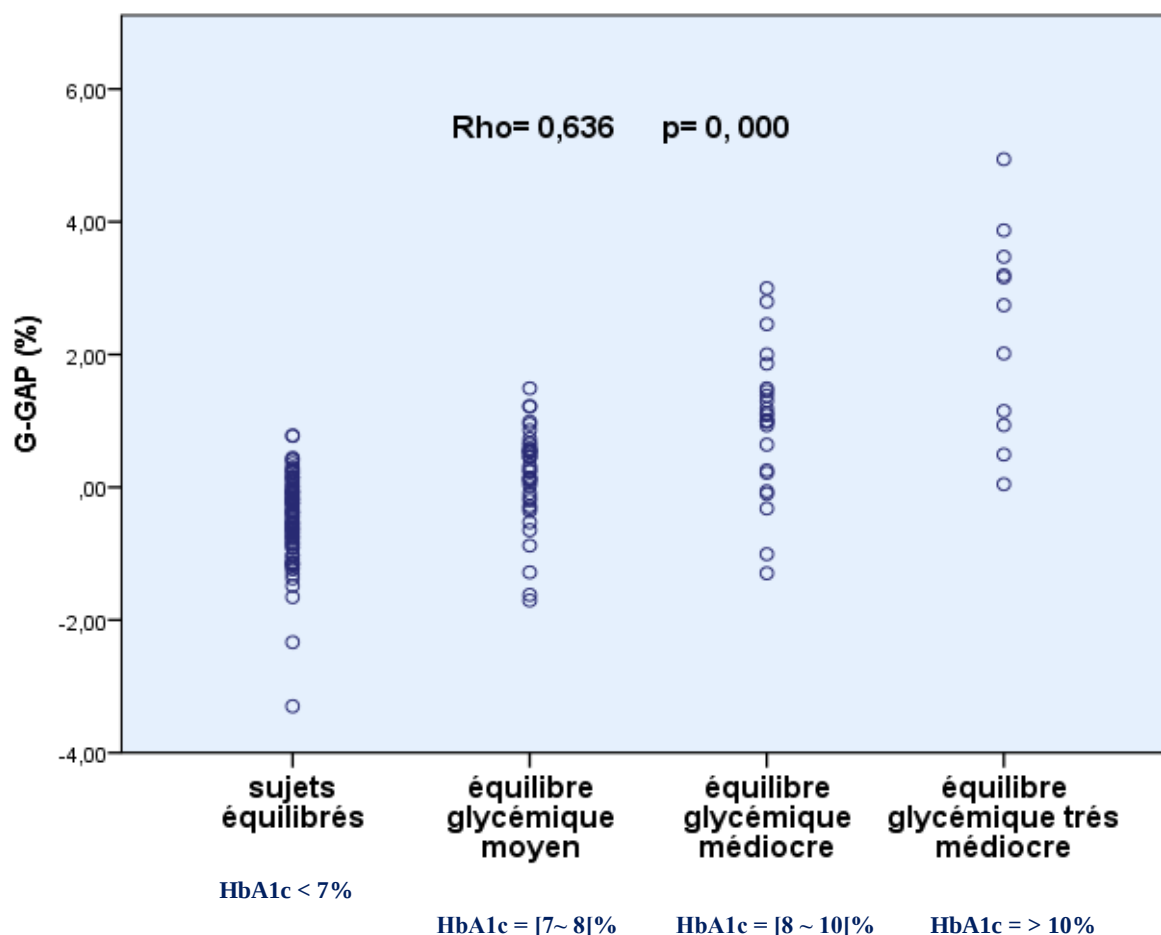


Figure 27: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les classes de l'équilibre glycémique

L'analyse de la corrélation a révélé l'existence d'une **forte corrélation positive et significative** ($r=0,636$, $p<10^{-3}$) entre les classes de l'équilibre glycémique et le G-GAP.

Une variation dans le G-GAP est fortement associée à des changements correspondants dans l'équilibre glycémique des patients.

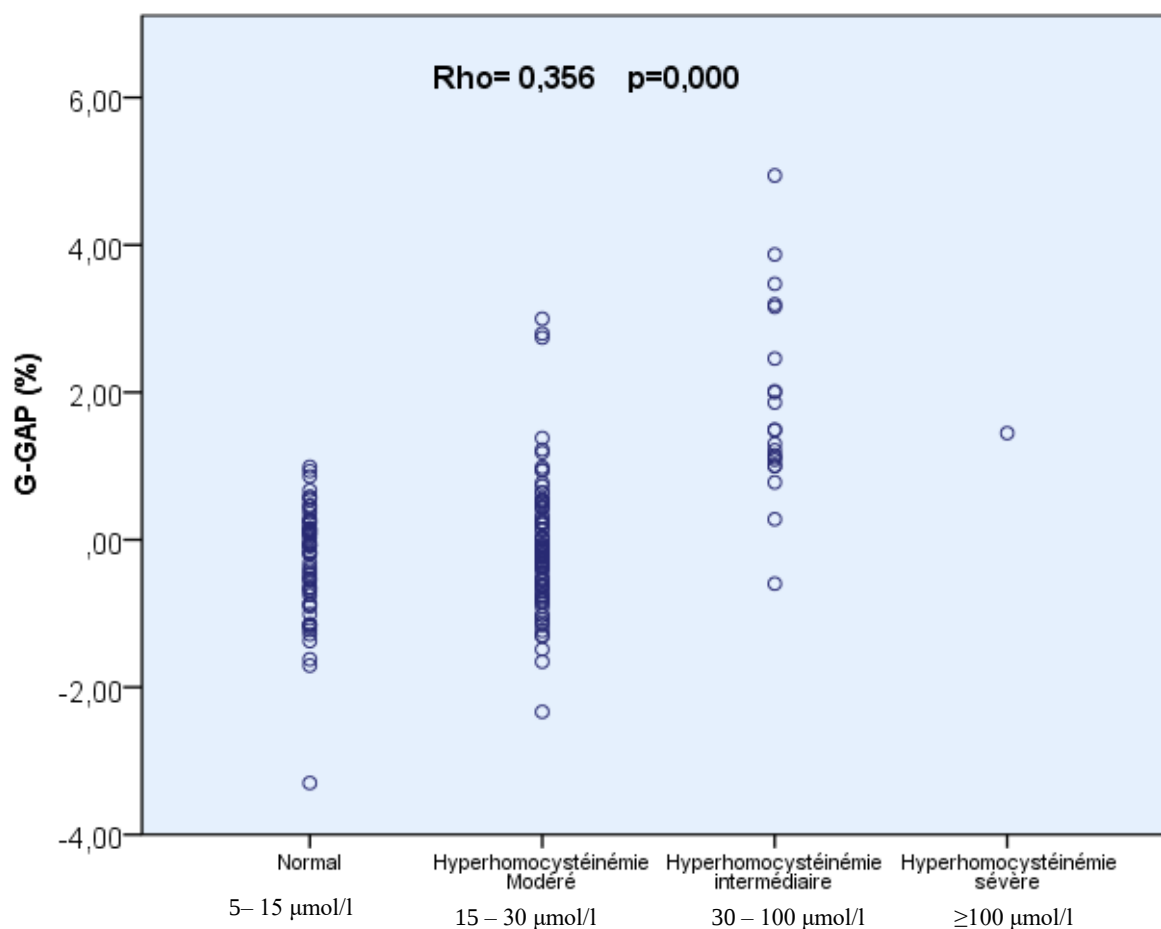


Figure 28: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les niveaux de l'homocystéinémie

L'analyse de la corrélation a révélé l'existence d'une **corrélation positive modérée et significative** ($Rho=0,356$, $p<10^{-3}$) entre les niveaux de l'hyperhomocystéinémie et le G-GAP.

Une variation dans le G-GAP est associée à des changements correspondants dans les niveaux de l'homocystéinémie

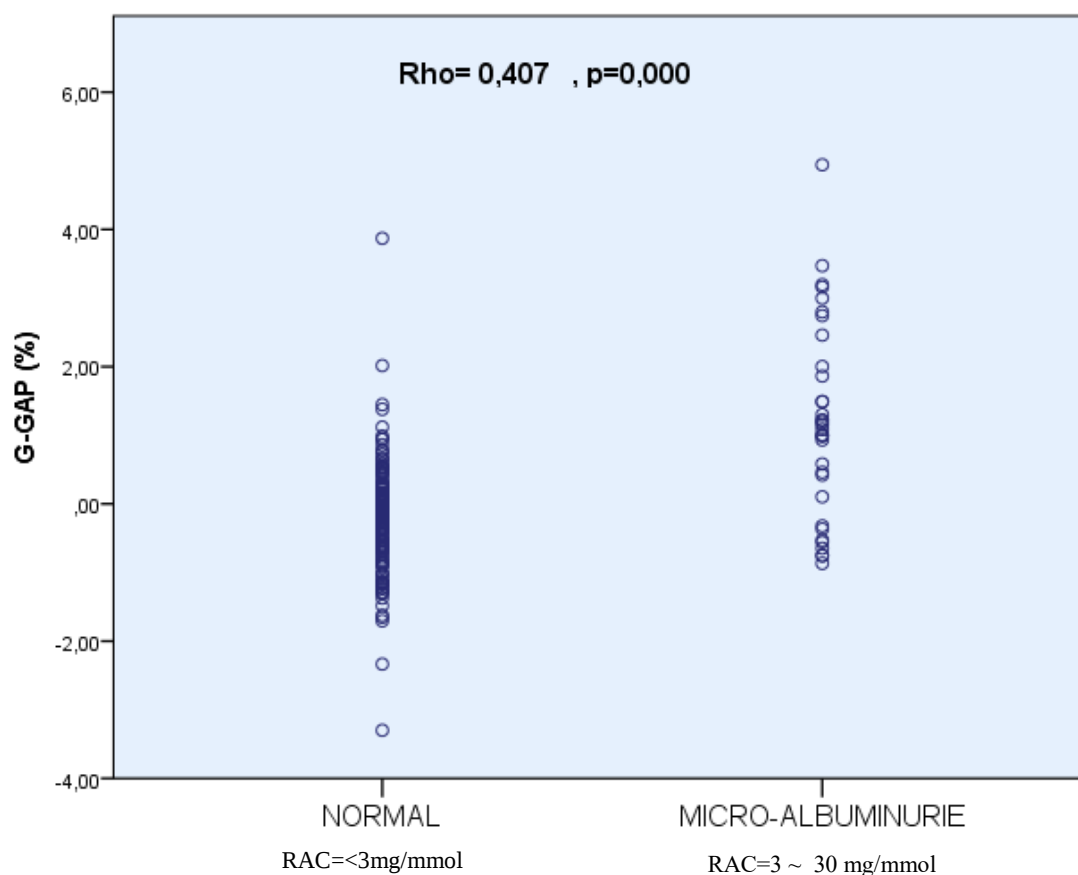


Figure 29: Test de corrélation de Spearman entre le trou de glycation et les niveaux du RAC

L'analyse de la corrélation a révélé l'existence d'une **corrélation positive modérée et significative** ($Rho=0,407$, $p<10^{-3}$) entre les niveaux du RAC et le G-GAP.

Une variation dans le G-GAP est associée à des changements correspondants dans les niveaux du RAC

b) La comparaison des moyennes :

La comparaison des moyennes des G-GAP en fonction des statuts des différents paramètres mesurés et calculés a été effectuée par le *test t de Student* et rapporté dans les **Tableaux 31 et 32**.

Tableau 31 : Comparaison des moyennes du G-GAP selon les statuts des paramètres biochimiques dosés

Les variations des tests biochimiques		M ± ET	p-Value
Glycémie à jeun (mmol/l)	< 6,10	-0,14 ± 0,68	0,212
	> 6,10	0,13 ± 1,19	
HbA1c (%)	< 7%	-0,41 ± 0,63	p<10⁻³ *
	>7%	0,79 ± 1,26	
Fructosamine (μmol/l)	< à 285	0,09 ± 1,03	0,837
	> à 285	- 0,06 ± 1,21	
Cholestérol total (mmol/l)	< à 5,20	-0,07 ± 1,03	0,002*
	> à 5,20	0,64 ± 1,23	
Cholestérol-HDL (mmol/l)	< 1.45 (H), < 1.68 (F)	0,85 ± 1,10	0,983
	> 1.45 (H), > 1.68 (F)	0,79 ± 1,30	
Cholestérol-LDL (mmol/l)	< à 2,59	-0,05 ± 1,08	0,074
	> à 2,59	0,25 ± 1,15	
Triglycérides (mmol/l)	< à 1,70	-0,03 ± 1,15	0,078
	> à 1,70	0,28 ± 1,03	
Acide urique sanguin (μmol/l)	< 416 (H), < 340 (F)	-0,12 ± 0,96	p<10⁻³ *
	> 416 (H), > 340 (F)	0,78 ± 1,32	
Homocystéinémie (μmol/l)	< 15	-0,28±0,74	p<10⁻³ *
	> 15	0,30±1,24	

* : p <0,05

L'analyse comparative de la moyenne du trou de glycation (G-GAP) en fonction des variations des paramètres biochimiques dosés par *le test t de student* a révélé une moyenne de G-GAP **significativement plus élevé** chez les sujets diabétiques présentant :

- Un taux d'HbA1c > 7% (p<10⁻³)
- Une hyper-cholestérolémie > à 5,20 mmol/l (p=0,002)
- Une hyper-uricémie > 416 μmol/L chez les hommes et > 340 μmol/L chez les femmes (p<10⁻³)
- Une hyper-homocystéinémie > 15μmol/l (p<10⁻³).

Tableau 32: Comparaison des moyennes du G-GAP selon les variations des paramètres biochimiques calculés

Les variations des tests biochimiques		M ± ET	p-Value
Cholestérol non-HDL (mmol/l)	< 3,36	-0,07 ± 1,05	0,029*
	> 3,36	0,31 ± 1,17	
AIP	< 0,11	-0,013 ± 1,20	0,424
	> 0,11	0,12 ± 0,93	
DFGe (ml/min/m ²)	> 90	-0,00 ± 1,27	0,517
	< 90	0,12 ± 1,06	
DFGe (ml/min/m ²)	> 60	0,05 ± 1,13	0,542
	< 60	0,18 ± 1,09	
RAC (mg/mmol)	< 3	-0,19 ± 0,82	p<10 ⁻³ *
	> 3	1,19 ± 1,42	

* : p < 0,05

L'analyse comparative de la moyenne du trou de glycation (G-GAP) en fonction des variations des paramètres biochimiques calculés par le test *t de student* a révélé une moyenne de G-GAP significativement plus élevée chez les sujets diabétiques présentant :

- Un RAC > 3mg/mmol (p<10⁻³, 1,19 ± 1,42% vs -0,19 ± 0,82%)
- Un cholestérol non HDL > 3,36 mmol/l (p=0,029, 0,31 ± 1,17% vs -0,07 ± 1,05%)

IV.7 Evaluation du profil de glycation de la population d'étude

Le calcul du trou de glycation nous a permis de classer les sujets diabétiques de la population d'étude en trois groupes

- Glyqueurs bas : G-GAP < -1%
- Glyqueurs moyens : G-GAP = [-1 ~ +1]%
- Glyqueurs élevés : G-GAP > +1%

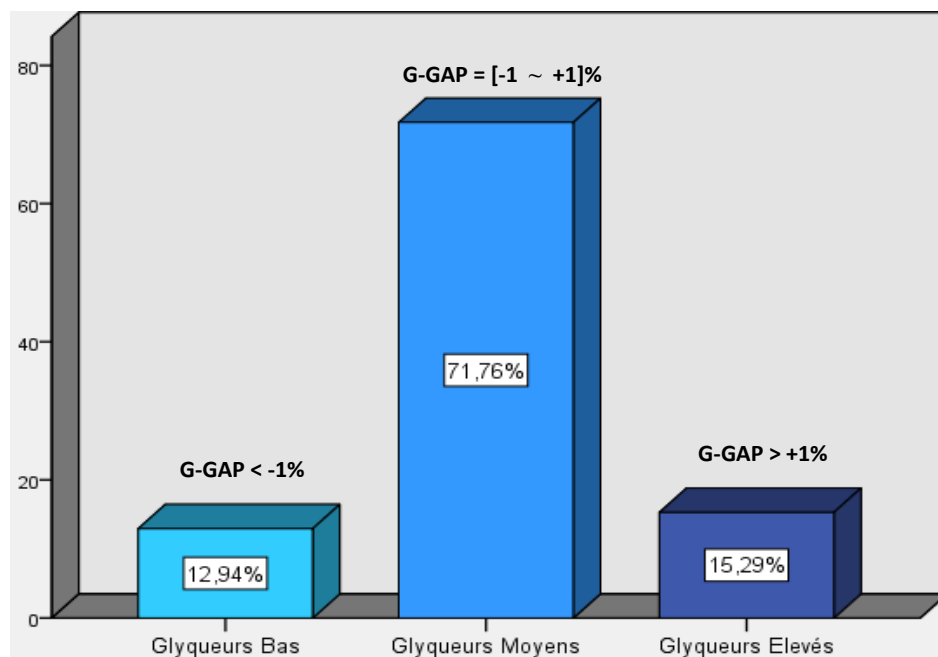


Figure 30: Répartition de la population d'étude selon le profil de glycation

IV.7.1 Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques sociodémographiques

Les trois groupes de glyqueurs (bas, moyens et élevés) ont été comparés selon le sexe, l'âge, et l'activité physique. La comparaison des moyennes a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, tandis que la comparaison des fréquences a été réalisée en utilisant le test de Fisher. Les résultats sont présentés dans le **tableau 33**.

Tableau 33: La comparaison des caractéristiques sociodémographiques selon le profil de glycation

Les caractéristiques	La variation	G- Bas N= 22	G- Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p- Value
Le sexe	Hommes	45,5%	38,5%	30,8%	0,574
	Femmes	54,5%	61,5%	69,2%	
L'âge (Années)	M $\pm$ ET	62 $\pm$ 9	60 $\pm$ 8	57 $\pm$ 10	0,153
	Inférieur à 60 ans	31,8%	54,9%	57,7%	0,116
	Supérieur à 60 ans	68,2%	45,1%	42,3%	
L'activité physique	Sédentaires	22,7%	23,8%	38,5%	0,322
	de la vie quotidienne	63,6%	70,5%	57,7%	
	sportive régulière	13,6%	5,7%	3,8%	

G- : Glyqueurs, M= moyenne, ET=écart type.

Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les trois groupes de glyqueurs concernant le sexe, l'âge, l'activité physique

Cela suggère que ces facteurs n'ont pas d'influence significative sur les niveaux du G-GAP.

IV.7.2 Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques anthropométriques

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction de leur indice de masse corporelle (IMC) et de leur tour de taille.

IV.7.2.1 L'IMC et le profil de glycation

La comparaison des moyennes de l'IMC entre les trois groupes de glyqueurs a été réalisée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. (**Figure 31**)

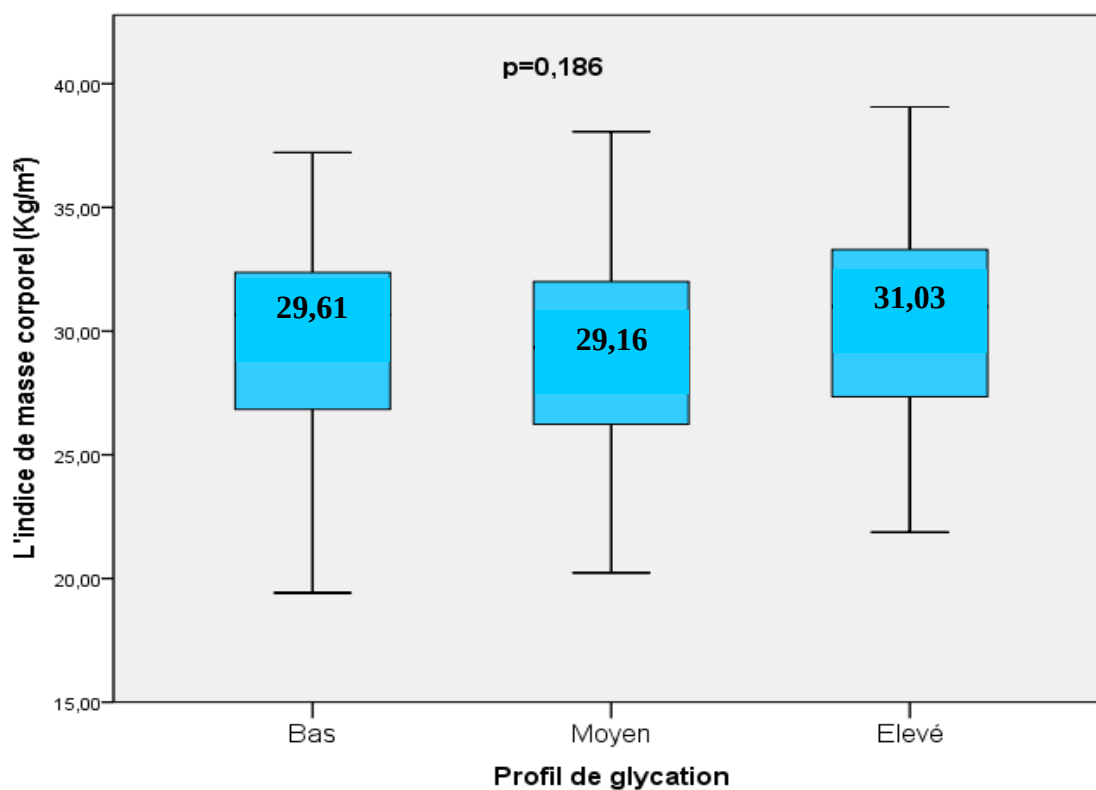


Figure 31: Comparaison des moyennes de l'IMC selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes de l'IMC selon le profil de glycation a révélé l'absence de différence significative ($p=0,186$) entre les trois groupes de glyqueurs.

IV.7.2.2 Le tour de taille et le profil de glycation

La comparaison des moyennes de tour de taille entre les trois groupes de glyqueurs a été réalisée à l'aide du test ANOVA, (**Figure 32**) suivie d'une analyse post hoc avec le test de Tukey. (**Tableau 34**)

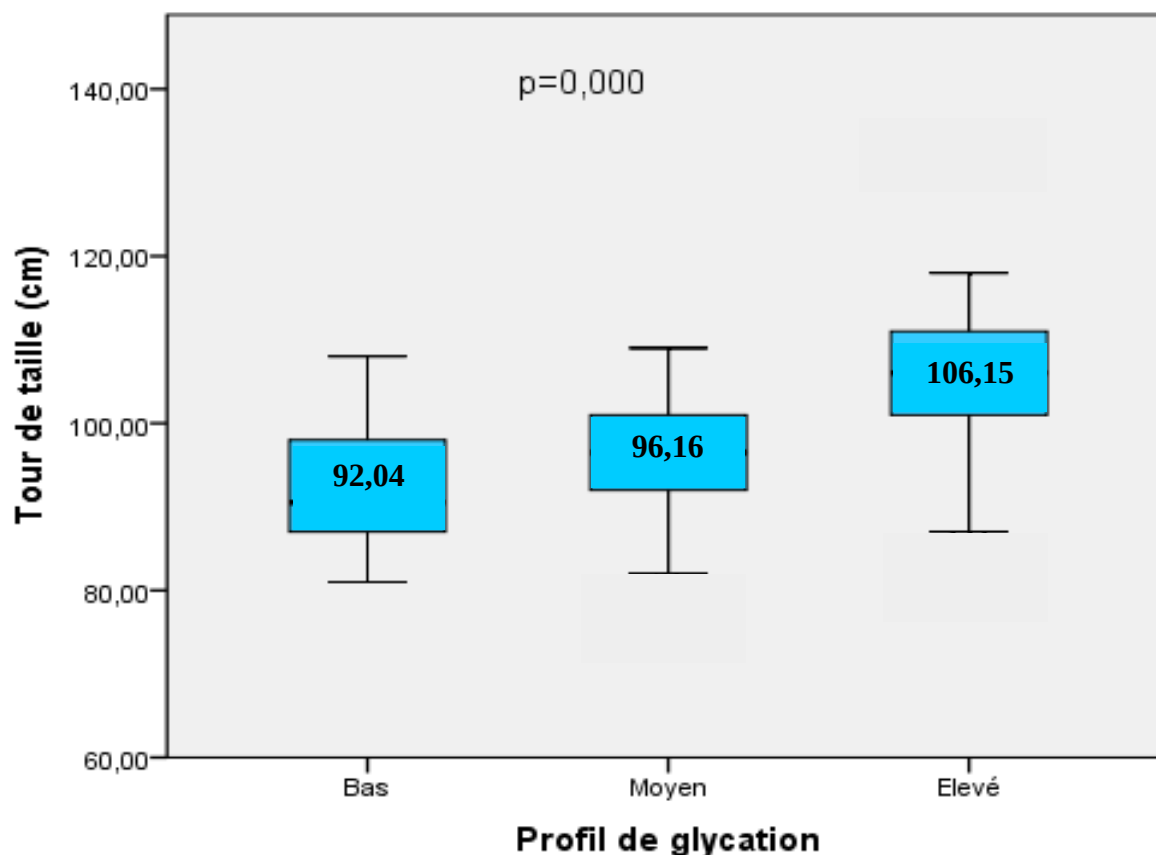


Figure 32: Comparaison des moyennes de tour de taille selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes du tour de taille en fonction de du profil de glycation a révélé l'existence d'une différence significative ($p < 10^{-3}$) entre les trois groupes de glyqueurs

Tableau 34: Analyse post hoc de comparaison du tour de taille selon le profil de glycation

Tour de taille (I)	Tour de taille(J)	(I-J)	p-Value
G-Bas	G-Moyens	-4,11	0,051
	G-Elevés	-14,10	$p < 10^{-3}$ *
G-Moyens	G-Elevés	-9,98*	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

L'analyse post-hoc a révélé une moyenne de tour de taille significativement supérieure :

- De 14,1 cm chez les glyqueurs élevés que les glyqueurs bas ($p < 10^{-3}$).
- De 9,98 cm chez les glyqueurs levés que les glyqueurs moyens ($p < 10^{-3}$)

Par contre l'analyse post-hoc a révélé que la moyenne du Tour de taille n'était pas significativement différente entre les glyqueurs moyens et les glyqueurs bas.

IV.7.3 Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques cliniques

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés selon l'ancienneté de leur diabète, la présence des antécédents familiaux du DT2 et leur traitement antidiabétique en cours.

IV.7.3.1 L'ancienneté du diabète et le profil de glycation

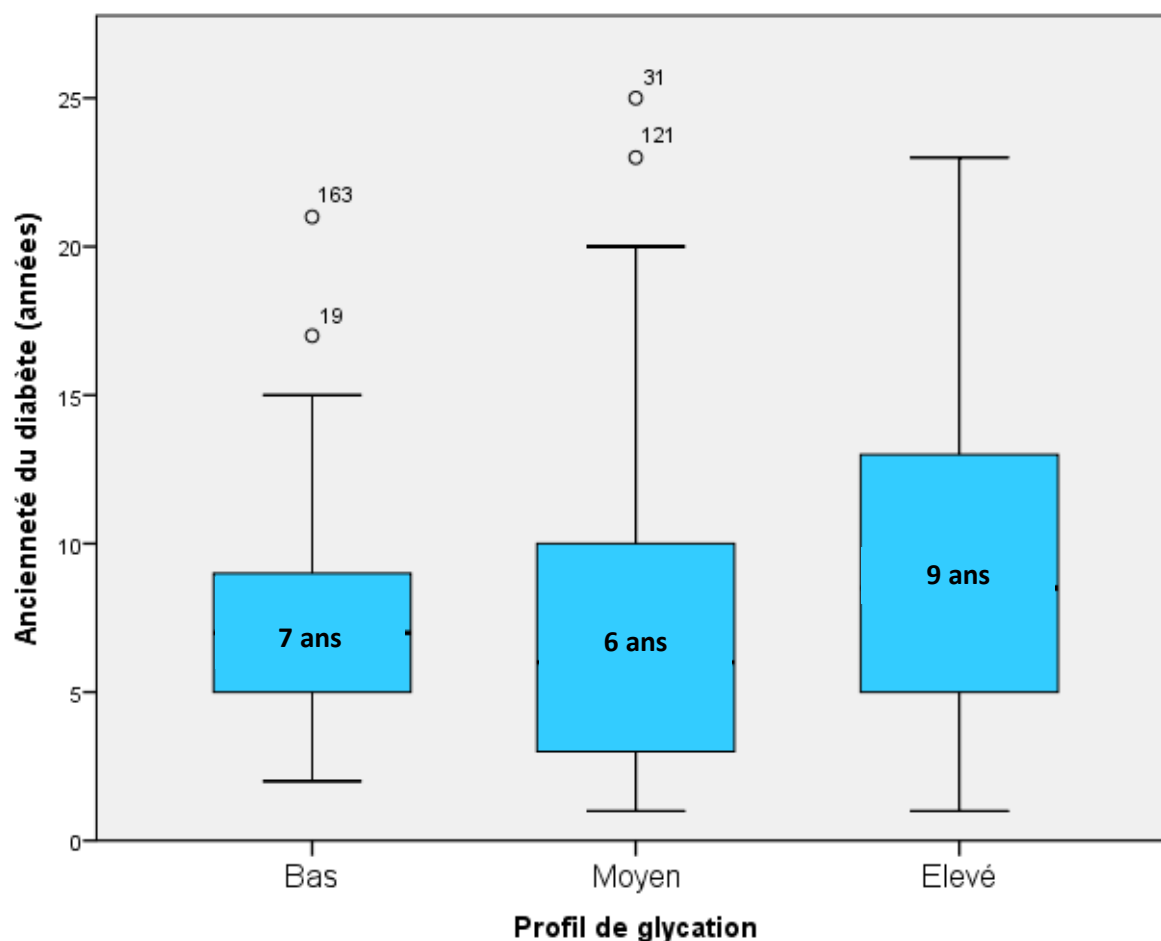


Figure 33: comparaison des moyennes de l'ancienneté du diabète selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes de l'ancienneté du diabète selon le profil de glycation par le test de Kruskal Wallis a révélé l'absence de différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,178$)

IV.7.3.2 Le traitement antidiabétique en cours et le profil de glycation

La comparaison des fréquences du traitement antidiabétique en cours a été réalisée en utilisant le test de Fisher. Les résultats sont présentés dans **le tableau 35**.

Tableau 35 : Comparaison des modalités du traitement antidiabétique en cours selon le profil de glycation

Le traitement en cours	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p- Value
Les ADO	90,9%	87,7%	69,2%	0,066
Les ADO + insuline	9,1%	9,0%	15,4%	
Insuline	0,0%	3,3%	15,4%	

L'analyse comparative du type de traitement antidiabétique en cours selon le profil de glycation n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,066$)

IV.7.3.3 Les antécédents familiaux du diabète type 2 et le profil de glycation

La comparaison des fréquences des antécédents familiaux du DT2 a été réalisée en utilisant le test de Fisher. Les résultats sont rapportés dans **le tableau 36**.

Tableau 36: Comparaison des caractéristiques cliniques selon le profil de glycation

Les Antécédents familiaux de diabète	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p- Value
OUI	22,7%	27%	19,2%	0,755
NON	77,3%	73%	80,8%	

L'analyse comparative des antécédents familiaux du DT2 en fonction du profil de glycation a révélé l'absence de différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,755$).

IV.7.4 Evaluation du profil de glycation selon les caractéristiques biochimiques

IV.7.4.1 L'équilibre glycémique et le profil de glycation

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction de leur équilibre glycémique, évalué par le dosage de l'HbA1c et de la fructosamine

IV.7.4.1.1 L'HbA1c :

a) La comparaison des moyennes d'HbA1c selon le profil de glycation :

Elle a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis (**Figure 34**), suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni (**Tableau 37**).

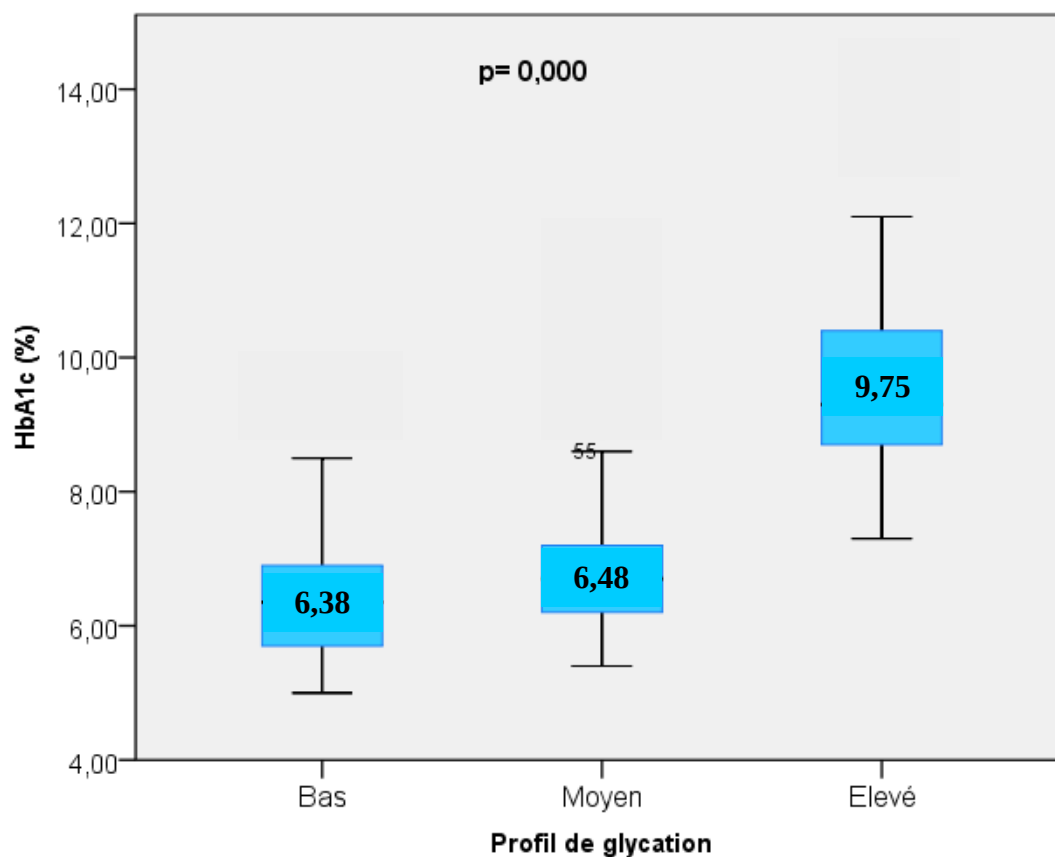


Figure 34: Comparaison des moyennes de l'HbA1c selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes de l'HbA1c en fonction du profil de glycation a montré une **différence significative** entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 10^{-3}$).

Tableau 37: L'analyse post hoc de comparaison de l'HbA1c selon le profil de glycation.

HbA1c (%) (I)	HbA1c (%) (J)	(I-J)	p-Value
G-Bas	G-Moyens	-0,34	0,547
	G-Elevés	-3,27	$p < 10^{-3}$ *
G-Elevé	G-Moyens	2,92	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

L'analyse post hoc a révélé chez les glyqueurs élevés une moyenne d'HbA1c (9,75%) significativement ($p < 10^{-3}$) supérieure à celle des glyqueurs moyens (6,48%) et des glyqueurs bas (6,38%).

b) La comparaison des statuts de l'HbA1c selon le profil de glycation

Tableau 38 : Comparaison des statuts de l'HbA1c selon le profil de glycation

Les variations des tests biologiques		G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p-Value
HbA1c (%)	< à 7	77,3%	68,0%	0,0%	p<10⁻³ *
	> à 7	22,7%	32,0%	100,0%	

* : p <0,05

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux d'HbA1c par le test exact de Fisher, a montré une fréquence d'HbA1c > 7% significativement supérieure chez les glyqueurs élevés (100%) par rapport à celle des glyqueurs bas (22,7%) et moyens (32%) (p<0,0001).

c) L'analyse de concordance

Pour évaluer la relation entre les trois groupes de glyqueurs et les différentes classes de l'équilibre glycémique évalué par l'HbA1c, nous avons utilisé l'analyse de concordance en calculant le Tau-B de Kendall. Les résultats sont rapportés dans le tableau 39.

Tableau 39 : Analyse de concordance entre les classes de l'HbA1c et les groupes de glyqueurs

	Les classes de l'HbA1c	
	Tau-B de Kendall	p- Value
Les trois groupes de glyqueurs	0,476	p<10⁻³ *

* : p <0,05

L'analyse a révélé l'existence d'une concordance positive modérée (Tau-B= 0,476) et significative (p<10⁻³) entre le profil de glycation et les classes de l'HbA1c. Plus précisément, une augmentation du profil de glycation tend à être associée à une augmentation modérée des niveaux de l'HbA1c.

IV.7.4.1.2 La fructosamine

a) La comparaison des moyennes de fructosamine selon le profil de glycation

Elle a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis (Figure 35), suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni. (Tableau 40)

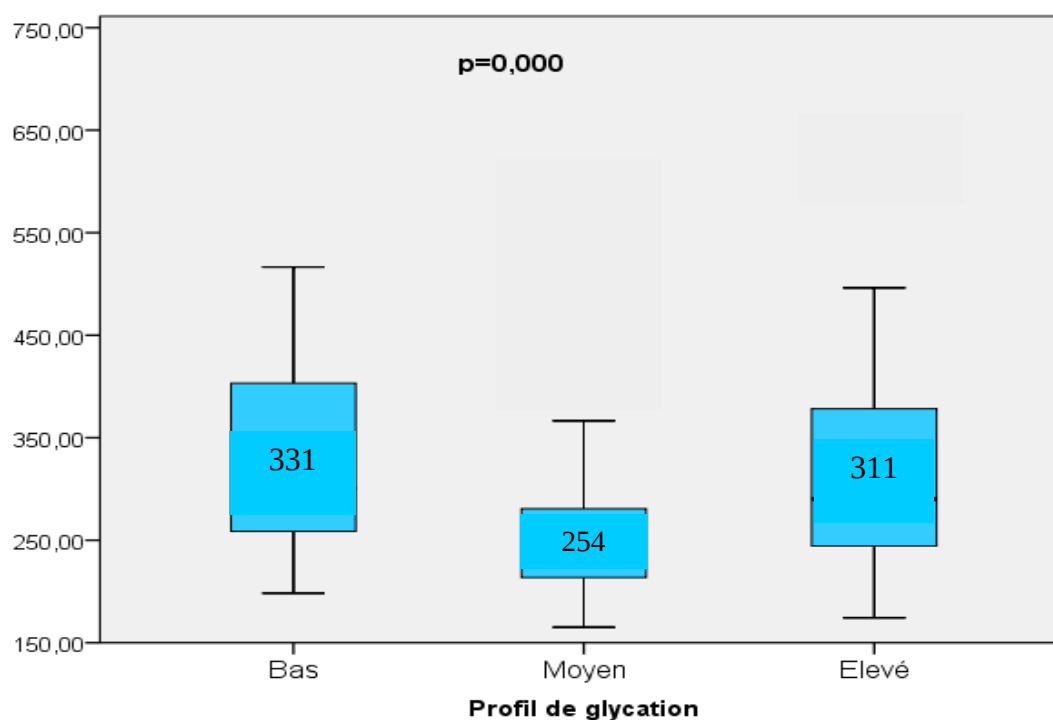


Figure 35: Comparaison des moyennes de fructosamine selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes la fructosmaine en fonction du profil de glycation a montré **une différence significative** entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 10^{-3}$).

Tableau 40 : L'analyse post hoc de comparaison de fructosamine selon le profil de glycation.

Fructosamines (µmol/l) (I)	Fructosamines (µmol/l) (J)	(I-J)	p-Value
G-Bas	G-Moyens	77,39	$p < 10^{-3} *$
	G-Elevés	20,52	1,000
G-Elevé	G-Moyens	56,87	0,001*

* : $p < 0,05$

L'analyse post hoc a révélé une moyenne de fructosamine significativement plus élevée chez les glyqueurs bas que celle des glyqueurs moyens ($p < 0,0001$) avec une différence moyenne de 77,39 $\mu\text{mol/l}$. De plus, la moyenne de fructosamine était significativement supérieure chez les glyqueurs élevés par rapport à celle des glyqueurs moyens ($p = 0,001$) avec une différence moyenne de 56,78 $\mu\text{mol/l}$.

b) La comparaison des variations de la fructosamine selon le profil de glycation

Tableau 41: Comparaison des variations de la fructosamine selon le profil de glycation

Fructosamine ($\mu\text{mol/l}$)	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p-Value
< à 285	81,8%	97,5%	92,3%	0,011*
> à 285	18,2%	2,5%	7,7%	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux de la fructosamine par le test exact de FISHER a montré l'existence d'une fréquence de fructosamine > à 285 $\mu\text{mol/l}$ significativement ($p = 0,011$) plus élevée chez les glyqueurs bas (18,2%) versus glyqueurs élevés (7,7%) et moyens (2,5%).

IV.7.4.2 Les paramètres de la fonction rénale et le profil de glycation

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction de leur bilan rénal, évalué par le dosage de la créatinine sanguine, l'urée sanguine, le calcul du débit de filtration glomérulaire et le rapport de micro-albuminurie sur créatininurie (RAC).

IV.7.4.2.1 La créatinine et l'urée

La comparaison des moyennes de la créatinine et de l'urée au niveau sanguin a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, les résultats sont rapportés dans le tableau 42.

Tableau 42 : Comparaison de moyennes de la créatinine et l'urée sanguines en fonction du profil de glycation

paramètres sanguins	Profil de glycation	M ± ET	Min	Max	p-Value
urée (mmol/l)	Bas N=22	5,25 ± 1,26	3,61	7,41	0,259
	Moyen N=122	4,88 ± 1,61	2,05	9,99	
	Elevé N=26	4,71 ± 1,57	2,25	9,69	
créatinine (µmol/l)	Bas N=22	74 ± 21	41	115	0,915
	Moyen N=122	72 ± 17	36	120	
	Elevé N=26	72 ± 20	42	127	

L'analyse comparative des moyennes de la créatinine et l'urée sanguines en fonction du profil de glycation n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs $p=0,259$ et $p=0,915$ respectivement.

IV.7.4.2.2 Le DFGe

La comparaison des moyennes du DFG estimé a été réalisée à l'aide du test ANOVA, les résultats sont rapportés dans le tableau 43.

Tableau 43: Comparaison de moyenne des du DFGe en fonction du profil de glycation

Le paramètre	Profil de glycation	M ± ET	Min	Max	p-Value
DFGe (ml/min/1.73m ²)	Bas N=22	83,54± 29,40	37,89	147,76	0,530
	Moyen N=122	77,87 ± 23,37	32,60	147,84	
	Elevé N=26	81,98 ± 31,03	40,99	178,49	

M= moyenne, MIN= minimum, MAX=maximum, ET=écart type, DFGe= Débit de filtration glomérulaire estimé,

L'analyse comparative des moyennes du DFGe en fonction du profil de glycation n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs $p=0,530$.

IV.7.4.2.3 Le rapport micro-albuminurie sur créatininurie

a) La comparaison des moyennes du RAC selon le profil de glycation :

Elle a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis (Figure 36) suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni (Tableau 44)

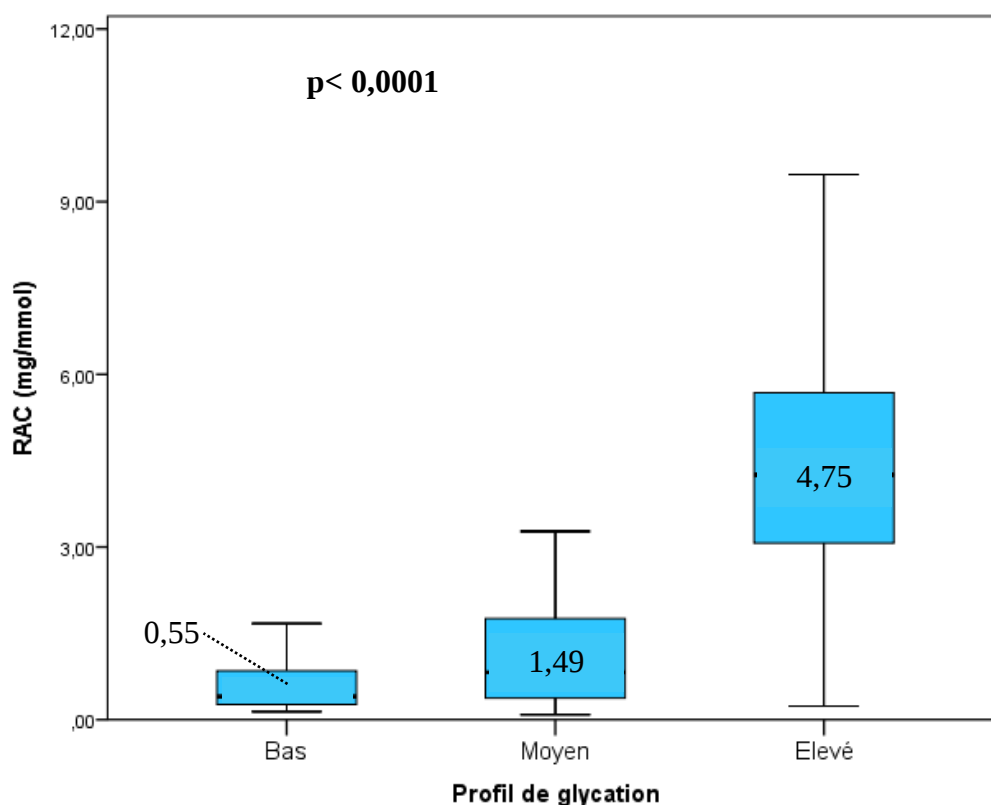


Figure 36: Comparaison des moyennes du RAC selon le profil de glycation

L'analyse comparative des moyennes du RAC en fonction du profil de glycation a montré une **différence significative entre les trois groupes de glyqueurs** ($p < 0,0001$).

Tableau 44: L'analyse post hoc de comparaison du RAC selon le profil de glycation

Le rapport μ ALB/Créatininurie (I)	Le rapport μ ALB/Créatininurie (J)	(I-J)	p- Value
G-Bas	G-Moyens	-0,94	0,102
G-Elevés	G-Bas	4,20	$p < 10^{-3} *$
	G-Moyens	3,25	$p < 10^{-3} *$

* : $p < 0,05$

L'analyse post hoc a révélé **une moyenne du RAC significativement ($p < 10^{-3}$) supérieure chez les glyqueurs élevés (4,75mg/mmol) comparativement à celle des glyqueurs moyens (1,49 mg/mmol) et des glyqueurs bas (0,55mg/mmol).**

b) La comparaison des variations du RAC selon le profil du glycation :

La comparaison des fréquences a été réalisée en utilisant le test exact de *Fisher*. Les résultats sont rapportés dans le tableau 45.

Tableau 45: Comparaison des variations du RAC selon le profil de glycation

RAC (mg/mmol)	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p-Value
< 3	100,0%	88,5%	23,1%	$p < 10^{-3} *$
> 3	0,0%	11,5%	76,9%	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux du RAC par *le test exact de Fisher* a montré une fréquence du RAC > 3 mg/mmol significativement ($p < 10^{-3}$) supérieure chez les glyqueurs élevés (76,9%) comparée à celle chez les glyqueurs bas (0 %) et moyens (11,5%)

c) L'analyse de concordance :

Pour évaluer la relation entre les trois groupes de glyqueurs et les différentes classes du RAC, nous avons utilisé l'analyse de concordance en calculant le Tau-B de Kendall. Les résultats sont rapportés dans le tableau 46.

Tableau 46: Analyse de concordance entre les groupes de glyqueurs et les classes du RAC

	Catégorie du RAC (mg/mmol)	
	Tau-B de kendall	p- Value
Les trois groupes de glyqueurs	0,518	$p < 10^{-3} *$

* : $p < 0,05$

L'analyse de concordance de Kendall entre le profil de glycation et les niveaux du RAC a révélé l'existence d'une forte concordance (Tau-B= 0,518) positive et significative ($p < 10^{-3}$)

d) L'estimation du risque :

Pour quantifier la force de l'association entre le profil de glycation et les niveaux de l'albuminurie, nous avons calculé l'Odds Ratio (OR).

Tableau 47: Estimation du risque de RAC pathologique par rapport au profil de glycation

	Valeur	Intervalle de confiance de 95%	
		Inférieur	Supérieur
Odds Ratio	30,95	10,66	89,87

Les diabétiques ayant un RAC pathologique ($> \text{à } 3 \text{ mg/mmol}$) présentaient 30 fois plus de risque (IC à 95% = [10,66 – 89,87]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP $> \text{à } 1$) par rapport aux diabétiques ayant un RAC normal.

Ce résultat indique une forte association statistiquement significative entre un taux de glycation élevé et un risque accru de micro-albuminurie.

IV.7.4.3 Les paramètres du bilan lipidique et le profil de glycation

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction de leur bilan lipidique, évalué par le dosage du cholestérol total, le cholestérol HDL, LDL et les triglycérides.

a) La comparaison des moyennes :

La comparaison des moyennes a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni. Les résultats sont rapportés dans **les tableaux 48 et 49** respectivement

Tableau 48: Comparaison des moyennes des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation

Les paramètres	Profil de glycation	M ± ET	Min	Max	p-Value
Le cholestérol total (mmol/l)	Bas	3,59 ± 1,18	1,74	6,26	p<10 ⁻³ *
	Moyens	4,23 ± 1,13	0,59	8,56	
	Elevés	5,46 ± 1,41	3,14	8,04	
Les triglycérides (mmol/l)	Bas	1,18 ± 0,54	0,44	2,65	0,003**
	Moyens	1,61 ± 1,03	0,45	7,43	
	Elevés	1,98 ± 0,97	0,85	4,43	
Le cholestérol-HDL (mmol/l)	Bas	1,11 ± 0,37	0,55	1,86	0,156
	Moyens	1,12 ± 0,33	0,40	2,13	
	Elevés	1,29 ± 0,45	0,61	2,79	
Le cholestérol-LDL (mmol/l)	Bas	1,93 ± 0,80	0,70	3,64	p<10 ⁻³ *
	Moyens	2,50 ± 0,89	1,09	6,29	
	Elevés	3,31 ± 1,16	1,69	5,54	

* : p <0,05

L'analyse comparative des moyennes des différents paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation a révélé une différence significative pour le cholestérol total (p<10⁻³), Les triglycérides (p=0,003) et le cholestérol LDL (p<10⁻³) entre les trois groupes.

Tableau 49: L'analyse post hoc de comparaison des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation

Les paramètres	(I)	(J)	(I-J)	p-Value
Le cholestérol total (mmol/l)	Bas	Moyen	-0,64	0,054
	Elevé	Bas	1,87*	p<10 ⁻³ *
		Moyen	1,23*	p<10 ⁻³ *
Les triglycérides (mmol/l)	Bas	Moyen	-0,43	0,172
	Elevé	Bas	0,80*	0,015*
		Moyen	0,37	0,235
Le cholestérol-LDL (mmol/l)	Bas	Moyen	-0,56*	0,030*
	Elevé	Bas	1,37*	p<10 ⁻³ *
		Moyen	0,81*	p<10 ⁻³ *

* : p <0,05

L'analyse post-hoc a révélé :

- **Pour le cholestérol :**
- Une moyenne **significativement plus élevée** du **cholestérol total** chez les **glyqueurs élevés** que les glyqueurs bas et moyens avec une différence moyenne de 1,87 mmol/l et 1,23mmol/l respectivement ($p < 10^{-3}$).
- Une moyenne **significativement plus élevée** du **cholestérol LDL** chez les **glyqueurs élevés** que les glyqueurs bas et moyens avec une différence moyenne de 1,37 mmol/l et 0,81 mmol/l respectivement ($p < 10^{-3}$).
- Une moyenne **de cholestérol LDL significativement plus élevée** chez glyqueurs moyens par rapport aux glyqueurs bas avec une différence moyenne de 0,56 mmol/l ($p = 0,030$).
- **Pour les triglycérides :**
- Une moyenne **significativement plus élevée** chez les **glyqueurs élevés** par rapport aux glyqueurs bas avec une différence moyenne de 0,80 mmol/l ($p = 0,015$).

b) La comparaison des variations des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation :

La comparaison des fréquences des variations des paramètres du bilan lipidique a été réalisée par le test de Fisher. Les résultats sont rapportés dans **le tableau 50**.

Tableau 50: Comparaison des variations des paramètres du bilan lipidique selon le profil de glycation

Les paramètres	La variation	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p-Value
Cholestérol total (mmol/l)	< à 5,20	90,9%	82,8%	42,3%	$p < 10^{-3} *$
	> à 5,20	9,1%	17,2%	57,7%	
Triglycérides (mmol/l)	< à 1,70	81,8%	62,3%	50,0%	0,070
	> à 1,70	18,2%	37,7%	50,0%	
Cholestérol-HDL (mmol/l)	< 1.45 (H), < 1.68 (F)	81,8%	91,8%	80,8%	0,125
	> 1.45 (H), > 1.68(F)	18,2%	8,2%	19,2%	
Cholestérol-LDL (mmol/l)	< à 2,59	68,2%	55,7%	30,8%	0,022*
	> à 2,59	31,8%	44,3%	69,2%	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux des différents paramètres du bilan lipidique par le *test exact de Fisher* a révélé une fréquence significativement plus élevée:

- d'hypercholestérolémie chez les glyqueurs élevés (57,7%) comparativement aux glyqueurs bas (9,1%) et moyens (17,2%) ($p < 10^{-3}$).
- de **Cholestérol-LDL** $> 2,59$ mmol chez les glyqueurs élevés (69,2%) comparativement aux glyqueurs bas (31,8%) et moyens (44,3%) ($p = 0,022$).

IV.7.4.4 Le risque athérogène et le profil de glycation:

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction de leur risque athérogène, évalué par le calcul de deux indices d'athérogénécité : le **cholestérol non HDL** et l'**indice d'athérogénécité plasmatique (AIP)**.

a) La comparaison des moyennes :

Elle a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni. Les résultats sont rapportés dans les tableaux 51 et 52 respectivement.

Tableau 51: Comparaison des moyennes des indices d'athérogénécité selon le profil de glycation

Les paramètres	Profil de glycation	M $\pm$ ET	p-Value
Cholestérol non-HDL (mmol/l)	Bas	2,48 $\pm$ 1,09	$p < 10^{-3} *$
	Moyens	3,11 $\pm$ 1,10	
	Elevés	4,17 $\pm$ 1,35	
Atherogenic index of plasma(AIP)	Bas	0,00 $\pm$ 0,24	0,161
	Moyens	0,11 $\pm$ 0,31	
	Elevés	0,16 $\pm$ 0,24	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative des moyennes du cholestérol non HDL et l'AIP selon le profil de glycation a révélé une différence significative uniquement pour le **cholestérol non HDL** ($p < 10^{-3}$) entre les trois groupes.

Tableau 52: L'analyse post hoc de comparaison des indices d'athérogénécité selon le profil de glycation

Le cholestérol non HDL (mmol/l) (I)	Le cholestérol non HDL (mmol/l) (J)	(I-J)	p-Value
G-Bas	G-Moyen	-0,62	0,055
G-Elevé	G-Bas	1,69	$p < 10^{-3} *$
	G-Moyen	1,06	$p < 10^{-3} *$

* : $p < 0,05$

L'analyse post-hoc a révélé une moyenne de **cholestérol non HDL** significativement supérieure chez les glyqueurs élevés comparativement aux glyqueurs bas et moyens avec une différence moyenne de 1,69 mmol/l et 1,06 mmol/l respectivement ($p < 10^{-3}$).

b) La comparaison des variations des indices d'athérogénécité :

La comparaison des fréquences a été réalisée par le test exact de *Fisher*. Les résultats sont rapportés dans le tableau 53.

Tableau 53: Comparaison des variations des indices d'atherogénécité selon le profil de glycation

Les paramètres	La variation	G-Bas N= 22	G-Moyens N= 122	G- Elevés N=26	p-Value
Cholestérol non-HDL (mmol/l)	< 3,36	81,8%	61,5%	26,9%	$p < 10^{-3} *$
	> 3,36	18,2%	38,5%	73,1%	
Atherogenic index of plasma(AIP)	< 0,11	63,6%	51,2%	41,7%	0,357
	> 0,11	36,4%	48,8%	58,3%	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux des indices d'athérogénécité par le test exact de *Fisher* a révélé une fréquence de **Cholestérol non HDL** >3,36 mmol significativement ($p < 10^{-3}$) supérieure chez les glyqueurs élevés (73,1%) comparativement aux glyqueurs bas (18,2%) et moyens (38,5%).

c) L'estimation du risque :

Pour quantifier la force de l'association entre le niveau de glycation élevé et le taux du cholestérol non -HDL, nous avons calculé l'Odds Ratio (OR).

Tableau 54: Estimation du risque de cholestérol non HDL pathologique par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :

	Valeur	Intervalle de confiance de 95%	
		Inférieur	Supérieur
Odds Ratio	4,95	1,95	12,58

Les diabétiques un taux de cholestérol non HDL > 3,36 mmol/l présentaient 5 fois plus de risque (IC à 95% = [2,56 – 47,41]) d’avoir un profil de glycation élevé (G-GAP > à 1) par rapport aux diabétiques ayant un taux normal.

IV.7.4.5 L’homocystéine et le profil de glycation:

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction du niveau d’homocystéine plasmatique, considéré comme un facteur de risque indépendant pour les maladies cardiovasculaires.

a) La comparaison des moyennes de l’homocystéinémie en fonction du profil de glycation :

Elle a été effectuée à l’aide du test de Kruskal-Wallis, suivie d’une analyse post hoc avec le test de Bonferroni. Les résultats sont rapportés dans la figure 37 et le tableau 55 respectivement.

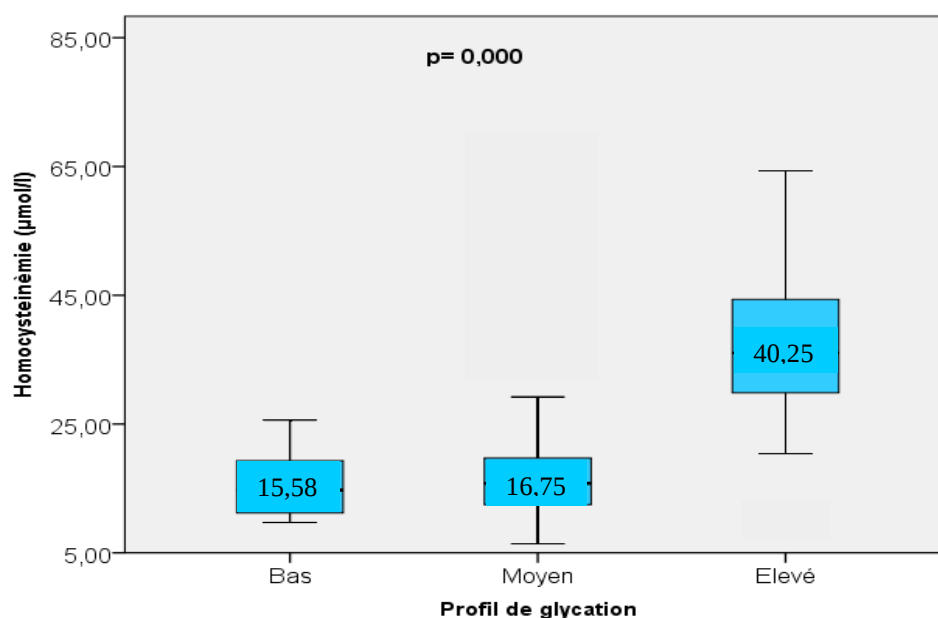


Figure 37: Comparaison des moyennes de l’homocystéinémie selon le profil de glycation

L’analyse comparative de la moyenne de l’homocystéinémie en fonction du profil de glycation a révélé une différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 10^{-3}$)

Tableau 55 : *Analyse post hoc de comparaison l'homocystéinémie selon le profil de glycation*

Homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$) (I)	Homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$) (J)	(I-J)	p-Value
Bas	Moyen	-1,17	1,000
Elevé	Bas	24,67*	$p < 10^{-3}$ *
	Moyen	23,49*	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

L'analyse post-hoc a révélé une moyenne d'**homocystéinémie** significativement supérieure chez les glyqueurs élevés ($40,25 \mu\text{mol/l}$) comparativement aux glyqueurs moyens ($16,75 \mu\text{mol/l}$) et glyqueurs bas ($15,58 \mu\text{mol/l}$) ($p < 10^{-3}$).

b) La comparaison des variations de l'homocystéinémie selon le profil de glycation :

La comparaison des fréquences a été réalisée par le test exact de *Fisher*. Les résultats sont rapportés dans le tableau 56.

Tableau 56 : *Comparaison des variations de l'hyperhomocystéinémie selon le profil de glycation*

Homocystéinémie ($\mu\text{mol/l}$)	G- Bas	G-Moyens	G-Elevés	p-Value
< 15	50,0%	42,6%	3,8%	$p < 10^{-3}$ *
> 15	50,0%	57,4%	96,2%	

* : $p < 0,05$

L'analyse comparative de la variation de l'homocystéinémie selon le profil de glycation par le test exact de *Fisher* a révélé une fréquence d'hyperhomocystéinémie $> 15 \mu\text{mol/l}$ significativement ($p < 10^{-3}$) supérieure chez les glyqueurs élevés (96,2%) par rapport aux glyqueurs bas (50%) et moyens (57,4%).

c) L'analyse de concordance :

Pour évaluer la relation entre les trois groupes de glyqueurs et les niveaux de l'hyperhomocystéinémie, nous avons utilisé l'analyse de concordance en calculant le Tau-B de Kendall. Les résultats sont exprimés dans **le tableau 57**.

Tableau 57: *Corrélation de Kendall entre les niveaux de l'hyperhomocystéinémie et le profil de glycation*

	Les niveaux de l'hyperhomocystéinémie	
	Tau-B de Kendall	p- Value
Les trois groupes de glyqueurs	0,428	$p < 10^{-3} *$

* : $p < 0,05$

L'analyse de concordance de Kendall entre le profil de glycation et les classes de l'hyperhomocystéinémie a révélé l'existence d'une concordance modérée (Tau-B= 0,428) positive et significative ($p < 10^{-3}$)

d) L'estimation du risque :

Pour quantifier la force de l'association entre le niveau de glycation élevé et le niveau de l'homocystéinémie, nous avons calculé l'Odds Ratio (OR).

Tableau 58: *Estimation du risque de l'homocystéinémie pathologique par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :*

	Valeur	Intervalle de confiance de 95%	
		Inférieur	Supérieur
Odds Ratio	19,44	2,56	47,41

Les diabétiques avec une hyperhomocystéinémie $> 15 \mu\text{mol/l}$ présentaient 19 fois plus de risque (IC à 95% = [2,56 – 47,41]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP > 1) par rapport aux diabétiques ayant une homocystéinémie normale.

IV.7.4.6 L'acide urique et le profil de glycation:

Les trois groupes de glyqueurs ont été comparés en fonction du niveau de leur acide urique sanguin, considéré comme un marqueur de risque cardiovasculaire.

a) La comparaison des moyennes de l'uricémie selon le profil de glycation :

Elle a été effectuée à l'aide du test de Kruskal-Wallis, suivie d'une analyse post hoc avec le test de Bonferroni. Les résultats sont rapportés dans *la figure 38* et *le tableau 59* respectivement

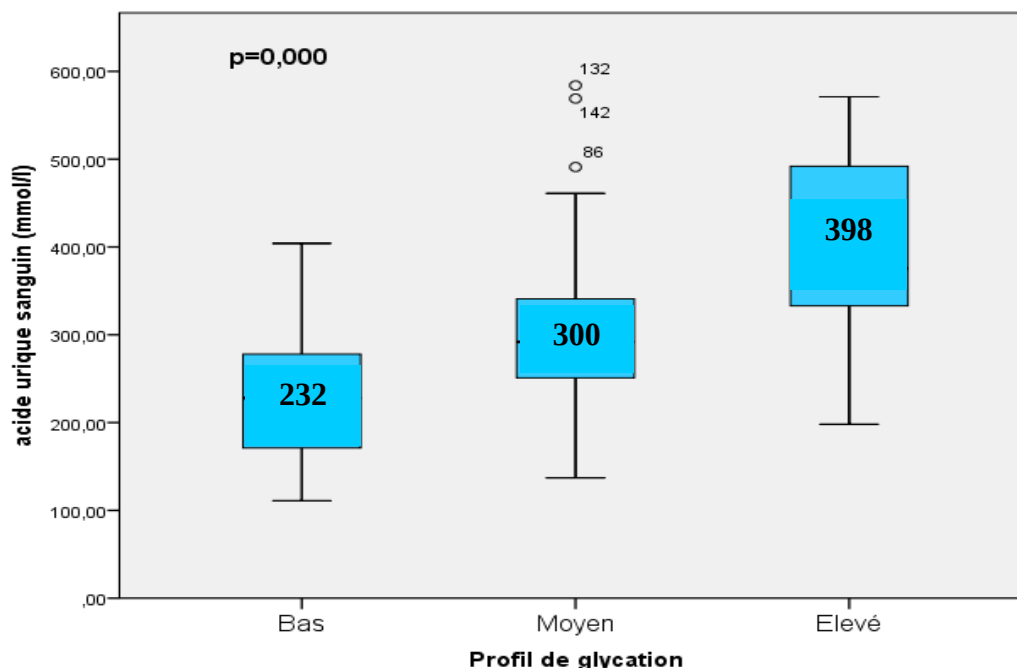


Figure 38: Comparaison des moyennes de l'acide urique sanguin selon le profil de glycation

L'analyse comparative de la moyenne de l'uricémie en fonction du profil de glycation a révélé une différence significative entre les trois groupes ($p < 0,0001$)

Tableau 59 : Analyse post hoc de comparaison de l'uricémie selon le profil de glycation

Acide urique sanguin (mmol/l) (I)	Acide urique sanguin (mmol/l) (J)	(I-J)	p-Value
Bas	Moyen	-68,00	0,001*
Elevé	Bas	166,57*	$p < 10^{-3}$ *
	Moyen	98,57*	$p < 10^{-3}$ *

* : $p < 0,05$

L'analyse post hoc a révélée une moyenne de l'uricémie significativement supérieure chez les glyqueurs élevés comparativement aux glyqueurs moyens et bas ($p < 10^{-3}$).

b) La comparaison des variations de l'uricémie selon le profil de glycation :

La comparaison des fréquences a été réalisée par le test exact de *Fisher*. Les résultats sont rapportés dans le tableau 60.

Tableau 60: Comparaison de la variation de l'hyperuricémie selon le profil de glycation

Acide urique sanguin (μmol/l)	G- Bas	G- Moyens	G-Elevés	p-Value
< 416 (H), < 340 (F)	90,9%	83,6%	34,6%	p<10 ⁻³ *
> 416 (H), > 340 (F)	9,1%	16,4%	65,4%	

* : p <0,05

L'analyse comparative de la variation de l'uricémie selon le profil de glycation par le test exact de *Fisher* a révélé une fréquence d'hyperuricémie significativement (p<10⁻³) supérieure chez les glyqueurs élevés (65,4%) que les glyqueurs bas (9,1%) et moyens (16,4%).

c) L'estimation du risque :

Pour quantifier la force de l'association entre le niveau de glycation élevé et le niveau de l'homocysténémie, nous avons calculé l'Odds Ratio (OR).

Tableau 61 : Estimation du risque de l'hyperuricémie par rapport au trou de glycation supérieur à 1 :

	Valeur	Intervalle de confiance de 95%	
		Inférieur	Supérieur
Odds Ratio	10,47	4,14	26,46

Les diabétiques avec une hyperuricémie (> 416 μmol/l (H), > 340 μmol/l (F)) présentaient 10 fois plus de risque (IC à 95% = [4,14 – 26,46]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP > à 1) par rapport aux diabétiques ayant une uricémie normale.

V. Discussion

La progression rapide et alarmante du diabète à l'échelle mondiale, et plus particulièrement en Algérie, constitue une véritable menace de santé publique. Cette situation impose la nécessité d'un contrôle glycémique strict pour retarder et prévenir l'apparition et la progression des complications microvasculaires et macrovasculaires associées au diabète. Pour atteindre cet objectif, les cliniciens se basent principalement sur deux indicateurs clés : la glycémie à jeun et l'HbA1c (105).

Cependant, il a été constaté que, pour des glycémies moyennes similaires, les taux d'HbA1c peuvent varier d'une personne à une autre. De plus, les patients ayant des niveaux d'HbA1c équivalents présentent des différences en termes de risque de complications (106).

Ce phénomène, connu sous le nom de « variation biologique de la glycation » peut être évalué par l'estimation du trou de glycation (Glycation Gap = G-Gap).

Le "Glycation Gap" est défini comme la différence entre le taux d'HbA1c mesuré et celui prédit à partir d'une autre mesure de contrôle glycémique, la fructosamine. Cette notion reflète les disparités de glycation entre les compartiments intracellulaires et extracellulaires, qui pourraient être génétiquement déterminées (107). En effet, l'enzyme principale impliquée dans la déglycation, la fructosamine-3-kinase, présente des isoformes et des polymorphismes génétiques suggérés comme facteurs influençant la variabilité biologique de la glycation de l'hémoglobine. Cette hypothèse demeure sujette à confirmation et débat dans la littérature scientifique (108). De plus, des variations individuelles de la survie des globules rouges peuvent aussi influencer significativement les résultats de l'HbA1c, indépendamment des concentrations moyennes de glucose. Tandis que les niveaux de fructosamine restent principalement déterminés par les fluctuations récentes du glucose sanguin ce qui peut contribuer à la compréhension de la notion du Glycation Gap (109).

De même, les différences interindividuelles de la concentration de glucose intracellulaire par rapport à la concentration extracellulaire sont corrélées avec le Glycation Gap et l'HbA1c, mais pas avec la fructosamine. En effet, la perméabilité de la membrane érythrocytaire au glucose est un facteur déterminant de la glycation de l'hémoglobine. Elle explique en partie les différences observées entre l'HbA1c et d'autres mesures du contrôle glycémique, comme la fructosamine (67).

Plusieurs études ont montré la relation entre le G-Gap et les complications chroniques du diabète notamment la néphropathie, la rétinopathie et le risque de mortalité cardio-vasculaire (58,90,91,104,110).

Les principales études explorant le concept de trou de glycation et ses liens avec les complications associées, telles que celles menées par Rodriguez, Nayak et Cohen, sont principalement de deux types. D'une part, des études longitudinales se concentrant sur le suivi de l'apparition des complications (22,92–94). D'autre part, des études réalisées auprès de populations majoritairement composées de patients diabétiques déjà confrontés à des complications (111).

Cette configuration comporte plusieurs implications significatives, en particulier la présence de multiples facteurs de risque susceptibles d'influencer les résultats. Les patients étudiés peuvent présenter des profils métaboliques et des réponses aux traitements distincts de ceux des patients récemment diagnostiqués ou sans complications. Cette limitation réduit la capacité de généralisation des résultats à une population plus large de patients diabétiques, ce qui peut influencer l'évaluation et l'interprétation du trou de glycation. En outre, elle peut altérer la corrélation entre le trou de glycation et divers paramètres sociodémographiques, cliniques et biologiques.

Dans le cadre de notre étude, ces considérations ont guidé le choix de notre approche méthodologique et, plus particulièrement, les critères de sélection d'une population non affectée par des complications connues au moment du recrutement, afin d'éviter des biais potentiels dans le calcul et l'interprétation du trou de glycation. En raison des contraintes associées à la réalisation d'une étude longitudinale, notamment le manque des moyens (matériels et humains), nous avons opté pour une approche alternative basée sur une étude transversale.

Les liens établis dans les études précédentes entre le trou de glycation et l'apparition de complications chroniques ont été démontrés par le suivi des patients. Nous avons souhaité explorer cette relation sous un autre angle en examinant **le lien entre le trou de glycation et des marqueurs biochimiques prédictifs de complications**. Cette approche pourrait non seulement renforcer les résultats existants, mais également appuyer les hypothèses futures, contribuant ainsi à l'amélioration de la prise en charge des patients diabétiques.

Cependant, plusieurs défis et limitations potentiels à l'adoption du Glycation Gap en pratique clinique ont été soulevés, principalement dus à l'absence de standardisation dans son calcul et son interprétation.

En raison de ces considérations et de l'absence de données spécifiques en Algérie sur la variabilité de la glycation, nous avons entrepris une étude dont l'objectif principal est d'évaluer le concept du trou de glycation chez un échantillon de patients diabétiques de type 2 non compliqués. Les objectifs secondaires visent à examiner d'une part la relation entre le trou de glycation et les marqueurs biochimiques prédictifs de complications, en particulier les la microalbuminurie et l'homocystéinémie chez ces patients. D'autre part, l'effet de la variabilité de glycation sur la micro albuminurie positive et l'hyperhomocystéinémie.

Nos résultats, issus d'une population sélectionnée selon des critères spécifiques et un schéma d'étude distinct, pourraient ne pas être directement comparables à ceux des recherches antérieures.

Les différences en termes de gravité des complications, de durée du diabète et des interventions thérapeutiques peuvent influencer de manière significative les résultats observés. Il est donc important de prendre en compte ces variations contextuelles lors de l'analyse et de la comparaison des données afin d'approfondir la compréhension de la variabilité biologique de glycation et de ses implications cliniques. La discussion sera orientée vers une analyse comparative des paramètres en fonction des données disponibles dans la littérature et des mécanismes physiopathologiques associés, tout en intégrant des informations spécifiques à la population algérienne.

V.1 Les caractéristiques sociodémographiques de la population d'étude :

Les résultats de notre étude, portant sur 170 patients diabétiques de type 2 sans complications connues au moment du recrutement, révèlent des caractéristiques sociodémographiques distinctives.

V.1.1 Le sexe :

La population étudiée comprend 65 hommes et 105 femmes, avec une prédominance féminine de 61,76%, correspondant à un ratio F/H de 1,61. Cette proportion de femmes était significativement plus élevée que celle observée dans d'autres recherches. Comparativement, l'étude de *Joung HN et al* 2020 a rapporté un ratio F/H de 1,25, indiquant une moindre prédominance féminine mais toujours un déséquilibre en faveur des femmes ce qui est en accord avec nos résultats (112). Alors que, l'étude de *Le et al.* 2024, qui a intéressée 104 participants, a rapporté un ratio parfaitement équilibré de 1:1 entre hommes et femmes (111).

De son côté, l'étude de Rodriguez-Segade (2012) a montré une majorité masculine, avec 54,3% d'hommes ce qui contraste avec nos observations (94).

Les variations observées dans les ratios de genre entre les différentes études pourraient s'expliquer, en partie, par les caractéristiques des populations spécifiquement ciblées. L'étude menée par *Joung HN et al.* ainsi que celle de *Le et al* ont été réalisées sur des diabétiques type 2 sans complications connus, coréens et vietnamiens respectivement.

En revanche, l'étude de Rodriguez-Segade (2012), qui portait sur des patients caucasiens, était une étude longitudinale s'étendant sur cinq ans. Ces différences méthodologiques et démographiques peuvent contribuer significativement aux disparités observées dans les distributions de genre entre les études.

La prédominance féminine dans notre étude pourrait s'expliquer aussi par une incidence légèrement plus élevée du DT2 chez les femmes dans notre population générale algérienne. Cette tendance est confirmée par les données de l'Organisation Mondiale de la Santé en 2016, qui a signalée en Algérie une prévalence du diabète chez les femmes de 10,7%, contre 10,2% chez les hommes.(113) De plus, l'étude STEPwise ALGERIE a mis en évidence une prévalence du diabète légèrement supérieure chez les femmes (14,9%) comparativement aux hommes (14%) (26).

Notre étude a exploré la relation entre le genre et la variabilité biologique de la glycation à différents niveaux. Les analyses ont révélé que les différences entre les moyennes de G-GAP chez les hommes et les femmes n'étaient pas statistiquement significatives ($p = 0,229$). De même, aucune variation significative n'a été observée entre les trois groupes de glyqueurs en fonction du sexe. Ces résultats suggèrent l'absence d'influence significative du genre sur les niveaux de G-GAP.

Nos résultats concordent avec ceux de l'étude menée par *Dziedzic et al.* en 2012, qui ont évalué les valeurs de G-GAP chez 93 habitants sains en Pologne. Dans cet échantillon, il n'y avait pas de différences significatives des moyennes du G-GAP entre les hommes et les femmes($p=0,78$) (114). De même, *Nayak et al. en 2011*, dans une cohorte de 2263 diabétiques suivis pendant 10 ± 8 mois, dont 81 % étaient des DT2, ont démontré que le sexe n'avait pas d'impact significatif sur le G-GAP ($p > 0,05$) (91).

En revanche, une étude ultérieure de **Nayak et al. en 2013**, portant sur une cohorte de 3 182 sujets diabétiques suivis sur 4 ans, a révélé des différences significatives entre les trois groupes de glyqueurs en fonction du sexe ($p < 0,001$). Parmi les glyqueurs élevés, la proportion de femmes était significativement plus élevée (53 %) par rapport aux hommes (47 %) (92). De plus, l'étude de **Zafon et al. 2013**, portant sur 508 patients atteints de DT2 en Espagne, a identifié une différence significative entre les sexes concernant la moyenne de G-GAP ($p = 0,004$) (106).

Notre étude et d'autres recherches similaires suggèrent que le genre n'influence pas de manière significative les niveaux de G-GAP dans les populations de diabétiques non compliquées. Les études ayant trouvé des différences significatives concernaient des cohortes avec des complications diabétiques, ce qui peut expliquer les résultats divergents.

Pour confirmer le lien entre le genre et le glycation gap (G-GAP), il est essentiel de mener des études supplémentaires avec des échantillons équilibrés en termes de sexe, en effectuant des analyses multivariées pour contrôler les variables confondantes potentielles.

V.1.2 L'âge

La moyenne d'âge de notre population d'étude était de $60,03 \pm 9,04$ ans. Les femmes avaient une moyenne d'âge de $59,10 \pm 8,81$ ans, tandis que les hommes avaient une moyenne d'âge de $61,54 \pm 9,27$ ans. De manière similaire, l'étude de Rodriguez-Segade (2012) a rapporté une moyenne d'âge de 61 ± 13 ans, comparable à celle de notre étude (94).

En revanche, l'étude de **Joung HN et al 2020** a été réalisée chez une population plus jeune, avec une moyenne d'âge de $56,9 \pm 9,4$ ans (112). Cependant, dans l'étude de **Le et al 2024** la moyenne d'âge était plus élevée de $66,30 \pm 13,60$ ans, avec des femmes légèrement plus âgées ($68,20 \pm 12,00$ ans) que les hommes ($64,30 \pm 14,80$ ans) (111).

La répartition par tranches d'âge dans notre étude a montré une prédominance des patients âgés de plus de 60 ans, soit 47,6 % de l'ensemble de la population étudiée. Ces résultats suggèrent que le risque de DT2 augmente avec l'âge. Ce phénomène était souvent associé à l'apparition ou à l'aggravation de divers troubles liés au vieillissement, favorisant une résistance accrue à l'insuline et une altération de la fonction des cellules bêta, conduisant à une production insuffisante d'insuline (115).

En ce qui concerne la relation entre l'âge et le trou de glycation, notre étude a montré l'absence de corrélation avec le G-GAP, comme l'a démontré l'analyse de corrélation de Pearson ($r = -0,182$, $p = 0,018$). De plus, le test t de Student n'a révélé aucune différence significative ($p = 0,117$) entre les moyennes du G-GAP chez les patients diabétiques de moins de 60 ans et ceux de plus de 60 ans. Aucune variation significative liée à l'âge n'a été également observée entre les trois groupes de glyqueurs.

Comparativement, l'étude de **Cosson et al.** en 2013, menée sur une cohorte de 925 diabétiques de type 2 en France avec un âge moyen de $57,8 \pm 9,3$ ans, n'a trouvé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p = 0,08$) (93). L'étude rétrospective de **Dunmore et al** en 2017 n'a pas également retrouvé d'impact significatif de l'âge sur les différences observées entre les groupes de glyqueurs; les sujets du groupe G-Gap positif étaient plus âgés en moyenne ($64,4 \pm 9,3$ ans) comparativement aux sujets du groupe G-Gap négatif ($61,3 \pm 10,4$ ans), mais cette différence n'était pas statistiquement significative ($p > 0,05$) (71).

D'autres études ont rapporté au contraire un lien entre l'âge et le trou de glycation, notamment celle de **Dziedzic et al** en 2012 qui a montré chez les sujets sains âgés de 18 à 79 ans une corrélation positive modérée et significative ($r = 0,34$, $p = 0,0006$) (114). Egalement, les travaux de **Nayak et al** en 2013, sur une cohorte de quatre ans, ont identifié une différence significative entre les groupes de glyqueurs : les glyqueurs élevés présentaient une moyenne d'âge significativement supérieure à celle des glyqueurs bas (64 ans contre 61 ans) (92).

La différence observée dans les différentes études évaluant l'association entre l'âge et le trou de glycation peut être expliquée par les caractéristiques des populations étudiées et les méthodologies de recherche utilisées qui ne sont totalement identiques.

Dans notre étude et celle de **Cosson et al** 2013, la moyenne d'âge des participants était relativement élevée, avec une concentration majeure des individus âgés de plus de 50 ans. Cette homogénéité d'âge limite la capacité à détecter une corrélation entre l'âge et le trou de glycation, car les variations d'âge sont moins prononcées.

En revanche, les études qui ont trouvé une corrélation significative, comme celle de **Dziedzic et al** 2012, ont inclus un éventail d'âge beaucoup plus large, allant de 18 à 79 ans.

Cette diversité d'âge permet de mieux observer et apprécier la relation entre l'âge et le trou de glycation. De même, l'étude de **Nayak et al** 2013 avec une cohorte de suivie sur quatre ans et comprenant majoritairement des patients atteints de DT2 avec des complications potentielles, a pu mettre l'accent sur l'association positive entre l'âge et le trou de glycation.

Devant cette disparité des résultats, il est nécessaire de mener des études visant à évaluer spécifiquement la relation entre le trou de glycation et l'âge. Ces études devraient inclure des cohortes diversifiées avec une large plage d'âge et utiliser des méthodes robustes pour mesurer les niveaux de glycation intracellulaire. De telles recherches permettraient de mettre la lumière sur la relation entre le trou de glycation et l'âge, ainsi que l'effet de ce dernier sur la variabilité biologique de glycation.

V.1.3 L'activité physique :

Un mode de vie sédentaire est un facteur de risque pour le DT2. Des études ont montré une réduction significative du risque de DT2 chez les personnes pratiquant une activité physique régulière (27). Elle améliore l'absorption du glucose de 40% par les muscles squelettiques via des voies indépendantes de l'insuline et maintient les niveaux de glucose sanguin par la régulation hormonale, même en présence du diabète.

En plus d'améliorer la sensibilité à l'insuline, l'activité physique peut améliorer également la fonction des cellules β , la fonction vasculaire et le microbiote intestinal, contribuant à une meilleure gestion du diabète et à une réduction des risques de complications diabétiques (116).

Chez les patients atteints de DT2, une activité physique régulière réduit de 25 à 30 % le risque de complications microvasculaires. Elle diminue également le risque de maladies cardiovasculaires et de mortalité associée indépendamment des autres facteurs de risque, avec une relation dose-réponse (117).

Dans notre étude, environ 25,88% des participants ont déclaré mener un mode de vie sédentaire, tandis que 48,82% et 6,47% pratiquaient respectivement la marche pendant au moins 30 minutes par jour et une activité sportive régulière à raison de 2 à 3 fois par semaine.

L'impact de l'activité physique sur les niveaux du trou de glycation dans notre population d'étude a été examiné par différents moyens.

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon l'activité physique a révélé une moyenne du G-GAP plus basse chez les diabétiques pratiquants une activité sportive régulière (2 à 3 fois par semaine) ($-0,39 \pm 0,76$) par rapport à celle des sédentaires, et celle des sujets menant une activité de la vie quotidienne ($0,16 \pm 1,07$ et $0,10 \pm 1,16$ respectivement). Cette différence était non significative ($p = 0,327$). De plus, les trois groupes de glyqueurs étaient identiques en termes d'activité physique, sans différence significative.

Aucune étude n'a encore exploré la relation entre l'activité physique et le concept de trou de glycation (G-Gap). Cette insuffisance peut s'expliquer par la nature subjective de l'évaluation de l'exercice physique. Les informations étant généralement fournies par les patients eux-mêmes via des questionnaires. De plus, l'observance et la régularité dans la pratique de l'activité physique posent souvent des problèmes.

Pour établir un lien objectif entre l'activité physique et le trou de glycation, il est indispensable de suivre précisément l'exercice physique des participants. Une étude rigoureuse nécessite l'utilisation d'outils de mesure objective et continue de l'activité physique, afin de recueillir des données précises sur la fréquence, la durée et l'intensité des exercices pratiqués par les sujets.

Seule une telle démarche permettrait de déterminer de manière fiable si l'activité physique influence le G-Gap. Elle permettra d'obtenir des données réelles et de mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'activité physique affecterait ou non la glycation intracellulaire et, par conséquent, le G-Gap.

V.2 Les caractéristiques anthropométriques et profil de glycation :

L'obésité est l'un des facteurs de risque les plus importants des MCV chez les sujets diabétiques (118). Elle est définie par un indice de masse corporelle (IMC) de 30 kg/m^2 ou plus. Outre la gravité de l'excès de poids, la répartition de la masse grasse, en particulier l'accumulation de graisse intra-abdominale, joue un rôle crucial. Un tour de taille élevé est un facteur de risque important pour les MCV.

Les pathologies telles que l'angine de poitrine, l'infarctus du myocarde, l'insuffisance cardiaque et l'accident vasculaire cérébral sont nettement plus fréquentes chez les individus obèses par rapport à ceux ayant un poids normal. De plus, les diabétiques obèses ont un risque 2 à 4 fois plus élevé de présenter des complications vasculaires par rapport aux diabétiques non obèses (119).

V.2.1 L'indice de masse corporelle :

L'IMC moyen de notre population d'étude était de 29,50 Kg/m², avec des valeurs allant de 19,42 à 39,06 Kg/m². L'obésité modérée a été observée chez près de la moitié des participants à l'étude soit 47,65%. Nos résultats concordent avec ceux de **Cosson et al** en 2013 qui ont rapporté un IMC de 30,9± 6,2 Kg/m² (93). Contrairement aux travaux de **Le et al** où l'IMC était plus bas de 24,00 ± 4,10 Kg/m² (111).

L'étude de la relation entre le trou de glycation et le statut pondéral de notre population d'étude a révélé **une faible corrélation positive et non significative** entre l'indice de masse corporelle et le G-GAP, ($r = 0,102$, $p = 0,189$).

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon l'IMC par le test *Kruskal-Wallis* a révélé un trou de glycation plus bas chez les diabétiques ayant un IMC normal ($-0,20 \pm 0,80$) par rapport aux diabétiques en surpoids ou modérément obèses ($0,15 \pm 1,23$ et $0,12 \pm 1,11$ respectivement), cette différence n'était pas significative ($p = 0,338$). De même, aucune différence significative ($p = 0,186$) n'a été observée entre les trois groupes de glyqueurs et la moyenne de leurs IMC respectifs.

En revanche, d'autres études comme celle de **Nayak et al** (2013) ont rapporté une différence significative ($p < 0,001$) des moyennes d'IMC entre les trois groupes de glyqueurs. En effet, l'IMC moyen des glyqueurs élevés était plus élevé $34,4 \pm 7,4$ Kg/m², versus $28,8 \pm 5,6$ et $31,8 \pm 6,1$ Kg/m² chez les glyquers bas et moyens respectivement. (92)

Dans l'étude **Kim et al 2016** une association positive significative a été retrouvée entre l'IMC et le trou de glycation ($p < 0,05$). (120) Dans l'étude de **Cosson et al** en 2012 l'IMC était significativement ($p = 0,03$) supérieur chez les glyqueurs élevés (32 ± 8 kg/m²) que chez les glyqueurs bas et moyen (28 ± 7 kg/m² et 30 ± 6 kg/m² respectivement) (121)

La discordance entre nos résultats et ceux des études antérieures peut être attribuée à plusieurs facteurs. Premièrement, la présence de complications diabétiques constitue un facteur de confusion, comme le souligne **Nayak et al. (2013)**. De plus, la mesure du trou de glycation dans notre étude est basée sur le dosage de la fructosamine, alors que l'étude de Kim, menée chez une population coréenne, a utilisé l'albumine glyquée.

L'étude de **Cosson et al (2012)** était une étude cas-témoins dont la classification des diabétiques en groupes glyqueurs était différente.

Les glyqueurs élevés et bas correspondaient respectivement aux 5 % des valeurs les plus élevées du G-GAP et aux 5 % des valeurs les plus basses. Cependant, les 90 % restants des valeurs du G-GAP correspondaient aux glyqueurs moyens.

V.2.2 Le tour de taille :

Le tour de taille définit l'obésité abdominale, centrale ou androïde, c'est le marqueur le plus visible du dépôt de graisse viscérale et périvasculaire.

La moyenne du tour de taille dans notre population d'étude était de $97,87 \pm 10,85$ cm, avec un minimum de 78 cm et un maximum de 135 cm. L'obésité androïde a été constatée chez 61,18% de notre échantillon.

L'analyse des résultats concernant le tour de taille de nos patients diabétiques a montré une corrélation positive modérée et statistiquement significative avec le G-GAP ($r = 0,401$, $p < 10^{-3}$). Toutefois, une différence significative a été observée pour le tour de taille entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 10^{-3}$). Le tour de taille était significativement supérieur de 14,10 cm chez les glyqueurs élevés comparativement aux glyqueurs bas ($p < 10^{-3}$) et de 9,98 cm par rapport aux glyqueurs moyens ($p < 10^{-3}$).

Aucune des études antérieures évaluant le trou de glycation chez les sujets diabétiques n'a pris en compte le tour de taille comme marqueur d'obésité, se limitant uniquement à l'IMC. Notre étude a mis en évidence une association spécifique entre le tour de taille et les niveaux de glycation intracellulaire. Cependant, les études précédentes ont rapporté une association positive entre l'IMC et le trou de glycation. Ces observations suggèrent l'existence d'un lien général entre le trou de glycation et l'obésité.

Une étude récente a mis en évidence une augmentation du ratio de concentration plasmatique de la leptine pro-inflammatoire, par rapport à l'adiponectine anti-inflammatoire (ratio L/A), chez les patients diabétiques présentant un G-Gap positif comparativement à ceux ayant un G-Gap négatif (122). Par ailleurs, une autre étude a révélé que l'association entre la fructosamine et l'HbA1c est significativement réduite chez les patients atteints de DT2 présentant une obésité marquée, l'augmentation de la masse grasseuse étant identifiée comme le principal facteur de cette réduction, ce qui contribue à l'augmentation du G-Gap (123).

Il a été démontré in vitro que le taux de formation de fructosamine est plus lent chez les individus obèses que chez les individus minces. Cependant, le mécanisme par lequel l'augmentation de la masse grasseuse réduit la glycation des protéines extracellulaires et la formation de fructosamine reste incertain. Une hypothèse plausible est que l'excès d'acides gras, induit par la masse grasseuse accrue, pourrait se lier à certains groupes amines de l'albumine, réduisant ainsi sa glycation. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider ce mécanisme (123).

Il demeure essentiel de confirmer cette relation à travers des recherches plus approfondies qui aborderont l'obésité sous divers angles et à l'aide de multiples paramètres.

V.3 Les caractéristiques cliniques :

V.3.1.1 L'ancienneté du diabète :

La durée du diabète est un facteur clé dans l'augmentation du risque de MCV chez les patients diabétiques, avec une hausse d'environ 20 % du risque pour chaque tranche de 5 ans (124).

Les patients atteints de DT2 à début précoce sont particulièrement à risque, en raison de la durée prolongée de leur diabète et de la détérioration continue de leurs profils métaboliques (125). Cette progression du diabète entraîne des lésions athéroscléreuses, contribuant au développement de maladies cardiovasculaires et à la mortalité (126).

L'ancienneté moyenne du diabète au sein de la population d'étude était de 7,89 ans $\pm$ 5,25 ans, avec des extrêmes allant d'une année à 25 ans. La majorité des sujets étudiés, soit 75,3%, étaient diabétiques depuis moins de 10 ans, répartis comme suit : 40% avaient une ancienneté du diabète comprise entre 1 et 5 ans, et 35,3% entre 6 et 10 ans.

La confrontation de cette caractéristique avec la notion du trou de glycation a révélé une faible corrélation positive ($r = 0,140$) et non significative ($p = 0,069$) entre le G-GAP et l'ancienneté du diabète en années.

Cependant, l'analyse comparative de la moyenne du G-GAP en fonction des caractéristiques cliniques, effectuée à l'aide du test t de Student, a révélé une différence significative selon que l'ancienneté du diabète soit inférieure ou supérieure à 7 ans ($p = 0,046$).

En effet, le trou de glycation (G-GAP) était plus élevé chez les diabétiques ayant une ancienneté supérieure à 7 ans.

L'analyse comparative de l'ancienneté du diabète selon le profil de glycation, réalisée avec le test de Kruskal-Wallis, a montré que la durée du diabète était supérieure chez les glyqueurs élevés (9 ans) par rapport aux glyqueurs bas et moyens (7 et 6 ans respectivement). Cette différence n'était cependant pas significative ($p = 0,178$).

Nos résultats sont en accord avec ceux de **Cosson et al.** (2013), qui ont rapporté une ancienneté moyenne du diabète de 11 ± 8 ans **(93)**. Cela montre une tendance similaire dans la durée de la maladie chez les patients diabétiques, bien que notre population présente une ancienneté légèrement inférieure. **Nayak et al.** (2011), dans leur étude visant à évaluer la consistance du G-GAP chez les diabétiques de type 1 et de type 2, ont trouvé une ancienneté moyenne du diabète plus élevée, de $15,8 \pm 9,9$ ans **(91)**. Cette différence pourrait être attribuée à des variations dans les populations étudiées et les critères de sélection.

À l'inverse, **Rodriguez et al.** (2011) ont rapporté une ancienneté moyenne du diabète de $6 \pm 5,6$ ans, inférieure à nos résultats **(22)**.

Nos résultats démontrent un lien modeste entre le trou de glycation et l'ancienneté du diabète. Avec une plus longue durée du diabète, les patients peuvent accumuler davantage de produits de glycation avancée. Les glyqueurs élevés, ayant une durée de diabète plus longue, pourraient refléter cette accumulation, ce qui pourrait expliquer pourquoi ils montrent un profil de glycation plus élevé. Cependant, ce lien n'était pas suffisamment fort pour être statistiquement significatif.

Comparativement, **Nayak et al.** (2011) n'ont pas observé de corrélation significative entre le G-GAP et l'ancienneté du diabète **(91)**. En revanche, **Zafon et al.** (2013) ont rapporté l'existence d'une corrélation positive et significative ($p < 0,001$) **(106)**. Par contre, **Cosson et al.** (2013) n'ont trouvé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs en fonction de la durée de leur diabète **(93)**. Toutefois, **Nayak et al.** (2013) ont observé une durée de diabète significativement plus courte (16 ± 8 ans) chez les glyqueurs élevés contrairement aux deux autres groupes de glyqueurs. ($p < 0,001$) **(92)**.

Les différences observées entre les études antérieures et la notre soulignent l'importance de considérer les caractéristiques spécifiques des populations étudiées, les schémas d'étude utilisées.

Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de consensus clair et que des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre la relation entre le G-GAP et la durée du diabète.

V.3.2 Le traitement anti diabétique en cours :

Ces dernières années, la prise en charge médicamenteuse des patients atteints de DT2 a considérablement évolué, notamment grâce aux traitements ciblant l'hyperglycémie. Ces médicaments jouent un rôle décisif dans la gestion et la prévention des complications cardiovasculaires et rénales (127).

Une grande proportion de notre population d'étude, soit 85,29%, était sous antidiabétiques oraux dont 52,62% sous monothérapie orale (la metformine principalement), 6,20% sous une bithérapie orale et 26,47% sous tri thérapie orale. Les autres traitements, incluant l'insulinothérapie rapide et les combinaisons de thérapies orales avec l'insuline basale étaient moins fréquents.

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP selon le type de traitement par *le test Kruskal-Wallis* a révélé une différence significative ($p=0,004$) entre les diabétiques traités par les ADO, ceux traités par combinaison ADO –insuline et ceux sous insuline.

En effet, le trou de glycation était significativement ($p=0,039$) plus bas chez les diabétique sous Metformine ($-0,01\pm1,07$) que sous insuline ($0,98\pm0,91$).

Comparativement, la fréquence d'utilisation de l'insuline était significativement plus élevée ($p<0,001$) chez les glyqueurs élevés (76%) par rapport aux glyqueurs moyens (68%) pour *Nayak et al.* (2013) (92).

De même, dans une étude réalisée par *Kim et al.* (2017), sur 105 patients diabétiques de type 2 (128) la fréquence d'utilisation d'insuline était significativement élevée chez les glyqueurs élevés ($p < 0,05$).

Au contraire, *Dumnore et al.* (2017) ont révélé l'absence de différence significative entre les groupes de glyqueurs bas et élevés en fonction du traitement antidiabétique utilisé ($p > 0,05$). (71)

Nos résultats ainsi que ceux d'autres études suggèrent une relation possible entre l'utilisation de l'insuline et le G-GAP. Cette relation potentielle pourrait indiquer que les patients nécessitant de l'insuline présentent des profils de glycation distincts, peut-être en raison de facteurs tels que la durée et la sévérité du diabète, ou des variations individuelles dans le métabolisme du glucose et la réponse au traitement.

Des études supplémentaires, utilisant des méthodes et outils d'investigation plus performants, sont peut-être nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à cette interaction et déterminer si le G-GAP pourrait être utilisé comme indicateur clinique afin d'ajuster les stratégies thérapeutiques, en particulier l'initiation de l'insulinothérapie.

V.3.3 Les antécédents familiaux du diabète :

Les antécédents familiaux de DT2 sont indépendamment associés à un risque accru de complications chroniques, notamment la dysfonction diastolique, la rétinopathie et la neuropathie périphérique.(129)

Près de la moitié de la population de notre étude soit 42,94%, avait des antécédents familiaux de diabète type 2 du 1^{er} degré, versus un quart des patients (25,29%) sans aucun antécédent familial.

L'analyse comparative de la moyenne du G-GAP en fonction des antécédents familiaux du diabète type 2 par la test *t de Student* a révélé une moyenne de G-GAP plus élevée chez les diabétiques ayant des antécédents familiaux de DT2 ($0,18 \pm 1,14$) par rapport à ceux sans antécédents ($-0,20 \pm 1,00$). Cependant cette différence n'était pas statistiquement significative ($p=0,052$). De plus, l'analyse comparative de la fréquence des antécédents familiaux du diabète type 2 en fonction du profil de glycation a révélé l'absence de différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,755$).

Notre étude suggère un lien faible et non significatif entre la présence d'antécédents familiaux de DT2 et le G-GAP. Cette observation pourrait être attribuée à l'hétérogénéité de la distribution des sujets dans notre population d'étude, marquée par un déséquilibre de l'effectif, avec seulement 25 % des participants sans antécédents familiaux. Ce déséquilibre a probablement limité notre capacité à observer un lien clair et significatif.

Il est important de noter qu'aucune étude antérieure n'a évalué le lien entre le G-GAP et les antécédents familiaux de DT2. Cependant, ce lien mérite d'être exploré davantage, car les hypothèses actuelles suggèrent que le G-GAP est en grande partie génétiquement prédéterminé et hérité (130). Si ce lien est confirmé, il pourrait fournir des informations précieuses sur la susceptibilité génétique au diabète et ses complications.

Des études supplémentaires sont nécessaires pour analyser l'impact des antécédents familiaux de DT2 sur le trou de glycation et le profil de glycation. Ces recherches devraient inclure des échantillons plus équilibrés en termes de sexe, âge, et diversité ethnique, afin de mieux comprendre les variations génétiques influençant le G-GAP. Par ailleurs, des études longitudinales pourraient clarifier si les antécédents familiaux affectent la progression du diabète et de ses complications via le G-GAP.

V.4 La corrélation entre l'HbA1c et la fructosamine :

La moyenne de l'HbA1c de notre population d'étude était $7,22 \% \pm 1,54 \%$ et celle de la fructosamine était $272,85 \pm 79,15 \mu\text{mol/L}$. Un équilibre glycémique optimal avec une HbA1c inférieur à 7% et un taux de fructosamine inférieur à $285 \mu\text{mol/L}$ ont été retrouvés respectivement chez $55,03\%$ et $94,71\%$ de nos diabétiques.

Nos résultats montrent ainsi un diabète bien équilibré chez une bonne proportion des participants à l'étude, en rapport principalement avec les critères de sélection stricts utilisés et ayant privilégié le choix de patients ne présentant aucune complication.

Nous avons observé chez nos patients une forte corrélation positive et statistiquement significative entre l'HbA1c et la fructosamine ($r = 0,684$, $p < 0,001$). Ce résultat concorde avec les travaux de **Cohen et al. (2006)**, qui ont également trouvé une forte corrélation positive et significative ($r = 0,78$, $p < 0,05$) entre ces deux marqueurs (131), ainsi qu'avec ceux de **Cosson et al. (2013)**, qui ont rapporté une corrélation similaire ($r = 0,731$, $p < 0,001$) (93). Cependant, l'étude de **Le et al. (2024)** a rapporté une corrélation moins marquée, mais néanmoins positive et statistiquement significative ($r = 0,4883$, $p < 0,001$) (111), suggérant une relation plus modérée entre l'HbA1c et la fructosamine.

En ce qui concerne notre analyse de régression linéaire, elle a montré que $46,8 \%$ des variations de l'HbA1c pouvaient être expliquées par les valeurs de la fructosamine, avec un coefficient de détermination (R^2) de $0,468$. L'équation obtenue pour cette régression était : $\text{HbA1c prédicté} = 0,013 \times \text{fructosamine} + 3,58$. Ce résultat est en accord avec celui de **Zafon et al. (2013)**, qui ont obtenu une équation similaire : $\text{HbA1c} = 0,0175 \times \text{fructosamine} + 2,40$ ($R^2 = 0,49$, $p < 0,001$) (106). De même, **Rodríguez-Segade et al. (2011)** ont proposé une équation de régression comparable : $\text{HbA1c} = 0,012 \times \text{fructosamine} + 3,16$ ($R^2 = 0,46$) (22).

Leur étude ultérieure en 2012 a révélé une autre équation : $HbA1c = 0,01 \times \text{fructosamine} + 4,25$ ($R^2 = 0,57$), confirmant la robustesse de cette relation (94).

Les travaux de *Cohen et al. (2006)* et *Cosson et al. (2013)* ont également produit des équations de régression solides. *Cohen et al.* ont obtenu : $HbA1c = 0,017 \times \text{fructosamine} + 1,61$ ($R^2 = 0,60$) (131), tandis que *Cosson et al.* ont trouvé : $HbA1c = 0,020 \times \text{fructosamine} + 2,05$ ($R^2 = 0,53$) (93), tous deux soutenant l'idée d'une forte association entre ces deux paramètres biologiques.

Ainsi, la plage de variation du R^2 entre notre étude et les études sus-mentionnées s'étend de 0,46 à 0,60. Cette variation indique que, bien que les études montrent des résultats légèrement différents en termes de proportion de variance de l'HbA1c expliquée par la fructosamine, elles confirment toutes une relation significative et robuste entre ces deux mesures de contrôle glycémique.

Cependant, une variation considérable dans le degré de corrélation entre HbA1c et la fructosamine a été notée dans les études antérieures. Cette disparité pourrait être attribuée à la période plus courte sur laquelle la fructosamine reflète le contrôle glycémique, ainsi qu'à divers facteurs influençant l'HbA1c, notamment la durée de vie des globules rouges.

De plus, des processus dépendants de l'enzyme fructosamine-3-kinase, et possiblement d'autres enzymes, favorisent la déglycation. L'équilibre entre la glycation et la déglycation peut varier entre les individus en fonction de l'activité de ces voies. Ainsi, il peut y avoir des individus avec des taux de déglycation plus élevés ou plus bas, entraînant une HbA1c plus élevée ou plus basse que prévu par rapport à l'environnement glycémique. La variabilité de l'hémoglobine glyquée, non liée à la glycémie, a été observée depuis un certain temps. Des études sur des jumeaux diabétiques et non diabétiques ont suggéré un fondement génétique possible. En contraste, la glycation des protéines mesurée par la fructosamine, n'est pas intracellulaire et ne serait donc pas influencée par ces voies, ce qui confère à la mesure de la fructosamine sérique un rôle potentiel dans la différenciation entre les glyqueurs rapides et lents, permettant une meilleure compréhension de l'HbA1c (90).

Ces constatations remettent en question le rôle de l'HbA1c comme « standard de référence » pour évaluer le contrôle glycémique. Elles soulignent l'importance de la fructosamine comme l'HbA1c.

V.5 Le trou de glycation :

La variation interindividuelle des niveaux de HbA1c pour les mêmes moyennes glycémiques peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la race et l'âge. Cependant, certains chercheurs suggèrent que cette variation pourrait également résulter de différences dans le taux de glycation entre les individus. Le "trou de glycation", défini comme la différence entre la concentration d'HbA1c et celle prédite par la fructosamine, a également été proposé pour expliquer cette variation. De plus, il a été suggéré que cet écart pourrait prédire la progression des complications diabétiques, notamment la néphropathie (132).

Dans notre étude, la moyenne du trou de glycation (glycation gap, G-GAP) était de $0,08 \pm 1,12$ % avec des extrêmes allant de -3,30 % à 4,94 %. La distribution de la population d'étude selon le profil de glycation a révélé que 71,76% de sujets appartenaient aux groupes des glyqueurs moyens contre 12,94% des glyqueurs bas et 15,29% des glyqueurs élevés.

Macdonald et al. (2008), *Nayak et al.* (2011, 2013) ainsi que *Rodríguez-Segade* (2011) ont tous utilisé la même méthode de distribution des patients en glyqueurs bas, moyens et élevés, en se basant sur des valeurs de gap respectivement de <-1 , $[-1, +1]$ et $> +1$. Ils ont rapporté des groupes de tailles différentes (22, 91, 92, 104). Cependant, dans l'étude de *Cosson et al* 2013, les patients ont été séparés par tertiles de G-GAP. Le but de cette distribution était de créer des groupes de tailles homogènes afin de minimiser les biais liés à la prédominance des effectifs dans un groupe par rapport à un autre (93).

Le choix de la catégorisation basée sur une différence de 1% se justifie par le fait qu'une diminution de l'HbA1c de 1 à 2 % a montré une réduction des complications microvasculaires de 40 à 70 % (133). Cette méthode permet d'établir des groupes cliniquement significatifs et d'évaluer plus précisément l'impact du G-GAP sur le contrôle glycémique et les complications associées.

V.6 Les caractéristiques biochimiques :

V.6.1 La glycémie :

Dans notre population d'étude, la moyenne de glycémie à jeun était de $8,81 \pm 3,67$ mmol/l, avec des extrêmes allant de 3,71 mmol/l à 28,62 mmol/l. L'analyse de corrélation de Pearson a révélé une corrélation positive modérée et significative entre le G-GAP et la glycémie à jeun ($r = 0,431$, $p < 0,001$).

Cosson et al (2013) ont rapporté une glycémie moyenne comparable à celle de notre étude, soit $8,1 \pm 3,2$ mmol/l (93). Au contraire les travaux de **Joung H et al. (2020)** ont révélé une glycémie moyenne supérieure à celle de notre population ($9,47 \pm 2,04$ mmol/l). Dans cette même étude, la corrélation entre le G-GAP et la glycémie à jeun était positive, forte et significative ($r = 0,692$, $p < 0,001$). En revanche, le calcul du trou de glycation était basé sur l'HbA1c et l'albumine glyquée et non la fructosamine. (112)

Les autres études antérieures n'ont pas évalué la relation entre le G-GAP et la glycémie à jeun ou postprandiale. Cela s'explique par le fait que la glycémie est une mesure momentanée, alors que le G-GAP est une différence entre deux paramètres résultant de l'exposition à une glycémie sur des périodes déterminées, représentant ainsi une glycémie cumulative. Cette même notion justifie la corrélation non parfaite entre le G-GAP et la glycémie.

De plus, le G-GAP reflète une glycémie intracellulaire, tandis que le dosage de la glycémie, qu'il soit à jeun ou postprandial, est une mesure plasmatique extracellulaire.

La relation entre le trou de glycation et la glycémie est évidente et logique, étant donné que le G-GAP est le résultat de l'exposition à cette glycémie. Cependant, cette relation est influencée par les différences entre le compartiment extra et intracellulaire, ainsi que par la perméabilité membranaire du glucose à travers les érythrocytes.

V.6.2 L'HbA1c et la fructosamine :

Notre étude a révélé plusieurs points importants concernant la relation entre le G-GAP, l'HbA1c et la fructosamine, ainsi que les profils de glycation parmi les groupes de patients catégorisés selon leur G-GAP.

En effet, l'analyse de corrélation de Pearson entre le G-GAP et les paramètres biochimiques de l'équilibre glycémique a révélé une forte corrélation positive avec l'HbA1c ($r = 0,744$, $p < 0,001$) sans aucune corrélation significative observée avec la fructosamine ($r=0,021$, $p=0,789$)

Rodriguez-Segade et al (2011) ont également observé une corrélation positive forte et significative entre l'HbA1c et le G-GAP ($r=0,778$, $p<0,05$). Toutefois, aucune corrélation n'a été identifiée entre le G-GAP et la fructosamine ($r=0,005$) dans la même étude. (22)

Nayak et al. (2011) ont en revanche rapporté une corrélation significative mais modérée entre l'HbA1c et le G-GAP ($r=0,32$, $p<0,001$) (91). **Le et al. (2024)** ont aussi trouvé une corrélation modérée entre le G-GAP et l'HbA1c ($r=0,318$, $p=0,010$) (111).

Bien que la force de la corrélation soit moins élevée dans ces études comparativement à la nôtre, elles suggèrent néanmoins une association significative.

De plus, l'analyse de nos résultats a révélé que l'HbA1c était significativement supérieure chez les glyqueurs élevés (9,75%) comparativement aux glyqueurs moyens (6,48%) et bas (6,38%) ($p < 10^{-3}$). En revanche, la fructosamine était significativement ($p < 10^{-3}$) plus élevée chez les glyqueurs bas (331 $\mu\text{mol/l}$) par rapport aux glyqueurs moyens (254 $\mu\text{mol/l}$). De plus, la moyenne de fructosamine était significativement supérieure chez les glyqueurs élevés par rapport à celle des glyqueurs moyens ($p=0,001$) avec une différence moyenne de 56,78 $\mu\text{mol/l}$.

En parallèle, L'analyse comparative du profil de glycation réalisée par le test exact de Fisher, a révélé une fréquence nettement supérieure ($p < 10^{-3}$) d'HbA1c $> 7\%$ chez les glyqueurs élevés (100%) comparativement aux glyqueurs bas (22,7%) et moyens (32%). Au contraire, une fréquence significativement ($p=0,011$) plus élevée de fructosamine $> 285 \mu\text{mol/L}$ a été observée chez les glyqueurs bas (18,2%) comparativement aux glyqueurs élevés (7,7%) et moyens (2,5%).

Nos résultats concordent avec, ceux de *Nayak et al* 2013 qui ont trouvé que l'HbA1c était significativement ($p < 0,001$) plus élevée chez les glyqueurs élevés ($9,9 \pm 2,0\%$) par rapport aux glyqueurs moyens ($8,2 \pm 1,5\%$) et bas ($7,9 \pm 1,8\%$). Contrairement à l'HbA1c, la fructosamine était significativement plus élevée chez les glyqueurs bas ($365 \pm 91 \mu\text{mol/l}$) par rapport aux glyqueurs moyens ($301 \pm 66 \mu\text{mol/l}$) et élevés ($298 \pm 75 \mu\text{mol/l}$) (92).

Cossson et al en 2013 ont rapporté des résultats similaires. Ils ont trouvé que l'HbA1c était significativement ($p < 0,0001$) supérieure chez les glyqueurs élevés ($10,1 \pm 1,8\%$) comparativement aux glyqueurs moyens ($7,9 \pm 1,4\%$) et bas ($7,0 \pm 1,4\%$). Concernant la fructosamine celle-ci était significativement ($p < 0,0001$) plus élevée chez les glyqueurs bas ($311 \pm 77 \mu\text{mol/l}$) par rapport aux glyqueurs moyens ($296 \pm 68 \mu\text{mol/l}$) (93).

Afin de mieux appréhender la relation entre l'HbA1c et le G-GAP, une analyse de corrélation de Spearman entre les classes de l'équilibre glycémique et le G-GAP ainsi qu'une analyse de concordance de Kendall entre le profil de glycation et les classes de l'HbA1c ont été réalisées. Les résultats ont indiqué qu'une variation dans le G-GAP est fortement associée à des changements correspondants dans l'équilibre glycémique des patients ($r = 0,636$, $p < 10^{-3}$).

De même, les variations dans les classes d'HbA1c tendent à correspondre de manière modérée aux variations dans les groupes de glyqueurs (Tau-B = 0,476, $p < 10^{-3}$).

Nos résultats, ainsi que ceux rapportés dans la littérature, confirment la forte association entre un G-GAP élevé et des niveaux élevés d'HbA1c. Ceci est logique, car le G-GAP reflète la différence entre l'HbA1c mesurée et l'HbA1c prédite à partir de la fructosamine. En outre, ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle le G-GAP pourrait être associé à un risque accru de complications vasculaires, étant donné l'association déjà établie entre l'HbA1c et les complications diabétiques.

De plus, l'association inverse observée entre le G-GAP et la fructosamine suggère que cette dernière pourrait ne pas être influencée par les mêmes mécanismes que ceux affectant la glycation de l'hémoglobine, notamment les variations du gradient de glucose à travers la membrane érythrocytaire (67). Cela implique que la fructosamine pourrait fournir une image plus complète du contrôle glycémique et des risques de complications, en complément des mesures de l'HbA1c.

V.6.3 L'urée et la créatinine sanguines

La moyenne de la créatinine et de l'urée sanguines de notre population d'étude étaient de $74,92 \pm 21,96 \mu\text{mol/L}$, et de $4,91 \pm 1,56 \text{ mmol/L}$ respectivement.

Concernant la relation entre le G-GAP et ces deux paramètres, les résultats ont montré l'absence de corrélation significative entre le G-GAP et la créatinine sanguine ($p=0,693$, $r=-0,031$) ainsi qu'entre le G-GAP et l'urée sanguine ($p=0,331$, $r=-0,075$). De plus, l'analyse comparative du profil de glycation en fonction des niveaux de créatinine et d'urée sanguines n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,259$ et $p=0,915$, respectivement).

Nos résultats s'accordent avec ceux de **Dunmore et al (2017)** qui, dans une étude portant sur 148 sujets diabétiques, dont 90 % étaient des diabétiques de type 2, ont indiqué que les moyennes de créatinine sanguine n'étaient pas significativement différentes entre les groupes de glyqueurs bas et élevés (71).

En revanche, *Nayak et al.* 2013 ont trouvé une différence significative dans les niveaux de créatinine sanguine entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,001$). Les glyqueurs bas ayant une moyenne significativement plus élevée ($93 \pm 30 \mu\text{mol/L}$) par rapport aux glyqueurs moyens ($92 \pm 29 \mu\text{mol/L}$) et aux glyqueurs élevés ($87 \pm 28 \mu\text{mol/L}$). (92)

Cette divergence pourrait être liée à la présence de complications telles que la néphropathie et la rétinopathie chez les patients de la cohorte étudiée par Nayak, ainsi qu'aux différences dans le modèle de calcul du G-GAP utilisé.

Il existe peu d'études évaluant la relation entre la créatinine et le G-GAP. Cependant, aucune d'entre elles n'a étudié la relation entre l'urée sanguine et le G-GA. En l'absence de résultats concluants, il est nécessaire de réaliser des recherches supplémentaires pour explorer la relation entre le G-GAP, la créatinine et l'urée en utilisant des méthodes de mesure standardisées.

V.6.3.1 Le DFGe :

Le débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) est essentiel pour évaluer la fonction rénale. Il permet la détection précoce de la maladie rénale chronique (MRC), souvent avant l'apparition des symptômes, permettant une intervention rapide pour ralentir la progression de la maladie et gérer les complications efficacement. La surveillance régulière du DFGe est particulièrement cruciale pour les patients diabétiques, car ils présentent un risque accru de développer des maladies rénales.(134)

Dans notre étude, la moyenne du DFGe calculé selon la formule MDRD simplifié (version 186) était de $79,21 \pm 25,37 \text{ ml/min/1,73 m}^2$, avec des valeurs extrêmes allant de 32,60 à $178,49 \text{ ml/min/1,73 m}^2$. Parmi les participants, 28,99% n'avaient pas d'insuffisance rénale, ($\text{DFGe} \geq 90 \text{ ml/min/1,73 m}^2$), 51,48% présentaient un DFGe diminué entre 89 et $60 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ et 13,61% une insuffisance rénale légère à modérée avec un DFGe entre 59 et $45 \text{ ml/min/1,73 m}^2$.

La confrontation du DFGe à la notion du trou de glycation a révélé l'absence de corrélation significative entre les deux paramètres ($r= 0,012$, $p= 0,873$). De plus, la moyenne du G-GAP n'était pas significativement différente ($p=0,542$) entre les diabétiques avec un $\text{DFGe} > 60 \text{ ml/min/1,73 m}$ ($0,05 \pm 1,13 \%$) et ceux ayant un $\text{DFGe} < 60 \text{ ml/min/1,73 m}$ ($0,18 \pm 1,09 \%$).

L'analyse comparative du profil de glycation en fonction du débit de filtration glomérulaire estimé (DFGe) n'a révélé aucune différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,530$).

Nous avons relevé dans les études publiées sur le même sujet des résultats différents :

-Le DFGe dans l'étude de **Nayak et al** 2013 était significativement différent entre les trois groupes de glyqueurs ($p=0,003$). Les glyqueurs élevés avaient un DFGe plus bas (79 ± 27 ml/min) que celui des glyqueurs moyens (76 ± 26 ml/min) et glyqueurs bas (80 ± 27 ml/min). Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que la cohorte de Nayak comprenait des sujets présentant des complications, notamment la néphropathie et la rétinopathie. De plus, le calcul du DFGe n'a pas été rapporté à la surface corporelle, ce qui pourrait influencer les résultats. (92)

-La corrélation entre le DFGe et le G-GAP était significativement modérée et positive ($r=0,318$, $p<0,001$) dans l'étude de **Kim et al** 2016 (120) mais au contraire négative ($r=-0,340$, $p=0,0004$) dans l'étude de **Le et al** 2024 (111). La méthode CKD-EPI cyst C utilisée pour calculer le DFGe dans ces études, pourrait expliquer les différences observées dans les résultats.

En raison de la disparité des résultats observés, il est essentiel de mener des études approfondies pour évaluer la relation entre le G-GAP et le DFGe. Il est important d'insister sur les critères de sélection de la population d'étude afin de minimiser les biais de sélection pouvant influencer l'association. Le choix de schémas d'étude plus précis, tels que les études cas-témoins, pourrait apporter des explications plus claires et objectives. De plus, le choix de la formule de calcul du DFGe doit être soigneusement considéré pour garantir la cohérence et la fiabilité des résultats.

V.6.3.2 La micro-albuminurie :

Des études cliniques ont montré que le trou de glycation (G-GAP) est un indicateur plus fiable que l'HbA1c pour évaluer les risques de mortalité et la progression de la dysfonction rénale chez les patients diabétiques type 2 en hémodialyse (91,135). De plus, le ratio albumine/créatinine (RAC) offre une valeur prédictive supérieure pour la progression des maladies rénales et présente une forte association avec le risque d'événements rénaux, ainsi que le risque futur de maladie cardiaque ischémique et d'insuffisance cardiaque (14). Pour ces raisons, nous avons choisi d'évaluer le G-GAP et sa relation avec le RAC.

Dans notre étude, la moyenne du RAC était de $1,87 \pm 2,28$ mg/mmol avec des extrêmes allant de 0,09 à 10,72 mg/mmol. La majorité de la population d'étude soit 80% présentait un RAC normal ($\text{RAC} < 3\text{mg/mmol}$) alors que 20% présentait une micro-albuminurie ($\text{RAC} = 3$ à 30 mg/mmol).

L'analyse de corrélation a identifié une corrélation positive modérée et significative entre le G-GAP et le RAC d'une part ($r = 0,472$, $p = 0,0001$) et entre le G-GAP et les catégories du RAC d'autre part ($\text{Rho} = 0,407$, $p < 10^{-3}$). Ceci indique qu'une variation dans le G-GAP est associée à des changements correspondants dans les niveaux du RAC.

De plus, une comparaison des moyennes du trou de glycation (G-GAP) effectuée par le test t de Student a révélé une moyenne de G-GAP significativement plus élevée ($p < 0,0001$) chez les diabétiques ayant un $\text{RAC} > 3\text{mg/mmol}$ ($1,19 \pm 1,42\%$) par rapport à ceux ayant un $\text{RAC} < 3\text{mg/mmol}$ ($-0,19 \pm 0,82$).

Ces résultats concordent avec ceux de **Le et al.** (2024), qui ont rapporté une corrélation positive modérée et significative entre le G-GAP et le RAC ($r = 0,3275$; $p = 0,0007$). Dans cette même étude, la moyenne du G-GAP était significativement ($p = 0,0155$) plus élevée chez les diabétiques ayant une macro-albuminurie ($\text{RAC} > 30\text{ mg/mmol}$) par rapport à ceux ayant une normo-albuminurie ($\text{RAC} < 3\text{ mg/mmol}$) (111).

Cependant, **Mishra et al.** (2020) ont révélé une corrélation positive forte et significative entre le G-GAP et le RAC ($r = 0,622$, $p < 0,001$) (136). Cette forte corrélation est influencée par la présence de complications rénales chez les sujets de l'étude, contrairement à celle de **Le et al.** (2024). De même, **Cosson et al.** (2012) dans leur cohorte ont rapporté que le G-GAP était significativement ($p < 0,01$) plus élevé chez les diabétiques ayant une macroprotéinurie ($0,56 \pm 1,60\%$) par rapport à ceux n'ayant pas de macroprotéinurie ($-0,05 \pm 1,42\%$) (121).

Afin de mieux comprendre le lien entre le G-GAP et le risque de néphropathie chez les diabétiques, d'autres investigations ont été faites. Une analyse comparative du profil de glycation de la population d'étude en fonction du RAC a montré que ce dernier était significativement différent entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 10^{-3}$). Les glyqueurs élevés avaient une moyenne de RAC significativement supérieure ($4,75\text{ mg/mmol}$) à celle des glyqueurs moyens ($1,49\text{ mg/mmol}$) et des glyqueurs bas ($0,55\text{ mg/mmol}$). De même, la fréquence des diabétiques ayant un $\text{RAC} > 3\text{ mg/mmol}$ était significativement ($p < 10^{-3}$) plus élevée chez les glyqueurs élevés (76,9%) comparativement aux glyqueurs bas (0%) et moyens (11,5%).

D'autre part, l'analyse de concordance de Kendall entre le profil de glycation et les catégories du RAC a révélé une forte concordance ($\text{Tau-B} = 0,518$), positive et significative ($p < 10^{-3}$). Cela implique que les diabétiques ayant un niveau de glycation plus élevé tendent à avoir des valeurs de RAC plus élevées, avec probablement des implications cliniques importantes pour l'évaluation des risques rénaux.

L'impact du trou de glycation sur la micro-albuminurie a été évalué par le calcul de l'odds ratio. Les diabétiques de la population d'étude ayant un RAC $> 3 \text{ mg/mmol}$ avaient 30 fois plus de risque ($\text{IC à } 95\% = [10,08 - 89,87]$) d'avoir un profil de glycation élevé ($\text{G-GAP} > 1$) par rapport aux diabétiques ayant un RAC normal.

Comparativement, **Dunmore et al.** (2017) ont également rapporté une moyenne du RAC des glyqueurs élevés ($9,7 \pm 29 \text{ mg/mmol}$) significativement supérieure ($p < 0,05$) à celle des glyqueurs bas ($4,4 \pm 18,5 \text{ mg/mmol}$) (71). De même, pour **Nayak et al.** (2013) la moyenne du RAC était significativement différente entre les trois groupes de glyqueurs ($p < 0,001$). En effet, les glyqueurs élevés avaient une moyenne de RAC supérieure ($22 \pm 70 \text{ mg/mmol}$) à celle des glyqueurs moyens ($12 \pm 48 \text{ mg/mmol}$) et des glyqueurs bas ($10 \pm 56 \text{ mg/mmol}$), ce qui s'accorde avec nos résultats (92).

Ils ont également rapporté qu'un $\text{G-GAP} > 1$ était significativement associé à une augmentation du RAC $> 10 \text{ mg/mmol}$ ($\text{OR} = 1,85$, $\text{IC à } 95\% = [1,14 - 3,01]$, $p = 0,012$).

À noter que, l'étude de Nayak était une cohorte de 4 ans réalisée chez des diabétiques âgés de plus de 18 ans sans préciser le type de diabète, et les sujets avaient des complications, telles que des néphropathies et des rétinopathies, au moment du recrutement (92). Cela expliquera la divergence des résultats par rapport à notre étude, mais quelque soient les résultats, ils sont en faveur d'une association entre un GAP élevé et le risque ou la progression d'une néphropathie. Ceci était également confirmé par **Rodriguez -Segade et al** en 2011. Dans leur cohorte de 15 ans, ils ont rapporté que les diabétiques de type 2 appartenant au groupe des glyqueurs élevés avaient un risque 2,5 fois plus élevé d'avoir une progression de néphropathie avec une albuminurie $> 100 \text{ mg/24 h}$ par rapport aux glyqueurs bas. (22)

Nos résultats, ainsi que ceux de la littérature, indiquent une forte association statistiquement significative entre un profil de glycation élevé et un risque accru d'augmentation du RAC chez les diabétiques de type 2.

Cette augmentation du RAC est un marqueur biochimique bien établi de la progression vers une néphropathie diabétique, une complication sévère qui peut conduire à une insuffisance rénale terminale.

Une microalbuminurie persistante est également un indicateur de risque accru de maladies cardiovasculaires, y compris les maladies coronariennes et les accidents vasculaires cérébraux.

Ces résultats suggèrent que le G-GAP pourrait être utilisé comme un biomarqueur supplémentaire dans la gestion du diabète de type 2. En identifiant les patients ayant un profil de glycation élevé, les cliniciens pourraient ainsi personnaliser leurs schémas thérapeutiques pour mieux prévenir les complications. Cette approche personnalisée améliorera non seulement la qualité de vie des patients diabétiques mais aussi elle réduira les coûts de santé associés aux complications du diabète.

V.6.4 Le profil lipidique :

L'évaluation du bilan lipidique de la population étudiée a révélé une moyenne de cholestérol total de $4,34 \pm 1,29$ mmol/L, de cholestérol HDL de $1,15 \pm 0,36$ mmol/L, et de cholestérol LDL de $2,56 \pm 1,00$ mmol/L. En ce qui concerne les triglycérides, la moyenne était de $1,62 \pm 1,00$ mmol/L.

L'analyse des perturbations du bilan lipidique a montré que 22,35% des participants avaient un cholestérol total supérieur aux normes (5,20 mmol/L). La majorité, soit 88,82%, présentait une baisse du cholestérol HDL. Près de la moitié de la population, soit 46,47%, avait un taux de cholestérol LDL supérieur à 2,59 mmol/L et 37,06% avaient des triglycérides supérieurs à 1,70 mmol/L.

Ces résultats confirment l'association bien établie entre le DT2 et les perturbations du profil lipidique. Le rôle de la dyslipidémie comme facteur de risque cardiovasculaire chez les sujets diabétiques nous a incités à explorer le lien entre cette dyslipidémie et le trou de glycation (G-GAP), ce qui pourrait aider les cliniciens à mieux gérer le DT2 et ses complications (137,138).

En effet, l'analyse de corrélation de Pearson a révélé une corrélation positive modérée et significative entre le G-GAP et le cholestérol total ($r = 0,285$, $p < 0,001$) ainsi que le cholestérol LDL ($r = 0,285$, $p < 0,001$).

Une faible corrélation significative a également été observée avec les triglycérides ($r = 0,153$, $p = 0,048$). Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre le G-GAP et le cholestérol HDL ($r = 0,095$, $p = 0,220$).

Comparativement, **M. Dziedzic et al 2012** ont identifié chez des sujets sains également une corrélation positive modérée entre le G-GAP et les niveaux de triglycérides, de cholestérol total et de LDL, avec des coefficients de corrélation de 0,34, 0,30 et 0,32 respectivement ($p < 0,05$). (114).

De plus, le G-GAP dans notre étude était significativement plus élevé ($0,64 \pm 1,23$) chez les diabétiques de type 2 présentant une hypercholestérolémie totale $> 5,20$ mmol/L ($p = 0,002$) par rapport à ceux ayant une cholestérolémie totale normale ($-0,07 \pm 1,03$). Le G-GAP était également plus élevé chez les diabétiques ayant un taux de triglycérides supérieur à 1,70 mmol/L ($0,28 \pm 1,03$) par rapport à ceux ayant un taux normal ($-0,03 \pm 1,15$), mais cette différence n'était pas significative ($p = 0,078$). Une observation similaire a été faite pour les diabétiques ayant un taux de cholestérol LDL supérieur à 2,59 mmol/L, où le G-GAP était également plus élevé, mais sans atteindre une significativité statistique ($p = 0,074$).

L'évaluation comparative des profils lipidiques en fonction du niveau de glycation a démontré des différences significatives dans les concentrations de cholestérol total ($p < 0,001$), de cholestérol LDL ($p < 0,001$) et de triglycérides ($p = 0,003$) parmi les trois groupes de glyqueurs. En effet, les glyqueurs élevés avaient des taux de cholestérol total, cholestérol LDL et triglycérides supérieurs à ceux des glyqueurs bas ($p < 0,05$).

En revanche, **Nayak et al. (2013)** n'ont trouvé aucune différence significative entre les différents groupes de glyqueurs concernant les niveaux de cholestérol total ($p = 0,05$) (92). De même, **Dunmore et al. (2017)** ont rapporté que la moyenne du cholestérol total n'était pas significativement différente entre les glyqueurs élevés et les glyqueurs bas (71). Ces résultats ne concordent pas avec ceux de notre étude. Cette divergence pourrait s'expliquer par les caractéristiques des sujets des études suscitée. Nos participants sont exempts de complications connues, tandis que ceux de **Nayak et Dunmore** présentaient des complications. De plus, les populations étudiées incluaient également des sujets diabétiques de type 1, bien que ceux-ci soient minoritaires.

La perturbation du bilan lipidique prédominante chez les glyqueurs élevés a été confirmée par une prévalence significativement plus élevée d'hypercholestérolémie totale et de cholestérol LDL > 2,59 mmol/L (57,7% et 69,2% respectivement) par rapport aux glyqueurs bas (9,1% et 31,8% respectivement) et moyens (17,2% et 44,3%). Aucune différence n'a été constatée pour les triglycérides et le cholestérol HDL en fonction du profil de glycation.

Les résultats de notre étude ont révélé que les patients avec un profil de glycation élevé sont plus susceptibles de présenter des perturbations lipidiques, ce qui pourrait accroître leur risque cardiovasculaire.

Cependant, il existe un manque d'études spécifiquement dédiées à l'exploration du lien entre le G-GAP et les paramètres du bilan lipidique chez les sujets diabétiques de type 2.

La compréhension de la relation entre le G-GAP et le profil lipidique pourrait avoir des implications cliniques importantes. En identifiant les glyqueurs élevés, les cliniciens cibleraient de manière plus efficace les démarches thérapeutiques visant à améliorer le profil lipidique et à réduire le risque de complications cardiovasculaires chez les diabétiques de type 2.

V.6.5 Les indices d'athérogénécité

Les indices d'athérogénécité non traditionnels, tels que le cholestérol non-HDL et l'indice atherogène du plasma (AIP), permettent d'estimer le risque cardiovasculaire chez les diabétiques. En effet, des taux élevés de cholestérol non-HDL sont associés à un risque accru de MCV chez les patients diabétiques de type 2 (139). De même, l'AIP peut être un bon marqueur du risque d'athérosclérose et de MCV (140). Cet indice est significativement corrélé à plusieurs facteurs de RCV, ainsi qu'au score de risque de Framingham (141).

Ces observations ont conduit à évaluer du lien entre ces deux indices et le trou de glycation (G-GAP), afin de déterminer la possibilité de prédire le risque cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2 en fonction de leur profil de glycation.

Ainsi dans notre étude, le cholestérol non-HDL varie de -0,72 à 7,26 mmol/L avec une moyenne de $3,19 \pm 1,23$ mmol/L, tandis que l'indice athérogène du plasma (AIP) varie de -0,57 à 1,07 avec une moyenne de $0,10 \pm 0,29$.

La répartition de la population d'étude en fonction des statuts de ces deux indices a révélé que 41,2 % des participants présentaient des valeurs de cholestérol non-HDL pathologiques ($> 3,36$ mmol/L). Un tiers des participants soit 33,53 % avait un risque athérogène élevé (AIP $> 0,21$).

L'analyse de corrélation de Pearson a montré une corrélation positive modérée et significative entre le G-GAP et le cholestérol non-HDL ($r = 0,270$, $p = 0,000$), ainsi qu'une faible corrélation positive non significative avec l'AIP ($r = 0,114$, $p = 0,142$).

Par ailleurs, les diabétiques ayant un taux de cholestérol non-HDL $> 3,36$ mmol/L avaient un G-GAP significativement plus élevé par rapport à ceux ayant un cholestérol non-HDL normal ($p = 0,029$). De même, ceux ayant un AIP $> 0,11$ présentaient un G-GAP plus élevé que chez les diabétiques avec un AIP $< 0,11$, bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative.

Les diabétiques classés comme glyqueurs élevés avaient un cholestérol non-HDL significativement plus élevé que ceux des glyqueurs bas et moyens ($p = 0,0001$). De plus, une fréquence significativement plus élevée de cholestérol non-HDL $> 3,36$ mmol/L a été observée chez les glyqueurs élevés (73,1 %) par rapport aux glyqueurs bas (18,2 %) et moyens (38,5 %).

Ces résultats indiquent que les individus présentant un niveau de glycation élevé ont une prévalence beaucoup plus importante de cholestérol non-HDL élevé, un marqueur clé de risque cardiovasculaire.

En effet, Les diabétiques un taux de cholestérol non HDL $> 3,36$ mmol/l présentaient un risque 5 fois plus (IC à 95% = [2,56 – 47,41]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP > 1) par rapport aux diabétiques ayant un taux normal.

S. Meera et al ont rapporté l'absence de corrélation significative entre le G-GAP et l'indice athérogène plasmatique (AIP). En effet, leur étude a montré une corrélation faible mais non significative entre le G-GAP et l'AIP ($r = 0,097$, $p = 0,252$) (142). Ces résultats concordent partiellement avec nos observations concernant l'AIP. Il faut toutefois signaler qu'aucune autre étude n'a évalué le lien possible entre le trou de glycation et les indices d'athérogénécité.

Notre étude indique que le groupe des individus à glycation élevée présente un profil athérogène, impliquant un risque élevé de complications cardiovasculaires. Nos résultats révèlent également que ces individus affichent une prévalence significativement plus élevée de cholestérol non-HDL, un marqueur essentiel du RCV.

Toutefois, des recherches supplémentaires sont requises pour approfondir ces relations et confirmer la pertinence clinique du G-GAP en tant qu'outil de suivi des RCV.

V.6.6 L'homocystéine :

Les preuves épidémiologiques, ainsi que les données d'études rétrospectives et prospectives, montrent une association entre des niveaux élevés d'homocystéine (HCY) et un risque accru de MCV, suggérant que l'HCY est un marqueur de risque plutôt qu'une cause de ces maladies. Des études récentes révèlent également des interactions croissantes entre les niveaux plasmatiques de HCY et le DT2 ainsi que ses complications vasculaires (**11, 143,144**).

Près de la moitié de la population de notre étude soit 49,41% présentait une hyperhomocystéinémie modérée (15~30 $\mu\text{mol/l}$) versus 37,67% présentait une normo homocystéinémie (5– 15 $\mu\text{mol/l}$)

Le G-Gap de notre population d'étude a révélé **une corrélation positive modérée et significative** avec l'homocystéinémie d'une part ($r = 0,487$, $p < 0,001$), et avec les différentes classes de l'hyperhomocystéinémie ($r=0,356$, $p<0,0001$) d'autre part. De plus, il était **significativement plus élevé** chez les sujets diabétiques présentant une hyperhomocystéinémie $> 15\mu\text{mol/l}$ par rapport à ceux ayant taux normal ($p<0,0001$). Ceci suggère qu'une variation dans le G-GAP est associée à des changements correspondants dans les niveaux de l'homocystéinémie.

L'analyse comparative de la moyenne de l'homocystéinémie en fonction du profil de glycation a révélé une différence significative entre les trois groupes de glyqueurs ($p = 0,000$). La moyenne d'homocystéinémie était significativement supérieure chez les glyqueurs élevés comparativement aux glyqueurs moyens et glyqueurs bas ($p<10^{-3}$).

L'analyse comparative de la variation de l'homocystéinémie selon le profil de glycation par le *test exact de Fisher* a révélé l'existence d'une fréquence significativement ($p<0,0001$) plus élevée d'hyperhomocystéinémie $> 15 \mu\text{mol/l}$ chez les glyqueurs élevés (96,2%) par rapport aux glyqueurs bas (50%) et moyens (57,4%).

En effet, Les diabétiques avec une hyperhomocystéinémie $>15\mu\text{mol/l}$ présentaient 19 fois plus de risque (IC à 95% = [2,56 – 47,41]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP >1) par rapport aux diabétiques ayant une homocystéinémie normale.

Ce résultat indique une forte association statistiquement significative entre un taux de glycation élevé et un risque accru d'hyperhomocystéinémie.

L'analyse de concordance de Kendall a révélé l'existence d'une corrélation modérée (Tau-B=0,368) positive et significative ($p= 0,000$) entre le profil de glycation et les classes d'hyperhomocystéinémie.

Ces résultats suggèrent que les diabétiques ayant un niveau de glycation plus élevé tendent à avoir des valeurs d'homocystéine plasmatique plus élevées.

Cela est probablement dû au fait qu'un profil de glycation élevé est associé à une augmentation des taux d'AGEs (produits avancés de glycation). Les radicaux libres issus de ces AGEs peuvent interférer avec le métabolisme de la méthionine, conduisant à l'hyperhomocystéinémie en inactivant ou en oxydant des enzymes clés telles que la méthionine synthase (MS), la méthylène-tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la cystathionine- β -synthase (CBS) (145). Par conséquent, la gestion des niveaux de glycation pourrait jouer un rôle déterminant dans la prévention des complications liées à l'hyperhomocystéinémie chez les patients diabétiques.

Aucune étude n'a encore évalué le lien entre le trou de glycation et l'homocystéinémie. Il existe un manque d'études approfondies spécifiquement dédiées à l'exploration de cette relation. Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce lien et pour évaluer l'utilité clinique du G-GAP comme outil de dépistage et de suivi des patients diabétiques à haut risque de complications cardiovasculaires.

V.6.7 L'acide urique :

L'acide urique joue un rôle clé dans l'exacerbation de la RI chez les diabétiques de type 2. L'hyperuricémie est associée à des complications micro et macrovasculaires, et peut servir de marqueur pour les maladies cardiovasculaires, principale cause de mortalité chez les diabétiques.

Les données récentes indiquent que l'acide urique peut générer un stress oxydant, provoquer un dysfonctionnement endothélial, un syndrome inflammatoire et une vasoconstriction.(146,147) Pour ces raisons, l'évaluation du G-GAP et sa relation avec l'acide urique s'est avérée nécessaire.

Dans notre étude, la moyenne de l'uricémie était de $306,28 \pm 91,39 \mu\text{mol/L}$, avec des valeurs extrêmes allant de 111 à $584 \mu\text{mol/L}$.

L'analyse de l'association possible entre le G-GAP et l'acide urique a révélé une corrélation positive modérée et significative ($r = 0,458$, $p < 0,001$). La moyenne du G-GAP était significativement plus élevée chez les diabétiques présentant une hyperuricémie ($> 416 \mu\text{mol/L}$ pour les hommes, $> 340 \mu\text{mol/L}$ pour les femmes) par rapport à ceux ayant des taux normaux ($p < 10^{-3}$).

L'analyse comparative en fonction du profil de glycation a montré une moyenne d'uricémie significativement supérieure chez les glyqueurs élevés comparativement aux glyqueurs moyens et bas ($p < 10^{-3}$).

De même, la fréquence de l'hyperuricémie était significativement plus élevée chez les glyqueurs élevés (65,4%) par rapport aux glyqueurs bas (9,1%) et moyens (16,4%) ($p < 10^{-3}$).

En effet, les diabétiques avec une hyperuricémie ($> 416 \mu\text{mol/l}$ (H), $> 340 \mu\text{mol/l}$ (F)) présentaient un risque 10 fois plus (IC à 95% = [4,14 – 26,46]) d'avoir un profil de glycation élevé (G-GAP > 1) par rapport aux diabétiques ayant une uricémie normale.

Nos résultats suggèrent une association positive entre le G-GAP et l'acide urique chez les patients diabétiques. Les individus présentant des taux élevés de glycation ont également des taux d'acide urique significativement plus élevés, suggérant un lien potentiel entre ces deux marqueurs biochimiques.

Cette constatation souligne l'importance de surveiller les taux d'acide urique chez les patients diabétiques de type 2, en particulier ceux présentant un G-GAP élevés. Une prise en charge conjointe de l'hyperglycémie et de l'hyperuricémie pourrait améliorer les résultats thérapeutiques chez ces patients.

Notre étude représente la première analyse de l'association entre le G-GAP et l'acide urique (AU), une relation encore peu étudiée dans la littérature scientifique. Bien que les résultats soient prometteurs, l'absence d'études comparatives rend l'interprétation de nos données plus difficile. Toutefois, cette recherche ouvre de nouvelles perspectives pour mieux comprendre les mécanismes pathophysiologiques du diabète et souligne l'importance de mener des recherches approfondies sur ce sujet.

V.7 Les limites de notre étude :

Notre étude a présenté plusieurs limites à savoir :

- **Le type d'étude transversale menée :** Bien que nos résultats suggèrent une association intéressante entre le G-GAP et le risque de complications diabétiques, il est important de noter que cette étude présente certaines limites. En raison du schéma transversal de l'étude, les résultats ne permettent pas d'affirmer que le G-GAP est un facteur causal de l'augmentation du RAC ou de l'homocystéinémie. Il est également possible que d'autres facteurs non mesurés soient responsables de l'association observée.
- **L'absence d'études comparables** rend difficile l'interprétation de nos résultats dans un contexte plus large. De plus, la taille relativement réduite de notre échantillon pourrait limiter la puissance statistique de nos analyses. Des études de confirmation, idéalement prospectives et multicentriques, sont nécessaires pour conforter ces résultats.
- **Accès limité aux données des patients :** La récolte des données et l'accès aux dossiers des patients ont été difficiles. Les dossiers ne contenaient pas tous les renseignements nécessaires pour certains cas, ce qui a créé un biais d'information. Ce manque de données complètes nécessaires à l'étude a limité notre capacité à effectuer une analyse plus approfondie des autres paramètres surtout cliniques.
- **Manque de réactifs pour le dosage des paramètres de l'étude :** Nous avons également été confrontés à une indisponibilité prolongée des réactifs essentiels pour le dosage des paramètres étudiés, persistante plusieurs mois. Cette pénurie a causé des retards considérables dans notre calendrier de recherche et a perturbé la continuité du recrutement des patients.
- **Non-respect des conditions de prélèvement par les malades :** Plusieurs participants n'ont pas suivi les instructions nécessaires pour la collecte d'urine destinée aux dosages de micro-albuminurie et de créatininurie. Cette non-conformité a nécessité de multiples reprises de prélèvements, entraînant ainsi des retards significatifs et des difficultés dans la collecte des échantillons.

V.8 Les points forts de notre étude :

- **Originalité** : Bien que des difficultés ont été rencontrées, notre étude est la première à évaluer le trou de glycation (G-GAP) chez la population diabétique de type 2 dans notre région, ce qui constitue une contribution novatrice à la littérature existante.
- **Résultats récents et pertinents** : le G-GAP proposé comme outil de suivi et de prédiction des complications diabétiques, a été étudié en parallèle avec plusieurs autres paramètres biochimiques de suivi. Cette approche comparative n'a pas été abordée dans les études précédentes, apportant ainsi des résultats récents et innovants dans ce domaine de recherche.
- **Nouvel outil clinique** : Notre étude propose le G-GAP comme un nouvel outil potentiel de surveillance et de prise en charge des diabétiques de type 2 (DT2), offrant aux cliniciens une approche supplémentaire et personnalisée pour le suivi des patients DT2
- **Comparaison internationale** : Nous avons exploité nos données de manière optimale en les comparant à celles de populations similaires, en mettant particulièrement l'accent sur des études récentes réalisées dans autres régions du monde, renforçant ainsi la pertinence de nos résultats.

VI. Conclusion

Les patients atteints du DT2 sont à risque de développer des complications sévères, notamment la rétinopathie, la néphropathie, la neuropathie périphérique, l'IDM et l'AVC. Plusieurs études ont montré que la réduction de l'HbA1c diminue significativement l'apparition et la progression de ces complications. Cependant, une variation interindividuelle considérable des valeurs de l'HbA1c a été rapportée. Des chercheurs ont proposé que le "trou de glycation" puisse expliquer cet excès de variation interindividuelle de l'HbA1c et prédire le risque de complications diabétiques.

Le trou de glycation se calcule en faisant appel à une autre mesure du contrôle glycémique qui est la fructosamine. Cette dernière reflète la glycation des protéines plasmiques sur une courte durée.

Notre étude a évalué les associations du glycation gap (G-GAP) avec divers facteurs sociodémographiques, cliniques, anthropométriques, et biochimiques chez 170 patients atteints de DT2 sans complications connues. En stratifiant les patients selon leur niveau de glycation, nous avons identifié des corrélations significatives. L'analyse approfondie de ces interactions a fourni des informations précieuses susceptibles d'influencer la progression et la gestion du diabète de type 2.

Le G-GAP s'est révélé indépendant de l'âge, du sexe et de l'activité physique, mais fortement associé à l'obésité, particulièrement abdominale. Ces résultats soulignent l'importance de la prise en charge du poids dans la prévention des complications du diabète.

Nos résultats suggèrent une association plus étroite entre le G-GAP et l'évolution du diabète de type 2.

En effet, nous avons observé que le glycation gap était significativement plus élevé chez les patients diabétiques DT2 depuis plus de sept ans et ceux nécessitant une insulinothérapie. Ces constatations soulignent l'importance du G-GAP comme indicateur potentiel de la progression de la maladie et pourraient guider les décisions thérapeutiques, notamment en matière d'intensification des traitements chez les glyqueurs élevés.

Les analyses biochimiques ont révélé un profil métabolique défavorable chez les patients présentant un glycation gap élevé. Ces derniers présentaient non seulement des taux élevés d'HbA1c, mais également des signes d'altération de la fonction rénale (microalbuminurie) et un risque cardiovasculaire accru, comme en témoignent les taux élevés d'homocystéine et les perturbations du profil lipidique et l'hyperuricémie. Ces données confirment la complémentarité du glycation gap par rapport aux marqueurs biochimiques traditionnels et soulignent son intérêt clinique pour une évaluation plus précise du risque de complications chez les patients diabétiques DT2.

L'utilisation du G-GAP comme outil de suivi et prédiction des complications diabétiques pourrait révolutionner la gestion du diabète de type 2.

L'ajout de la fructosamine dans le bilan de suivi avec l'HbA1c trouve son intérêt pour identifier le profil de glycation. En permettant ainsi une identification précoce des patients à haut risque (les glyqueurs élevés).

Les professionnels de santé pourraient mettre en place des interventions préventives ciblées. Cette approche personnalisée aurait non seulement un impact positif sur la qualité de vie des patients en réduisant les complications liées au diabète, mais contribuerait également à optimiser la gestion des coûts de santé à long terme.

VII. Recommandations

- **Utilisation combinée de l'HbA1c et de la fructosamine** : Il est recommandé d'adopter une approche de surveillance du contrôle glycémique qui intègre simultanément les mesures de l'HbA1c et de la fructosamine. Cette combinaison permet de refléter les niveaux de glycation à court et à long terme, fournissant ainsi un aperçu plus complet de la dynamique de glycation chez les patients diabétiques.
- **Intégrer le G-GAP dans la pratique clinique** : Plutôt que de se limiter à l'HbA1c et à la fructosamine, il serait pertinent d'intégrer explicitement le concept de "glycation gap" (G-GAP) dans les recommandations. Le G-GAP offre une évaluation plus fine de la dynamique de glycation et pourrait devenir un outil de décision clinique important.
- **Personnaliser la prise en charge** : Insister sur l'importance de personnaliser la prise en charge en fonction du profil de glycation individuel. Cela pourrait inclure des recommandations spécifiques en termes de choix thérapeutiques, de fréquence de suivi et d'objectifs glycémiques.
- **Considérer le contexte socioculturel** : Souligner l'importance de prendre en compte le contexte socioculturel des patients algériens dans la mise en œuvre de ces recommandations. Cela pourrait impliquer l'adaptation des messages clés et des outils éducatifs.

VIII. Perspectives :

- **Étudier l'impact des interventions :** Proposer des études longitudinales en Algérie pour évaluer l'impact de l'intégration du G-GAP dans la pratique clinique sur les résultats des patients notamment les complications diabétiques. Ces études aideraient à établir des corrélations précises et à ajuster les pratiques médicales en conséquence.
- **Développer des outils décisionnels :** Sur la base des données collectées, Envisager le développement des seuils décisionnels et de nouvelles recommandations thérapeutiques ajustés aux profils de glycation des patients. Ces seuils aideraient les professionnels de santé à prendre des décisions éclairées concernant les ajustements de traitement nécessaires pour chaque patient.
- **Collaboration avec des institutions de recherche :** Encourager la collaboration entre les hôpitaux, les universités et les centres de recherche en Algérie pour faciliter le partage des données et des ressources, renforçant ainsi les recherches sur le diabète et ses complications.
- **Sensibilisation et éducation :** Renforcer les programmes de sensibilisation et d'éducation pour les patients et les professionnels de santé sur l'importance du contrôle glycémique et les innovations en matière de surveillance et de traitement du diabète.

IX. Références bibliographiques:

1. Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med.* oct 2020;10(04):174-88.
2. Harreiter J, Roden M. Diabetes mellitus – Definition, Klassifikation, Diagnose, Screening und Prävention (Update 2023). *Wien Klin Wochenschr.* 2023;135(Suppl 1):7-17.
3. IDF diabetes atlas, 9th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2019. Available from: www.diabetesatlas.org
4. IDF diabetes atlas, 10th edition. Brussels: International Diabetes Federation; 2021. Available from: www.diabetesatlas.org
5. World Health Organization. Enquête STEPwise Algérie 2016-2017: meilleure connaissance du profil de santé des Algériens pour les maladies non transmissibles. Le 18 novembre 2018 Disponible sur: <https://www.afro.who.int/fr/countries/algeria>
6. Khamis AM. Pathophysiology, Diagnostic Criteria, and Approaches to Type 2 Diabetes Remission. *Cureus.* janv 2023;15(1):e33908.
7. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 30 août 2020;21(17):6275.
8. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). SUIVI DU PATIENT DIABETIQUE DE TYPE 2 A L'EXCLUSION DU SUIVI DES COMPLICATIONS *Acta Endosc.* avr 1998;28(2):151-5.
9. Haute Autorité de Santé. Actualisation du référentiel de pratiques de l'examen périodique de santé: prévention et dépistage du diabète de type 2 et des maladies liées au diabète. Octobre 2014
10. Belkhair J, Sebbani M, Lachgar F, Baizri H, Amine M, Saliha C. L'hyperhomocystéinémie chez une population diabétique type 2: prévalence et son association aux parametres clinicobiologiques. *Médecine des Maladies Métaboliques.* 1 oct 2019;13:556-60.
11. Becker A, Kostense PJ, Bos G, Heine RJ, Dekker JM, Nijpels G, et al. Hyperhomocysteinaemia is associated with coronary events in type 2 diabetes. *Journal of Internal Medicine.* 2003;253(3):293-300.
12. Catargi B, Vernhet I, Parrot-Roulaud F. Hormones and homocysteine. *Sang Thrombose Vaisseaux.* 1 janv 2000;12:564-8.
13. Girerd S, Soulie M, Barrera-Chimal J, Jaisser F. Antagonistes du récepteur minéralocorticoïde - Une nouvelle option thérapeutique dans la maladie rénale diabétique. *Medecine Sciences (Paris).* 1 avr 2023;39(4):335-43.

14. Moderately increased albuminuria (microalbuminuria) in type 2 diabetes mellitus - Waltham (MA): UpToDate, Inc.; c2024. Disponible sur: <https://www.uptodate.com>
15. Pohanka M. Glycated Hemoglobin and Methods for Its Point of Care Testing. *Biosensors* (Basel). 4 mars 2021;11(3):70.
16. Biomnis. Hémoglobine glyquée. Précis de biopathologie, analyses médicales spécialisées. Lyon: Biomnis 2012.
17. Abourazzak S, Dorchy H, Willems D, Melot C. P38 La variation biologique de la glycation et la moyenne glycémique ont une plus grande influence sur l'HbA1c des jeunes diabétiques de type 1 que l'instabilité glycémique. *Diabetes & Metabolism* . 1 mars 2008;34.
18. McCarter RJ, Hempe JM, Chalew SA. Mean Blood Glucose and Biological Variation Have Greater Influence on HbA1c Levels Than Glucose Instability: An analysis of data from the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care*. 1 févr 2006;29(2):352-5.
19. H.B. Østergaard, T. Mandrup-Poulsen, G.F.N. Berkelmans , Y. van der Graaf, F.L.J. Visseren, J. Westerink. Limited benefit of haemoglobin glycation index as risk factor for cardiovascular disease in type 2 diabetes patients. *Diabetes & Metabolism*. juin 2019;45(3):P. 254-260.
20. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH. Discordance between HbA1c and fructosamine: evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. janv 2003;26(1):163-7.
21. Zafon C, Ciudin A, Valladares S, Mesa J, Simó R. Variables Involved in the Discordance between HbA1c and Fructosamine: The Glycation Gap Revisited. *Musabayane CT*, éditeur. PLoS ONE. 12 juin 2013;8(6).
22. Rodríguez-Segade S, Rodriguez J, Cabezas-Agrícola J, Casanueva F, Camiña F. Progression of Nephropathy in Type 2 Diabetes: The Glycation Gap Is a Significant Predictor after Adjustment for Glycohemoglobin (Hb A(1c)). *Clinical chemistry*. 1 févr 2011;57:264-71.
23. Sapra A, Bhandari P. Diabetes Mellitus. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Bookshelf ID: NBK551501, PMID: 31855345
24. World Health Organization, International Diabetes Federation. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO / IDF consultation. Geneva: WHO; 2006.
25. Selvin E. Hemoglobin A1c—Using Epidemiology to Guide Medical Practice: Kelly West Award Lecture 2020. *Diabetes Care*. oct 2021;44(10):2197-204.

26. World Health Organization. Enquête STEPwise Algérie 2016-2017: meilleure connaissance du profil de santé des Algériens pour les maladies non transmissibles. Le 18 novembre 2018 Disponible sur: <https://www.afro.who.int/fr/countries/algeria>
27. Galicia-Garcia U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, et al. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci.* 30 août 2020;21(17):6275.
28. Boitard C. Les diabètes : de la génétique à l'environnement. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine.* 1 mai 2020;204(5):493-9.
29. Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, et al. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes.* 15 déc 2016;66(2):241-55.
30. Philippe J. Étude des formes monogéniques de diabète de type 2 et d'obésité par le séquençage de nouvelle génération.
31. Rigalleau V, Lang J, Gin H. Étiologie et physiopathologie du diabète de type 2. *EMC - Endocrinologie - Nutrition.* 1 janv 2007;4.
32. Scheen AJ. Pathophysiology of Type 2 Diabetes. *Acta Clinica Belgica.* 1 déc 2003;58(6):335-41.
33. Féry F, Paquot N. ETIOPATHOGÉNIE ET PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABÈTE DE TYPE 2. *Rev Med Liege* 2005; 60 : 5-6 : 361-368
34. Taylor R. Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 1 avr 2012;61(4):778-9.
35. Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia.* 1 oct 2011;54(10):2506-14.
36. Boden G., She P., Mozzoli M., Cheung P., Gumireddy K., Reddy P., Xiang X., Luo Z. et Ruderman N. (2005). "Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver." *Diabetes* 54(12): 3458-65.
37. Mahler RJ, Adler ML. Type 2 Diabetes Mellitus: Update on Diagnosis, Pathophysiology, and Treatment. 2018;84(4).
38. Lam TKT, van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* févr 2003;284(2):E281-290.
39. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* juin 2001;44(6):659-73.

40. Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. Protein Kinase C Function in Muscle, Liver, and β -Cells and Its Therapeutic Implications for Type 2 Diabetes. *Diabetes*. juill 2008;57(7):1774-83.
41. Montague CT, O'Rahilly S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes*. juin 2000;49(6):883-8.
42. Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. avr 2009;16(2):141-9.
43. Cinti F, Bouchi R, Kim-Muller JY, Ohmura Y, Sandoval PR, Masini M, et al. Evidence of β -Cell Dedifferentiation in Human Type 2 Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. mars 2016;101(3):1044-54.
44. Amo-Shiinoki K, Tanabe K, Hoshii Y, Matsui H, Harano R, Fukuda T, et al. Islet cell dedifferentiation is a pathologic mechanism of long-standing progression of type 2 diabetes. *JCI Insight* [Internet]. 11 janv 2021 [cité 21 janv 2024];6(1). Disponible sur: <https://insight.jci.org/articles/view/143791>
45. Mizukami H, Kudoh K. Diversity of pathophysiology in type 2 diabetes shown by islet pathology. *J Diabetes Investig*. janv 2022;13(1):6-13.
46. Chamine I, Hwang J, Valenzuela S, Marino M, Larson AE, Georgescu J, et al. Acute and Chronic Diabetes-Related Complications Among Patients With Diabetes Receiving Care in Community Health Centers. *Diabetes Care*. 15 août 2022;45(10):e141-3.
47. Farmaki P, Damaskos C, Garmpis N, Garmpi A, Savvanis S, Diamantis E. Complications of the Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Cardiol Rev*. nov 2020;16(4):249-51.
48. Lyssenko V, Vaag A. Genetics of diabetes-associated microvascular complications. *Diabetologia*. 1 sept 2023;66(9):1601-13.
49. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews*. janv 2013;93(1):137-88.
50. Paolo S Silva,. Diabetic retinopathy: Pathogenesis - UpToDate [Internet]. Disponible sur: https://www.uptodate.com/contents/diabetic-retinopathy-pathogenesis/print?search=overview%20of%20chronic%20diabetic%20complication%20&source=search_result&selectedTitle=37~150&usage_type=default&display_rank=33
51. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(2).
52. Martinez L, Zahra T. Chronic Complications of Diabetes. *EMJ Diabet* [Internet]. 25 avr 2022 [cité 26 janv 2024]; Disponible sur: <https://emj.emg-health.com/diabetes/article/chronic-complications-of-diabetes>
53. McFarlane P, Gilbert RE, MacCallum L, Senior P. La néphropathie chronique en présence de diabète. *Canadian Journal of Diabetes*. 1 oct 2013;37:S504-12.

54. Fougere É. La néphropathie diabétique. *Actualités Pharmaceutiques*. 1 mars 2020;59(594):55-6.
55. Lori Laffel, MPH Britta Svoren. Chronic complications and screening in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus - UpToDate [Internet]. Disponible sur: <https://www.uptodate.com/contents>
56. Papatheodorou K, Banach M, Bekiari E, Rizzo M, Edmonds M. Complications of Diabetes 2017. *J Diabetes Res*. 11 mars 2018;2018:3086167.
57. Bailes BK. Diabetes Mellitus and its Chronic Complications. *AORN Journal*. 2002;76(2):265-82.
58. Huang D, Refaat M, Mohammedi K, Jayyousi A, Al Suwaidi J, Abi Khalil C. Macrovascular Complications in Patients with Diabetes and Prediabetes. *BioMed Research International*. 7 nov 2017;2017:e7839101.
59. Viigimaa M, Sachinidis A, Toumpourleka M, Koutsampasopoulos K, Alliksoo S, Titma T. Macrovascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Current Vascular Pharmacology*. 5 avr 2019;17.
60. Grunitzky K, Balogou K, Barque-kombate R, Kombate D, Amouzou K. Homocysteinémie et accidents vasculaires cérébraux ischémiques au CHU de Lomé. *African Journal of Neurological Sciences*. 2008;27(2).
61. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*. 2001;56:1-21.
62. Shin A, Connolly S, Kabytaev K. Protein glycation in diabetes mellitus. *Adv Clin Chem*. 2023;113:101-56.
63. Rabbani N, Thornalley PJ. Protein glycation - biomarkers of metabolic dysfunction and early-stage decline in health in the era of precision medicine. *Redox Biol*. juin 2021;42:101920.
64. Anago E, Djogbede G, Fiogbe EMS, Segbo GAJ, Akpovi DC. Rôle de la glycation des protéines dans les complications et la thérapie du diabète: revue bibliographique: Role of protein glycation in diabetes complications and treatment: bibliographical review. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2022;16(6):2930-44.
65. Anago E, Djogbede G, Fiogbe EMS, Segbo GAJ, Akpovi DC. Rôle de la glycation des protéines dans les complications et la thérapie du diabète: revue bibliographique: Role of protein glycation in diabetes complications and treatment: bibliographical review. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2022;16(6):2930-44.
66. Nakamura, Y., et al., Immunohistochemical localization of advanced glycosylation end products in coronary atheroma and cardiac tissue in diabetes mellitus. *Am J Pathol*, 1993. 143(6): p. 1649-56.

67. Khera PK, Joiner CH, Carruthers A, Lindsell CJ, Smith EP, Franco RS, et al. Evidence for interindividual heterogeneity in the glucose gradient across the human red blood cell membrane and its relationship to hemoglobin glycation. *Diabetes*. sept 2008;57(9):2445-52.
68. Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Van Schaftingen E. Fructosamine 3-kinase is involved in an intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J*. 1 août 2002;365(Pt 3):801-8.
69. Szwergold BS, Howell S, Beisswenger PJ. Human Fructosamine-3-Kinase: Purification, Sequencing, Substrate Specificity, and Evidence of Activity In Vivo. *Diabetes*. 1 sept 2001;50(9):2139-47.
70. The expression of the genes for fructosamine-3-kinase and fructosamine-3-kinase-related protein appears to be constitutive and unaffected by environmental signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 22 oct 2004;323(3):932-6.
71. Dunmore S, Alderawi A, Nayak A, Narshi A, Nevill A, Hellwig A, et al. Evidence That Differences in Fructosamine-3-Kinase Activity May Be Associated With the Glycation Gap in Human Diabetes. *Diabetes*. 24 oct 2017;67:db170441.
72. Yazdanpanah S, Rabiee M, Tahriri M, Abdolrahim M, Rajab A, Jazayeri H, et al. Evaluation of glycated albumin (GA) and GA/HbA1c ratio for diagnosis of diabetes and glycemic control: A comprehensive review. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 10 avr 2017;54:1-14.
73. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JI, Nathan D, Peterson CM, et al. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care*. juill 2004;27(7):1761-73.
74. Weykamp C, John WG, Mosca A, Hoshino T, Little R, Jeppsson JO, et al. The IFCC Reference Measurement System for HbA1c: a 6-year progress report. *Clin Chem*. févr 2008;54(2):240-8.
75. Radin MS. Pitfalls in hemoglobin A1c measurement: when results may be misleading. *J Gen Intern Med*. févr 2014;29(2):388-94.
76. Shu Hwang Ang a, M. Thevarajah b, Yatimah Alias a, Sook Mei Khor object. Current aspects in hemoglobin A1c detection: A review. [cité 31 juill 2024]; Disponible sur: https://core.ac.uk/reader/162015707?utm_source=linkout
77. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 30 sept 1993;329(14):977-86.

78. Turner R, Holman R, Cull C, Stratton I, Matthews D, Frighi V, et al. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *The Lancet*. 12 sept 1998;352:837-53.
79. Darmon P, Bauduceau B, Bordier L, Detournay B, Gautier JF, Gourdy P, et al. Prise de position de la Société Francophone du Diabète (SFD) sur les stratégies d'utilisation des traitements anti-hyperglycémiant dans le diabète de type 2 - 2023. *Médecine des Maladies Métaboliques*. déc 2023;17(8):664-93.
80. Kaiafa G, Veneti S, Polychronopoulos G, Pilalas D, Daios S, Kanellos I, et al. Is HbA1c an ideal biomarker of well-controlled diabetes? *Postgraduate Medical Journal*. 1 juin 2021;97(1148):380-3.
81. S. Jaisson , P. Gillery. Fructosamine. *Encyl Med Biol*, Elsevier [90-10-0130-B] - Doi : 10.1016/S2211-9698(21)43406-0
82. Gounden V, Ngu M, Anastasopoulou C, Jialal I. Fructosamine. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [cité 16 nov 2022]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470185/>
83. Gillery P., Fructosamines, *Cahier de formation Biochimie*, tome I, Bioforma, Paris, 1992 :157-161.
84. Mukesh Agarwal, Gurdeep S Dhatt,Yusra OthmanMilos R Ljubisavljevic. Gestational Diabetes: An Evaluation of Serum Fructosamine as a Screening Test in a High-Risk Population | Disponible sur: <https://www.researchgate.net/publication/49685221>
85. Lin MJ, Hoke C, Ettinger B, Coyne RV. Technical performance evaluation of BM/Hitachi 747-200 serum fructosamine assay. *Clin Chem*. févr 1996;42(2):244-8.
86. Nayak A, Singh B, Dunmore S. Potential Clinical Error Arising From Use of HbA1c in Diabetes: Effects of the Glycation Gap. *Endocrine Reviews*. 10 mai 2019;40.
87. Hempe JM, Gomez R, McCarter RJ, Chalew SA. High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: a challenge for interpretation of glycemic control. *J Diabetes Complications*. 2002;16(5):313-20.
88. McCarter RJ, Hempe JM, Gomez R, Chalew SA. Biological Variation in HbA1c Predicts Risk of Retinopathy and Nephropathy in Type 1 Diabetes. *Diabetes Care*. 1 juin 2004;27(6):1259-64.
89. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH. Discordance between HbA1c and fructosamine: evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. janv 2003;26(1):163-7.

90. Macdonald DR, Hanson AM, Holland MR, Singh BM. Clinical impact of variability in HbA1c as assessed by simultaneously measuring fructosamine and use of error grid analysis. *Ann Clin Biochem.* juill 2008;45(Pt 4):421-5.
91. Nayak A, Holland M, Macdonald D, Nevill A, Singh B. Evidence for Consistency of the Glycation Gap in Diabetes. *Diabetes care.* 29 juin 2011;34:1712-6.
92. Nayak A, Nevill A, Bassett P, Singh B. Association of Glycation Gap With Mortality and Vascular Complications in Diabetes. *Diabetes care.* 8 juill 2013;36.
93. Cosson E, Banu I, Cussac-Pillegand C, Chen Q, Chiheb S, Jaber Y, et al. Glycation Gap Is Associated With Macroproteinuria but Not With Other Complications in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes care.* 1 févr 2013;36.
94. Rodriguez-Segade S, Rodriguez J, Lopez J, Casanueva F, Camiña F. Estimation of the Glycation Gap in Diabetic Patients With Stable Glycemic Control. *Diabetes care.* 6 sept 2012;35.
95. Haute autorité de santé-Guide des connaissances sur l'activité physique et la sédentarité - Saint-Denis La Plaine: HAS;juillet 2022- ISBN : 978-2-11-167529-2
96. Haute Autorité de Santé [Internet].Guide du parcours de soins : surpoids et obésité de l'adulte. Denis La Plaine: HAS; Septembre 2011- ISBN : 978-2-11-167529-2
97. World Health Organization - Regional Office for the Eastern Mediterranean [Internet]. [cité 16 mars 2024]. WHO EMRO | Obésité | Thèmes de santé. Disponible sur: <http://www.emro.who.int/fr/health-topics/obesity/>
98. Syed IAA, Khan WA. Glycated Haemoglobin — a marker and predictor of cardiovascular disease. *J Pak Med Assoc.* 2011;61(7):6.
99. Macdonald DR, Hanson AM, Holland MR, Singh BM. Clinical impact of variability in HbA1c as assessed by simultaneously measuring fructosamine and use of error grid analysis. *Ann Clin Biochem.* 1 juill 2008;45(4):421-5.
100. Robert S Rosenson, MDC Christopher Smith, MD Kenneth A Bauer, MD. Overview of homocysteine - UpToDate [Internet]. Disponible sur: https://www.uptodate.com/contents/overview-of-homocysteine/print?search=cardiovascular%20disease%20in%20diabetic&topicRef=1542&source=see_link
101. Nathalie P. Guide du parcours de soins – Maladie rénale chronique de l'adulte (MRC). 2021;
102. Niroumand S, Khajedaluee M, Khadem-Rezaian M, Abrishami M, Juya M, Khodae G, et al. Atherogenic Index of Plasma (AIP): A marker of cardiovascular disease. *Med J Islam Repub Iran.* 25 juill 2015;29:240.

103. Shen S, Lu Y, Qi H, Li F, Shen Z, Wu L, Yang C, Wang L, Shui K, Wang Y, Qiang D, Yun J, Weng X. Association between ideal cardiovascular health and the atherogenic index of plasma. *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(24):e3866.
104. Nayak A, Nevill A, Bassett P, Singh B. Association of Glycation Gap With Mortality and Vascular Complications in Diabetes. *Diabetes care*. 8 juill 2013;36.
105. Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé (ANAES). SUIVI DU PATIENT DIABETIQUE DE TYPE 2 A L'EXCLUSION DU SUIVI DES COMPLICATIONS-Acta Endosc. avr 1998;28(2):151-5. I.S.B.N. : 2-910653-47-1
106. Zafon C, Ciudin A, Valladares S, Mesa J, Simó R. Variables Involved in the Discordance between HbA1c and Fructosamine: The Glycation Gap Revisited. Musabayane CT, éditeur. PLoS ONE. 12 juin 2013;8(6):e66696.
107. Cohen R, LeCaire T, Lindsell C, Smith E, D'Alessio D. Relationship of Prospective GHb to Glycated Serum Proteins in Incident Diabetic Retinopathy: Implications of the glycation gap for mechanism of risk prediction. *Diabetes care*. 1 févr 2008;31:151-3.
108. Nayak A, Singh B, Dunmore S. Potential Clinical Error Arising From Use of HbA1c in Diabetes: Effects of the Glycation Gap. *Endocrine Reviews*. 10 mai 2019;40.
109. Leslie RDG, Cohen RM. Biologic Variability in Plasma Glucose, Hemoglobin A1c, and Advanced Glycation End Products Associated with Diabetes Complications. *J Diabetes Sci Technol*. juill 2009;3(4):635-43.
110. Huang T, Ren J, Huang J, Li D. Association of homocysteine with type 2 diabetes: a meta-analysis implementing Mendelian randomization approach. *BMC Genomics*. 10 déc 2013;14(1):867.
111. Le T, Thanh K, Tran T, Nguyen D, Nguyen L, Pham D, et al. The Correlation Between Glycation Gap and Renal Complications in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*. 23 janv 2024;17:333-41.
112. Joung H, Kwon HS, Baek KH, Song KH, Kim M. Consistency of the Glycation Gap with the Hemoglobin Glycation Index Derived from a Continuous Glucose Monitoring System. *Endocrinology and Metabolism*. 30 juin 2020;35:377-83.
113. Organisation mondiale de la Santé – Profils des pays pour le diabète, 2016. Disponible sur: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/country-profiles/diabetes/dza-fr.pdf?sfvrsn=5ff1880_36&download=true
114. Dziedzic M, Petkowicz B, Michalak M, Solski J. Level of glycation gap in a healthy subject. *Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM*. 31 déc 2012;19:842-5.

115. Organisation mondiale de la Santé. Rapport mondial sur le diabète [Internet]. Genève: Organisation mondiale de la Santé; 2016. p86. Disponible sur: <https://iris.who.int/handle/10665/254648>
116. Kanaley JA, Colberg SR, Corcoran MH, Malin SK, Rodriguez NR, Crespo CJ, et al. Exercise/Physical Activity in Individuals with Type 2 Diabetes: A Consensus Statement from the American College of Sports Medicine. *Med Sci Sports Exerc.* 1 févr 2022;54(2):353-68.
117. Haute Autorité de Santé, Prescription d'activité physique et sportive Diabète de type 2. Saint-Denis La Plaine: HAS; Septembre 2018. ISBN : 978-2-11-172146-3
118. Organisation mondiale de la Santé. Obésité et diabète: une bombe à retardement [Internet]. [cité 21 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.who.int/fr/>
119. Rorive M, Letiexhe MR, Scheen AJ, Ziegler O. OBÉSITÉ ET DIABÈTE DE TYPE 2. *Rev Med Liege.*
120. Kim MK, Yun KJ, Kwon HS, Baek KH, Song KH. Discordance in the levels of hemoglobin A1C and glycated albumin: Calculation of the glycation gap based on glycated albumin level. *Journal of Diabetes and its Complications.* 1 avr 2016;30(3):477-81.
121. Cosson E, Chiheb S, Banu I, Pillegand C, Nguyen MT, Charnaux N, et al. PO23 Relation entre glycation gap et macroprotéinurie chez les diabétiques de type 2. *Diabetes & Metabolism.* mars 2012;38:A27.
122. Idiakheua OS. Relationship of the glycation gap to diabetes and its complications, and the potential role of adipokines. janv 2023 [cité 29 sept 2024]; Disponible sur: <https://wlv.aws.openrepository.com/handle/2436/625431>
123. Vergès B, Rouland A, Baillot-Rudoni S, Brindisi M, Duvillard L, Simoneau I, et al. Increased body fat mass reduces the association between fructosamine and glycated hemoglobin in obese type 2 diabetes patients. *J Diabetes Investig.* avr 2021;12(4):619-24.
124. Duration of diabetes and the risk of major cardiovascular events in women and men: A prospective cohort study of UK Biobank participants. *Diabetes Research and Clinical Practice.* 1 juin 2022;188:109899.
125. Huang L, Wu P, Zhang Y, Lin Y, Shen X, Zhao F, et al. Relationship between onset age of type 2 diabetes mellitus and vascular complications based on propensity score matching analysis. *J Diabetes Investig.* juin 2022;13(6):1062-72.
126. Yao X, Zhang J, Zhang X, Jiang T, Zhang Y, Dai F, et al. Age at diagnosis, diabetes duration and the risk of cardiovascular disease in patients with diabetes mellitus: a cross-sectional study. *Front Endocrinol (Lausanne).* 8 mai 2023;14:1131395.

127. Haute Autorité de Santé stratégie thérapeutique du patient vivant avec un diabète de type 2 - recommandations Mai 2024. - ISBN : 978-2-11-167529-2
128. Kim MK, Jeong JS, Kwon HS, Baek KH, Song KH. Concordance the hemoglobin glycation index with glycation gap using glycated albumin in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications*. juill 2017;31(7):1127-31.
129. Tahapary DL, Wafa S, Tricaesario C, Widjaja FF, Tandradynata J, Kurniawan R, et al. Chronic complications risk among type 2 diabetes patients with a family history of diabetes. *Chronic Diseases and Translational Medicine*. déc 2023;9(4):336.
130. Leslie R, Cohen R. Clinical Advances in Hemoglobin A1c Measurement: Biologic Variability in Plasma Glucose, Hemoglobin A1c, and Advanced Glycation End Products Associated with Diabetes Complications. *Journal of diabetes science and technology*. 1 juill 2009;3:635-43.
131. Cohen R, Snieder H, Lindsell C, Beyan H, Hawa M, Blinko S, et al. Evidence for Independent Heritability of the Glycation Gap (Glycosylation Gap) Fraction of HbA1c in Nondiabetic Twins. *Diabetes care*. 1 sept 2006;29:1739-43.
132. Sacks D, Nathan D, Lachin J. Gaps in the Glycation Gap Hypothesis. *Clinical chemistry*. 1 févr 2011;57:150-2.
133. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH. Discordance Between HbA1c and Fructosamine: Evidence for a glycosylation gap and its relation to diabetic nephropathy. *Diabetes Care*. 1 janv 2003;26(1):163-7.
134. National Institutes of Health (NIH) [Internet]. 2015 [cité 23 juill 2024]. A Better Test for Kidney Function. Disponible sur: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/better-test-kidney-function>
135. Freedman BI, Andries L, Shihabi ZK, Rocco MV, Byers JR, Cardona CY, et al. Glycated Albumin and Risk of Death and Hospitalizations in Diabetic Dialysis Patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. juill 2011;6(7):1635.
136. Mishra S, Das UK, Rattan R, Mandal MK, Baliarsingh AK. Study on Association of Glycation Gap in Diabetes Mellitus with Renal Complication. 2020;(11).
137. Nachi M, Kihel I, Dali-Ali A, Gourine M, Benrahal F. Profil glucido-lipidique et risque cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2. *Journal de la faculté de médecine d'Oran* 2022 ;6(2). 138. Ali Bey Z, Noui R, Aksas K. Implication des triglycérides dans le processus athérogène chez les patients diabétiques de type 2. *JAP*. 23 janv 2024;5(3):49-62.
139. Cao Y, Yan L, Guo N, Yu N, Wang Y, Cao X, et al. Non-high-density lipoprotein cholesterol and risk of cardiovascular disease in the general population and patients with

- type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract.* janv 2019;147:1-8.
140. S M, N N. RELIABLE MARKER OF ATHEROGENICITY IN TYPE 2 DM – A COMPARATIVE STUDY ON GLYCOSYLATION GAP AND HAEMOGLOBIN GLYCATION INDEX. *International Journal of Medical and Biomedical Studies.* 20 oct 2020;4.
 141. Regmi P, Baral B, Raut M, Khanal MP. Atherogenic index of plasma for prediction of future cardiovascular disease in prediabetes and diabetes population. *Atherosclerosis.* 1 sept 2016;252:e120.
 142. Marini MA, Fiorentino TV, Succurro E, Pedace E, Andreozzi F, Sciacqua A, et al. (2017) Association between hemoglobin glycation index with insulin resistance and carotid atherosclerosis in nondiabetic individuals. *PLoS ONE* 12(4): e0175547
 143. Platt DE, Hariri E, Salameh P, Merhi M, Sabbah N, Helou M, et al. Type II diabetes mellitus and hyperhomocysteinemia: a complex interaction. *Diabetology & Metabolic Syndrome.* 21 mars 2017;9(1):19.
 144. Wierzbicki AS. Homocysteine and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Diabetes and Vascular Disease Research.* 1 juin 2007;4(2):143-9.
 145. J. Pincemail, J. Siquet, J.-P. Chapelle, J.-P. Cheramy-Bien, G. Paulissen, A.-M. Chantillon, G. Christiaens, J. Gielen, R. Limet, J.-O. Defraigne - Determination of plasmatic concentrations in antioxidants, antibodies against oxidized LDL, and homocystein in a sampling of Liège population- *JLE Annales de biologie clinique-* Volume 58, issue 2, Mars - Avril 2000
 146. Jean-Louis Schlienger -Hyperuricémie chronique : Facteur ou marqueur de risque cardio-métabolique ? *Médecine des Maladies Métaboliques.* 1 mai 2016;10(3):280-284.
 147. Asma L. Paramètres du stress oxydant dans le diabète de type 2. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 18 (2003) 79–85- DOI: 10.1016/S0923-2532(03)00007-3

LES ANNEXES

ANNEXE 1: Le consentement

Consentement éclairé

Je, soussigné..... déclare
accepter, librement, et de façon éclairer, de participer comme sujet à l'étude
intitulée :.....

J'autorise Drà :

- Effectuer des dosages sanguins et urinaires
- Recueillir et consulter les données contenues dans mon dossier

L'enquêteur principal s'engage à préserver absolument la confidentialité et le secret professionnel pour toutes les informations concernant le participant et mener cette recherche selon les dispositions éthiques et déontologiques.

Le consentement pour poursuivre la recherche peut être retiré à tout moment sans donner de raison et sans encourir aucune responsabilité ni conséquence.

Fait à le..... en 2 exemplaires

Signatures :

Le participant

L'enquêteur principal

ANNEXE 2 : La fiche de renseignement

Nom : Age :

Prénom : N° Téléphone :

Sexe : H ☐ F ☐

Situation familiale: Marié(e) ☐ Célibataire ☐ Divorcé(e) ☐ veuf (ve) ☐

Niveau socio-professionnel :

- Haut fonctionnaire de l'état ☐
- Employé de l'état ☐
- Employé dans le secteur privé ☐
- fonction libérale ☐
- Ouvrier (e) ☐
- Femme au foyer ☐
- Retraité(e) ☐
- Chômeur (se) ☐

Niveau d'instruction :

- Jamais scolarisé ☐
- Ecole primaire ☐
- Collège ☐
- Lycée ou équivalent ☐
- Ecole supérieur, Université ☐

Paramètres anthropométriques :

- Poids:Kg Taille:cm
- Tour de taille :cm

Age de découverte du diabète (ou l'année) :

Traitement en cours: ADO ☐ , Monothérapie ☐ Bithérapie ☐ Trithérapie ☐

Insuline ☐

Insuline et ADO ☐

- Autres TRT:.....

Activité physique : sédentaire ☐ sport (2à 3 fois/sem) ☐ marche 30min/jr ☐

Activité domestique et/ou professionnelle ☐

Statut tabagique :

Fumeurs ? Non, jamais ☐

Oui ☐

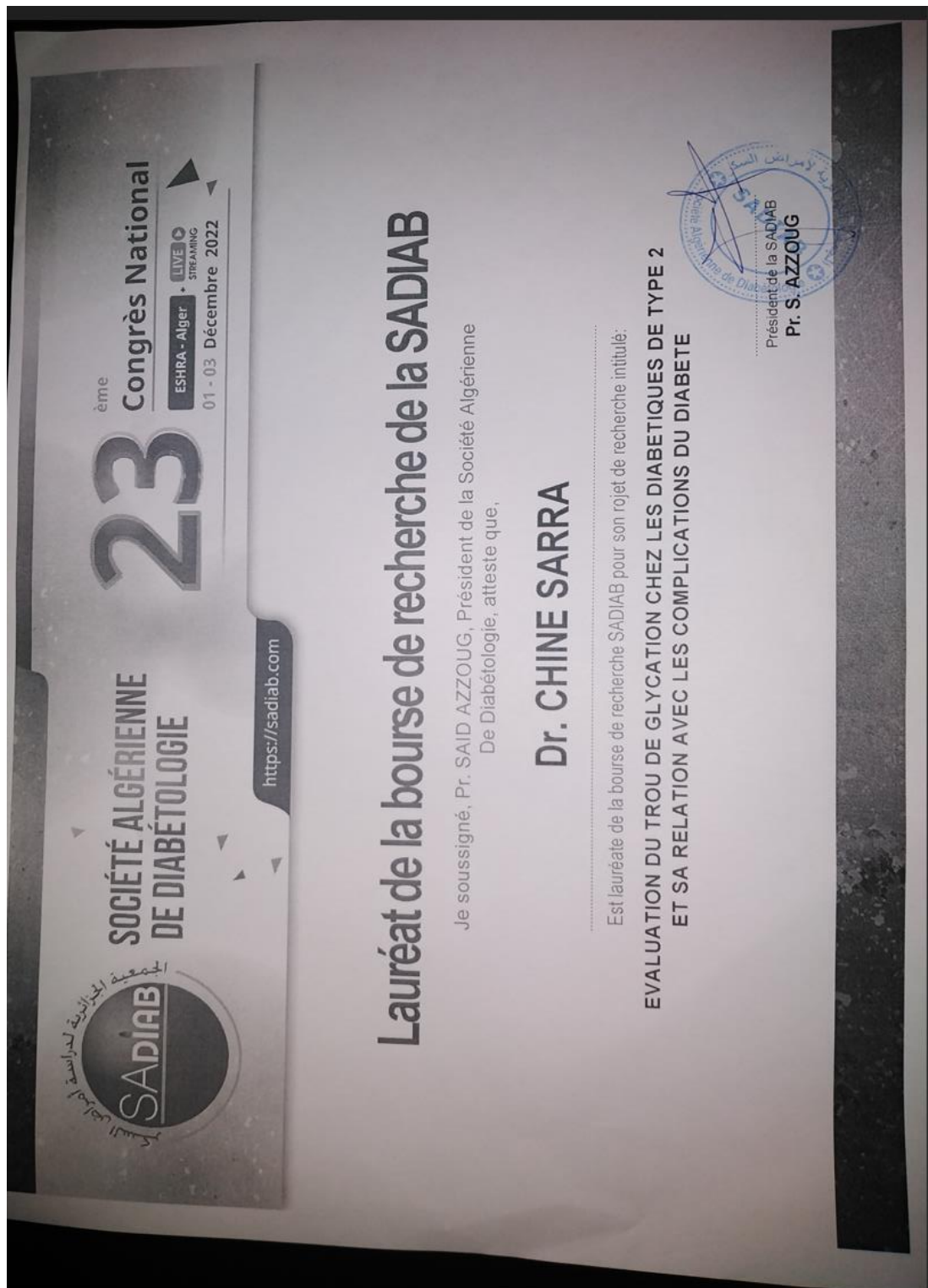
Les Complications diabétiques : Oui ☐

Non ☐

Les antécédents médicaux familiaux :**➤ Diabète :**

- ☐ Non
- ☐ Oui, un membre de la famille plus éloignée : un grands-parents, une tante, un oncle, un(e) cousin(e).
- ☐ Oui, un membre de la famille proche : un père, une mère, un enfant, un frère, une soeur...

ANNEXE 3: Le financement SADIAB



CONVENTION DE FINANCEMENT D'UN PROJET DE RECHERCHE PAR LA SOCIÉTÉ ALGÉRIENNE DE DIABÉTOLOGIE SADIAB

Entre :

Partie 1 : Service de Biochimie, CHU Annaba Ibn Sina

Adresse : Annaba

Représentée par le Professeur Chef de Service BENHARKAT SADEK

Partie 2 : Société Algérienne de Diabétologie (SADIAB)]

Représentée par le président de la SADIAB, Le Professeur AZZOUG SAID

Adresse : Hôpital Mustapha Bacha Alger

Partie 3 : SARL DIMED

Représentée par Monsieur BENAMARA TAHAR

Adresse ZONE INDUSTRIELLE LOT 83 BOUED SMAR ALGER

Il est convenu ce qui suit :

1. Objet de la convention :

Les parties conviennent de collaborer à un projet de recherche intitulé "EVALUATION DU TROU DE GLYCATION CHEZ LES DIABÉTIQUES DE TYPE 2 ET SA RELATION AVEC LES COMPLICATIONS DU DIABÈTE", qui sera réalisé par le Docteur CHINE SARRA, maître-assistante en Biochimie au CHU IBN-SINA à Annaba dans le cadre d'une thèse de doctorat en sciences médicales (DSM).

Les objectifs du projet :

Objectif principal :

- Evaluer le trou de glycation chez les diabétiques de type 2
- o Objectifs secondaires :
 - Etablir, chez les diabétiques de types 2, la relation entre le trou de glycation et :
 - Les complications cardio-vasculaires
 - Les complications rénales.
 - Améliorer la prise en charge des sujets diabétiques de type 2 en fonction de leur niveau de glycation.

2. Les parties impliquées

Les parties impliquées dans la convention sont les suivantes :

- Partie 1 : Service de Biochimie, CHU Annaba Ibn Sina
- Partie 2 : Société Algérienne de Diabétologie (SADIAB)
- Partie 3 : SARL DIMED

La partie 2 s'engage à financer le projet de recherche à hauteur de [1 500 000 DA], versé selon les modalités suivantes :

- Modalités de versement des fonds : par chèque
- Échéances et délais de versement : après réception du matériel, avant la fin de l'année 2023.
- Matériel : réactifs de laboratoire nécessaires pour la réalisation du projet

La partie 3 s'engage à fournir le matériel (les réactifs) nécessaire à la réalisation du projet. La partie 3 est responsable de la qualité du matériel fourni et de sa mise à disposition à la partie 1 pour la réalisation du projet.

3. Propriété intellectuelle

Les parties conviennent que les droits de propriété intellectuelle sur les résultats de la recherche seront détenus par la partie 1.

4. Responsabilités

Chaque partie est responsable de ses propres actions et de ses propres erreurs, y compris les dommages résultant de leur propre négligence. La partie 1 est responsable de la réalisation du projet dans les règles de l'art et du respect des normes éthiques et de sécurité. La partie 2 est responsable de la gestion des fonds alloués et de leur utilisation conforme aux termes de la convention. La partie 3 est responsable de la mise à disposition de l'équipement et de sa qualité.

5. Durée de la convention

La convention prend effet à compter de la date de signature et s'achève à l'achèvement du projet, prévu pour la fin de l'année 2023.

6. Résiliation

La convention peut être résiliée par consentement mutuel des parties ou en cas de manquement grave à l'une des obligations contractuelles par l'une des parties. La partie souhaitant résilier la convention doit notifier par écrit les autres parties, avec un préavis de 30 jours.

7. Litiges

Tout litige découlant de la présente convention sera résolu par voie de négociation amiable entre les parties. Si une solution amiable n'est pas trouvée, le litige sera porté devant la juridiction compétente.

8. Signatures :

Pr AZZOUG (SADIAB)

Pr BENHARKAT SADEK

Service de Biochimie CHU ANNAB

Mr BENAMAR TAHAR (SARL DIMEO)

The image shows three handwritten signatures and two official stamps. The first signature is for Pr AZZOUG (SADIAB). The second signature is for Pr BENHARKAT SADEK, with a rectangular stamp from the 'Laboratoire de Biochimie CHU ANNAB' placed over it. The third signature is for Mr BENAMAR TAHAR (SARL DIMEO), with a circular blue stamp from 'SARL DIMEO' placed over it. To the right of the circular stamp is the printed name 'BENAMARA Tahar' followed by 'Gérant'.

ANNEXE 4 : Fiche technique du glucose

GLUC3

Glucose HK

cobas®

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
04404483 190	Glucose HK (800 tests)	System-ID 07 6831 6 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
04489357190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:**GLUC3**: ACN 717**SGLU3**: ACN 668 (STAT, reaction time: 7)For **cobas c** 502 analyzer:**GLUC3**: ACN 8717**SGLU3**: ACN 8668 (STAT, reaction time: 7)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of glucose in human serum, plasma, urine and CSF on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3}

Glucose is the major carbohydrate present in the peripheral blood. Oxidation of glucose is the major source of cellular energy in the body. Glucose derived from dietary sources is converted to glycogen for storage in the liver or to fatty acids for storage in adipose tissue. The concentration of glucose in blood is controlled within narrow limits by many hormones, the most important of which are produced by the pancreas.

The most frequent cause of hyperglycemia is diabetes mellitus resulting from a deficiency in insulin secretion or action. A number of secondary factors also contribute to elevated blood glucose levels. These include pancreatitis, thyroid dysfunction, renal failure and liver disease.

Hypoglycemia is less frequently observed. A variety of conditions may cause low blood glucose levels such as insulinoma, hypopituitarism or insulin induced hypoglycemia. Glucose measurement in urine is used as a diabetes screening procedure and to aid in the evaluation of glycosuria, to detect renal tubular defects, and in the management of diabetes mellitus. Glucose measurement in cerebrospinal fluid is used for evaluation of meningitis, neoplastic involvement of meninges and other neurological disorders.

Test principle

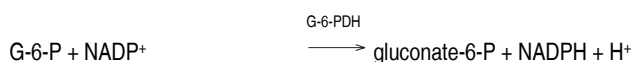
UV test

Enzymatic reference method with hexokinase.^{4,5}

Hexokinase catalyzes the phosphorylation of glucose to glucose-6-phosphate by ATP.



Glucose-6-phosphate dehydrogenase oxidizes glucose-6-phosphate in the presence of NADP to gluconate-6-phosphate. No other carbohydrate is oxidized. The rate of NADPH formation during the reaction is directly proportional to the glucose concentration and is measured photometrically.



Reagents - working solutions

R1 MES buffer: 5.0 mmol/L, pH 6.0; Mg²⁺: 24 mmol/L;
ATP: ≥ 4.5 mmol/L; NADP: ≥ 7.0 mmol/L; preservative

R2 HEPES buffer: 200 mmol/L, pH 8.0; Mg²⁺: 4 mmol/L; HK (yeast): ≥ 300 µkat/L; G-6-PDH (E. coli): ≥ 300 µkat/L; preservative

R1 is in position B and R2 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines.

Safety data sheet available for professional user on request.

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

GLUC3

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 8 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable. Serum.

Plasma: Li-heparin, K₂-EDTA, NaF/Na₂EDTA, KF/Na₂EDTA, NaF/K-Oxalate and NaF/citrate/Na₂-EDTA.

The stability of glucose in specimens is affected by storage temperature, bacterial contamination, and glycolysis. Plasma or serum samples without preservative (NaF) should be separated from the cells or clot within half an hour of being drawn. When blood is drawn and permitted to clot and to stand uncentrifuged at room temperature, the average decrease in serum glucose is ~ 7 % in 1 hour (0.28 to 0.56 mmol/L or 5 to 10 mg/dL). This decrease is the result of glycolysis. Glycolysis can be inhibited by collecting the specimen in fluoride tubes.¹

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Stability:⁵ 8 hours at 15-25 °C

72 hours at 2-8 °C

Stability in fluoride plasma:⁶ 3 days at 15-25 °C

Urine:

GLUC3

Glucose HK



Collect urine in a dark bottle. For 24-hour urine collections, glucose may be preserved by adding 5 mL of glacial acetic acid to the container before collection. Unpreserved urine samples may lose up to 40 % of their glucose after 24-hour storage at room temperature.³ Therefore, keep samples on ice during collection.⁵

CSF:

Cerebrospinal fluid may be contaminated with bacteria and often contains other cellular constituents. CSF samples should therefore be analyzed for glucose immediately or stored at 4 °C or -20 °C.^{3,5}

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum, plasma, urine and CSF

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 6-32 (STAT 7 / 6-32)	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	28 µL	141 µL
R2	10 µL	20 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	10 µL	15 µL	135 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 10-47 (STAT 7 / 10-47)	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	28 µL	141 µL
R2	10 µL	20 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	10 µL	15 µL	135 µL

Increased	2 µL	–	–
-----------	------	---	---

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 10-47 (STAT 7 / 10-47)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	28 µL	141 µL	
R2	10 µL	20 µL	

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	10 µL	15 µL	135 µL
Increased	4 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O
	S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration
	- after reagent lot change
	- as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against ID/MS.

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors:	mmol/L x 18.02 = mg/dL
	mmol/L x 0.1802 = g/L
	mg/dL x 0.0555 = mmol/L

Limitations - interference

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value at a glucose concentration of 3.9 mmol/L (70.3 mg/dL).

Serum/plasma

Icterus:⁷ No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 µmol/L or 60 mg/dL).

Hemolysis:⁷ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 621 µmol/L or 1000 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):⁷ No significant interference up to an L index of 1000. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{8,9}

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹⁰

Urine

Urea: No significant interference from urea up to a concentration of 1800 mmol/L (10811 mg/dL).

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.⁹

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

NOTE: Glucose values achieved on some proficiency testing materials, when evaluated against a glucose oxidase-oxygen electrode comparison method, demonstrate an approximate 3 % positive bias on average.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCin1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

Serum, plasma, urine and CSF

0.11-41.6 mmol/L (2-750 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

0.11 mmol/L (2 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Limit of Blank = 0.11 mmol/L (2 mg/dL)

Limit of Detection = 0.11 mmol/L (2 mg/dL)

Limit of Quantitation = 0.11 mmol/L (2 mg/dL)

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from n ≥ 60 measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is the lowest analyte concentration that can be reproducibly measured with a total error of 20 %. It has been determined using low concentration glucose samples.

Expected values

Plasma¹¹

Fasting 4.11-6.05 mmol/L (74-109 mg/dL)

Urine¹²

1st morning urine 0.3-1.1 mmol/L (6-20 mg/dL)

24-hour urine 0.3-0.96 mmol/L (6-17 mg/dL)
(average of 1350 mL urine/24 h)

acc. to Tietz:⁵

Serum, plasma

Adults 4.11-5.89 mmol/L (74-106 mg/dL)

60-90 years 4.56-6.38 mmol/L (82-115 mg/dL)

> 90 years 4.16-6.72 mmol/L (75-121 mg/dL)

Children 3.33-5.55 mmol/L (60-100 mg/dL)

Neonates (1 day) 2.22-3.33 mmol/L (40-60 mg/dL)

Neonates (> 1 day) 2.78-4.44 mmol/L (50-80 mg/dL)

Urine

24-hour urine < 2.78 mmol/24 h (< 0.5 g/24 h)

Random urine 0.06-0.83 mmol/L (1-15 mg/dL)

CSF

Children 3.33-4.44 mmol/L (60-80 mg/dL)

Adults 2.22-3.89 mmol/L (40-70 mg/dL)

CSF glucose values should be approximately 60 % of the plasma values and must always be compared with concurrently measured plasma values for adequate clinical interpretation.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol serum/plasma: with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days); urine/CSF: with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 10 days). The following results were obtained:

Serum/plasma

Repeatability	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm U	5.49 (98.9)	0.05 (0.9)	1.0
Precipath U	13.6 (245)	0.1 (2)	0.9
Human serum 1	7.74 (139)	0.05 (1)	0.7
Human serum 2	5.41 (97.5)	0.04 (0.7)	0.7

Intermediate precision

	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm U	5.38 (96.9)	0.07 (1.3)	1.3
Precipath U	13.4 (241)	0.2 (2)	1.1
Human serum 3	7.61 (137)	0.09 (2)	1.2
Human serum 4	5.28 (95.1)	0.06 (1.1)	1.1

Urine

Repeatability	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Control Level 1	1.54 (27.8)	0.02 (0.4)	1.1
Control Level 2	15.7 (283)	0.1 (2)	0.9
Human urine 1	5.00 (90.1)	0.05 (0.9)	1.0
Human urine 2	10.5 (189)	0.1 (2)	1.1

GLUC3

Glucose HK

cobas®

<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>%</i>
Control Level 1	1.51 (27.2)	0.01 (0.2)	1.0
Control Level 2	15.4 (278)	0.1 (2)	0.8
Human urine 3	4.86 (87.6)	0.05 (0.9)	1.0
Human urine 4	10.3 (186)	0.1 (2)	0.8
<i>CSF</i>			

<i>Repeatability</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>%</i>
Precinorm U	5.43 (97.8)	0.04 (0.7)	0.8
Precipath U	13.6 (245)	0.1 (2)	0.8
Human CSF 1	3.04 (54.8)	0.03 (0.5)	0.9
Human CSF 2	8.43 (152)	0.08 (1)	1.0

<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>mmol/L (mg/dL)</i>	<i>%</i>
Precinorm U	5.37 (96.8)	0.07 (1.3)	1.3
Precipath U	13.4 (241)	0.2 (4)	1.1
Human CSF 3	3.00 (54.1)	0.04 (0.7)	1.5
Human CSF 4	8.30 (150)	0.10 (2)	1.2

Method comparison

Glucose values for human serum, plasma, urine and CSF samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c 501** analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi MODULAR P analyzer (x).

Serum/plasma

Sample size (n) = 75

Passing/Bablok ¹³	Linear regression
$y = 1.000x + 0.118 \text{ mmol/L}$	$y = 0.996x + 0.179 \text{ mmol/L}$
$r = 0.983$	$r = 1.000$

The sample concentrations were between 1.64 and 34.1 mmol/L (28.8 and 614 mg/dL).

Urine

Sample size (n) = 75

Passing/Bablok ¹³	Linear regression
$y = 1.000x + 0.060 \text{ mmol/L}$	$y = 1.001x + 0.045 \text{ mmol/L}$
$r = 0.972$	$r = 1.000$

The sample concentrations were between 0.16 and 39.5 mmol/L (2.88 and 712 mg/dL).

CSF

Sample size (n) = 75

Passing/Bablok ¹³	Linear regression
$y = 1.000x - 0.020 \text{ mmol/L}$	$y = 1.001x - 0.038 \text{ mmol/L}$
$r = 0.980$	$r = 1.000$

The sample concentrations were between 0.92 and 38.0 mmol/L (16.6 and 685 mg/dL).

References

- 1 Sacks DB. Carbohydrates. In: Tietz NW, ed. Fundamentals of Clinical Chemistry. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders 1996;351-374.
- 2 Knudson PE, Weinstock RS. Carbohydrates. In: Henry JB, ed. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20th ed. Philadelphia: WB Saunders 2001;211-223.

- 3 Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders 1999;750-785.
- 4 Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J. In: Bergmeyer. Methods of Enzymatic Analysis, 3rd ed. Volume VI, Metabolites 1: Carbohydrates 1984;163-172.
- 5 Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders Co 2006;444-451.
- 6 Tietz NW. Fundamentals of Clinical Chemistry, 6th ed. Saunders Elsevier 2008;389.
- 7 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 8 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 9 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 10 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 11 Thomas L, ed. Blutglucose. In: Thomas L, ed. Labor und Diagnose, 6th ed. Frankfurt/Main: TH-Books 2005;193-199.
- 12 Krieg M, Gunsser KJ, Steinhagen-Thiessen E, et al. Comparative quantitative clinico-chemical analysis of the characteristics of 24-hour urine and morning urine. J Clin Chem Clin Biochem 1986 Nov;24(11):863-869.
- 13 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2018, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



ANNEXE 5: Fiche technique de la créatinine

CREJ2

Creatinine Jaffé Gen.2

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
04810716 190	Creatinine Jaffé Gen.2 (700 tests) System ID 07 6928 2	Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL) Code 401	
10759350 360	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL, for USA) Code 401	
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL) Code 300	
12149435 160	Precinorm U plus (10 x 3 mL, for USA) Code 300	
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL) Code 301	
12149443 160	Precipath U plus (10 x 3 mL, for USA) Code 301	
03121313 122	Precinorm PUC (4 x 3 mL) Code 240	
03121291 122	Precipath PUC (4 x 3 mL) Code 241	
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL) Code 391	
05947626 160	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL, for USA) Code 391	
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL) Code 391	
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL) Code 392	
05947774 160	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL, for USA) Code 392	
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL) Code 392	
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL) System-ID 07 6869 3	

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

CREJ2: ACN 690 (Rate blanked, compensated, serum and plasma)

CRJ2U: ACN 691 (Rate blanked, urine)

SCRE2: ACN 773 (STAT, compensated, serum and plasma, reaction time: 4)

SCR2U: ACN 774 (STAT, urine, reaction time: 4)

For **cobas c** 502 analyzer:

CREJ2: ACN 8690 (Rate blanked, compensated, serum and plasma)

CRJ2U: ACN 8691 (Rate blanked, urine)

SCRE2: ACN 8773 (STAT, compensated, serum and plasma, reaction time: 4)

SCR2U: ACN 8774 (STAT, urine, reaction time: 4)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of creatinine in human serum, plasma and urine on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3,4,5}

Chronic kidney disease is a worldwide problem that carries a substantial risk for cardiovascular morbidity and death. Current guidelines define chronic kidney disease as kidney damage or glomerular filtration rate (GFR) less than 60 mL/min per 1.73 m² for three months or more, regardless of cause.

The assay of creatinine in serum or plasma is the most commonly used test to assess renal function. Creatinine is a break-down product of creatine phosphate in muscle, and is usually produced at a fairly constant rate by the body (depending on muscle mass). It is freely filtered by the glomeruli and, under normal conditions, is not re-absorbed by the tubules to any appreciable extent. A small but significant amount is also actively secreted.

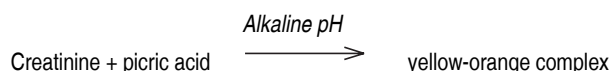
Since a rise in blood creatinine is observed only with marked damage of the nephrons, it is not suited to detect early stage kidney disease. A considerably more sensitive test and better estimation of glomerular filtration rate (GFR) is given by the creatinine clearance test based on creatinine's concentration in urine and serum or plasma, and urine flow rate. For this test a precisely timed urine collection (usually 24 hours) and a blood sample are needed. However, since this test is prone to error due to the inconvenient collection of timed urine, mathematical attempts to estimate GFR based only on the creatinine concentration in serum or plasma have been made. Among the various approaches suggested, two have found wide recognition: that of Cockcroft and Gault and that based on the results of the MDRD trial. While the first equation was derived from data

obtained with the conventional Jaffé method, a newer version of the second is usable for IDMS-traceable creatinine methods. Both are applicable for adults. In children, the Bedside Schwartz formula should be used.^{6,7,8,9}

In addition to the diagnosis and treatment of renal disease, the monitoring of renal dialysis, creatinine measurements are used for the calculation of the fractional excretion of other urine analytes (e. g., albumin, α -amylase). Numerous methods were described for determining creatinine. Automated assays established in the routine laboratory include the Jaffé alkaline picrate method in various modifications, as well as enzymatic tests.

Test principle^{10,11,12}

This kinetic colorimetric assay is based on the Jaffé method. In alkaline solution, creatinine forms a yellow-orange complex with picrate. The rate of dye formation is proportional to the creatinine concentration in the specimen. The assay uses "rate-blanking" to minimize interference by bilirubin. To correct for non-specific reaction caused by serum/plasma pseudo-creatinine chromogens, including proteins and ketones, the results for serum or plasma are corrected by -26 μ mol/L (-0.3 mg/dL).



Reagents - working solutions

R1 Potassium hydroxide: 900 mmol/L; phosphate: 135 mmol/L; pH $\geq$ 13.5; preservative; stabilizer

R3 (STAT R2) Picric acid: 38 mmol/L; pH 6.5; non reactive buffer

R1 is in position B and R3 (STAT R2) is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

For USA: Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Prevention:

P273 Avoid release to the environment.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

Response:P301 + P330 IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
+ P311P303 + P361 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated
+ P353 clothing. Rinse skin with water.P304 + P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep
+ P310 comfortable for breathing.
Immediately call a POISON CENTER/ doctor.P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several
+ P338 minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.
+ P310 Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/
doctor.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590, USA: 1-800-428-2336

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability**CREJ2**Shelf life at 15-25 °C: See expiration date
on **cobas c** pack
label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 8 weeks

Diluent NaCl 9 %Shelf life at 2-8 °C: See expiration date
on **cobas c** pack
label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation¹³For specimen collection and preparation only use suitable tubes or
collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum.

Plasma: Li-heparin and K₂-EDTA plasma.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Urine.

Collect urine without using additives. If urine must be collected with a preservative for other analytes, only hydrochloric acid (14 to 47 mmol/L

urine, e.g. 5 mL 10 % HCl or 5 mL 30 % HCl per liter urine) or boric acid (81 mmol/L, e.g. 5 g per liter urine) may be used.

Stability in *serum/plasma*:¹⁴ 7 days at 15-25 °C
7 days at 2-8 °C
3 months at (-15)-(-25) °C

Stability in *urine* (without preservative):¹⁴ 2 days at 15-25 °C
6 days at 2-8 °C
6 months at (-15)-(-25) °C

Stability in *urine* (with preservative): 3 days at 15-25 °C
8 days at 2-8 °C
3 weeks at (-15)-(-25) °C

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay. See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Sample stability claims were established by experimental data by the manufacturer or based on reference literature and only for the temperatures/time frames as stated in the method sheet. It is the responsibility of the individual laboratory to use all available references and/or its own studies to determine specific stability criteria for its laboratory.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma**cobas c 311 test definition**

Assay type	Rate A	
Reaction time / Assay points	10 / 27-37 - 15-23 (STAT 4 / 12-19)	
Wavelength (sub/main)	570/505 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	µmol/L (mg/dL, mmol/L)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	13 µL	77 µL
R3	17 µL	30 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	10 µL	–	–
Decreased	10 µL	20 µL	80 µL
Increased	10 µL	–	–

Enter the correction value for the non-specific protein reaction as the instrument factor $y = ax + b$ for mg/dL or for µmol/L, where $a = 1.0$ and $b = -0.3$ (mg/dL) or $a = 1.0$ and $b = -26$ (µmol/L).

CREJ2

Creatinine Jaffé Gen.2

cobas®**cobas c 501/502 test definition**

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 42-52 - 24-34 (STAT 4 / 17-27)
Wavelength (sub/main)	570/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	μmol/L (mg/dL, mmol/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	13 μL 77 μL
R3	17 μL 30 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	10 μL	–	–
Decreased	10 μL	20 μL	80 μL
Increased	10 μL	–	–

Enter the correction value for the non-specific protein reaction as the instrument factor $y = ax + b$ for mg/dL or for μmol/L, where $a = 1.0$ and $b = -0.3$ (mg/dL) or $a = 1.0$ and $b = -26$ (μmol/L).

Application for urine**cobas c 311 test definition**

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 27-37 - 15-23 (STAT 4 / 12-19)
Wavelength (sub/main)	570/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	μmol/L (mg/dL, mmol/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	13 μL 77 μL
R3	17 μL 30 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	10 μL	6 μL	144 μL
Decreased	10 μL	2 μL	180 μL
Increased	10 μL	6 μL	144 μL

cobas c 501 test definition

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 42-52 - 24-34 (STAT 4 / 17-27)
Wavelength (sub/main)	570/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	μmol/L (mg/dL, mmol/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	13 μL 77 μL
R3	17 μL 30 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution
----------------	--------	-----------------

		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	10 μL	6 μL	144 μL
Decreased	10 μL	2 μL	180 μL
Increased	10 μL	6 μL	144 μL

cobas c 502 test definition

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 42-52 - 24-34 (STAT 4 / 17-27)
Wavelength (sub/main)	570/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	μmol/L (mg/dL, mmol/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	13 μL 77 μL
R3	17 μL 30 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	10 μL	6 μL	144 μL
Decreased	10 μL	2 μL	180 μL
Increased	10 μL	10 μL	115 μL

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration • after reagent lot change • as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against ID/MS.

For the USA, this method has been standardized against a primary reference material (SRM 914 and SRM 967 (ID/MS)).

Quality control**Serum/plasma**

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

Urine

For quality control, use Precinorm PUC and Precipath PUC as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors: μmol/L x 0.0113 = mg/dL

$\mu\text{mol/L} \times 0.001 = \text{mmol/L}$

Limitations – interference

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at a creatinine concentration of $80 \mu\text{mol/L}$ (0.90 mg/dL) in serum/plasma and $2500 \mu\text{mol/L}$ (28.3 mg/dL) in urine.

Serum/plasma

Icterus (**CREJ2**):¹⁵ No significant interference up to an I index of 5 for conjugated bilirubin and 10 for unconjugated bilirubin (approximate conjugated bilirubin concentration: $86 \mu\text{mol/L}$ or 5 mg/dL ; approximate unconjugated bilirubin concentration: $171 \mu\text{mol/L}$ or 10 mg/dL).

Icterus (**SCRE2**):¹⁵ No significant interference up to an I index of 2 for conjugated bilirubin and 3 for unconjugated bilirubin (approximate conjugated bilirubin concentration: $34 \mu\text{mol/L}$ or 2 mg/dL ; approximate unconjugated bilirubin concentration: $51 \mu\text{mol/L}$ or 3 mg/dL).

Hemolysis:¹⁵ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: $621 \mu\text{mol/L}$ or 1000 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹⁵ No significant interference up to an L index of 800. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Pyruvate: No significant interference from pyruvate up to a concentration of 0.3 mmol/L (2.6 mg/dL).

Glucose: No significant interference from glucose up to a concentration of 25 mmol/L (450 mg/dL).

Ascorbic acid: No significant interference from ascorbic acid up to a concentration of 5 mmol/L (88 mg/dL).

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{16,17}

Exception: Antibiotics containing cephalosporin lead to significant false-positive values.^{18,19}

Exception: Cefoxitin causes artificially high creatinine results.

Exception: Cyanokit (Hydroxocobalamin) may cause interference with results.

Values $< 15 \mu\text{mol/L}$ ($< 0.17 \text{ mg/dL}$) or negative results are reported in rare cases in children < 3 years and in elderly patients. In such cases use the Creatinine plus test to assay the sample.

Do not use Creatinine Jaffé for the testing of creatinine in hemolyzed samples from neonates, infants or adults with HbF levels $\geq 60 \text{ mg/dL}$ for **CREJ2** applications ($\geq 30 \text{ mg/dL}$ for **SCRE2** applications).²⁰ In such cases, use the Creatinine plus test ($\leq 600 \text{ mg/dL}$ HbF) to assay the sample.

Estimation of the Glomerular Filtration Rate (GFR) on the basis of the Schwartz Formula can lead to an overestimation.²¹

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.²²

The presence of ketone bodies can cause artificially high results in serum and plasma.

Urine

Icterus: No significant interference up to a conjugated bilirubin concentration of $855 \mu\text{mol/L}$ or 50 mg/dL .

Hemolysis: No significant interference up to a hemoglobin concentration of $621 \mu\text{mol/L}$ or 1000 mg/dL .

Glucose: No significant interference from glucose up to a concentration of 120 mmol/L (2162 mg/dL).

Urea: No significant interference from urea up to a concentration of 2100 mmol/L (12612 mg/dL).

Urobilinogen: No significant interference from urobilinogen up to a concentration of $676 \mu\text{mol/L}$ (40 mg/dL).

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.¹⁷

Exception: Cyanokit (Hydroxocobalamin) may cause interference with results.

High homogentisic acid concentrations in urine samples lead to false results.

The presence of ketone bodies can cause artificially high results in urine.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges**Measuring range****Serum/plasma**

$15\text{--}2200 \mu\text{mol/L}$ ($0.17\text{--}24.9 \text{ mg/dL}$)

The technical limit in the instrument setting is defined as $41\text{--}2226 \mu\text{mol/L}$ ($0.463\text{--}25.2 \text{ mg/dL}$) due to the compensation factor of 26.

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:5 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 5.

Urine

$375\text{--}55000 \mu\text{mol/L}$ ($4.2\text{--}622 \text{ mg/dL}$)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:3.6 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 3.6.

Lower limits of measurement**Limit of Blank and Limit of Detection****Serum/plasma (CREJ2)**

Limit of Blank = $15 \mu\text{mol/L}$ (0.17 mg/dL)

Limit of Detection = $15 \mu\text{mol/L}$ (0.17 mg/dL)

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

Lower detection limit of the test**Serum/plasma (SCRE2)**

$15 \mu\text{mol/L}$ (0.17 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, $n = 21$).

Urine (CRJ2U/SCR2U)

$375 \mu\text{mol/L}$ (4.2 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, $n = 21$).

Expected values**Serum/plasma****Adults²³**

Females	$44\text{--}80 \mu\text{mol/L}$	($0.50\text{--}0.90 \text{ mg/dL}$)
Males	$62\text{--}106 \mu\text{mol/L}$	($0.70\text{--}1.20 \text{ mg/dL}$)

Children²⁴

Neonates (premature)	$25\text{--}91 \mu\text{mol/L}$	($0.29\text{--}1.04 \text{ mg/dL}$)
----------------------	---------------------------------	---------------------------------------

Neonates (full term)	21-75 µmol/L	(0.24-0.85 mg/dL)
2-12 m	15-37 µmol/L	(0.17-0.42 mg/dL)
1- < 3 y	21-36 µmol/L	(0.24-0.41 mg/dL)
3- < 5 y	27-42 µmol/L	(0.31-0.47 mg/dL)
5- < 7 y	28-52 µmol/L	(0.32-0.59 mg/dL)
7- < 9 y	35-53 µmol/L	(0.40-0.60 mg/dL)
9- < 11 y	34-65 µmol/L	(0.39-0.73 mg/dL)
11- < 13 y	46-70 µmol/L	(0.53-0.79 mg/dL)
13- < 15 y	50-77 µmol/L	(0.57-0.87 mg/dL)

Urine**1st morning urine²³**

Females	2470-19200 µmol/L	(28-217 mg/dL)
Males	3450-22900 µmol/L	(39-259 mg/dL)

24-hour urine²⁵

Females	7000-14000 µmol/24 h	(740-1570 mg/24 h)
Males	9000-21000 µmol/24 h	(1040-2350 mg/24 h)

Creatinine clearance^{25,26} 71-151 mL/minRefer to reference for a prospective study on creatinine clearance in children.²⁷

Roche has not evaluated reference ranges in a pediatric population.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

PrecisionPrecision was determined using human samples and controls in an internal protocol. *Serum/plasma*: repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days); *Urine*: repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 10 days). The following results were obtained:**Serum/plasma (CREJ2)**

Repeatability	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	105 (1.19)	2 (0.03)	2.1
Precipath U	360 (4.07)	4 (0.05)	1.1
Human serum 1	206 (2.33)	3 (0.03)	1.2
Human serum 2	422 (4.77)	5 (0.06)	1.3

Intermediate precision	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	101 (1.14)	4 (0.05)	3.5
Precipath U	351 (3.97)	8 (0.09)	2.2
Human serum 3	201 (2.27)	5 (0.06)	2.5
Human serum 4	411 (4.64)	9 (0.10)	2.2

Urine (CRJ2U)

Repeatability	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Control Level 1	8083 (91.3)	115 (1.3)	1.4

Control Level 2	15618 (177)	213 (2)	1.4
Human urine 1	19318 (218)	234 (3)	1.2
Human urine 2	7958 (89.9)	130 (1.5)	1.6
Intermediate precision	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Control Level 1	8130 (91.9)	164 (1.9)	2.0
Control Level 2	15533 (176)	251 (3)	1.6
Human urine 3	19353 (219)	385 (4)	2.0
Human urine 4	7932 (89.6)	166 (1.9)	2.1

Serum/plasma (SCRE2)

Repeatability	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	106 (1.20)	2 (0.02)	2.2
Precipath U	346 (3.91)	5 (0.06)	1.5
Human serum 1	543 (6.14)	6 (0.07)	1.1
Human serum 2	69 (0.78)	2 (0.02)	3.1

Intermediate precision	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	100 (1.13)	4 (0.05)	4.0
Precipath U	334 (3.77)	10 (0.11)	3.0
Human serum 3	522 (5.90)	12 (0.14)	2.4
Human serum 4	64 (0.72)	3 (0.03)	5.0

Urine (SCR2U)

Repeatability	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Control Level 1	6287 (71.0)	82 (0.9)	1.2
Control Level 2	15252 (172)	182 (2)	1.2
Human urine 1	24174 (273)	212 (2)	0.9
Human urine 2	2146 (24.2)	48 (0.5)	2.2

Intermediate precision	Mean	SD	CV
	µmol/L (mg/dL)	µmol/L (mg/dL)	%
Control Level 1	6943 (78.5)	114 (1.3)	1.6
Control Level 2	15394 (174)	229 (3)	1.5
Human urine 3	24230 (274)	354 (4)	1.5
Human urine 4	2184 (24.7)	54 (0.6)	2.5

Method comparisonCreatinine values for human serum, plasma and urine samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined on Roche/Hitachi 917/MODULAR P analyzers (x), using the corresponding Roche/Hitachi reagent.**Serum/plasma (CREJ2)**

Sample size (n) = 273

Passing/Bablok ²⁸	Linear regression
y = 1.000x - 0.653 µmol/L	y = 1.002x - 0.978 µmol/L
τ = 0.973	r = 0.999

The sample concentrations were between 38 and 2178 µmol/L (0.429 and 24.6 mg/dL).

Urine (CRJ2U)

Sample size (n) = 223

Passing/Bablok²⁸

$$y = 0.999x + 20.7 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.969$$

The sample concentrations were between 934 and 50228 $\mu\text{mol/L}$ (10.6 and 568 mg/dL).

Serum/plasma (SCRE2)

Sample size (n) = 224

Passing/Bablok²⁸

$$y = 1.000x - 14.4 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.964$$

The sample concentrations were between 66 and 1775 $\mu\text{mol/L}$ (0.746 and 20.1 mg/dL).

Urine (SCR2U)

Sample size (n) = 223

Passing/Bablok²⁸

$$y = 0.999x + 67.8 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.973$$

The sample concentrations were between 931 and 48729 $\mu\text{mol/L}$ (10.5 and 551 mg/dL).

Linear regression

$$y = 0.999x + 41.5 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.999$$

Linear regression

$$y = 0.996x - 12.2 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.999$$

Linear regression

$$y = 0.998x + 113 \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.999$$

References

- 1 Thomas C, Thomas L. Labordiagnostik von Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege. In: Thomas L, ed. Labor und Diagnose, 6th ed. Frankfurt/Main: TH-Books 2005;520-585.
- 2 Lamb E, Newman DJ, Price CP. Kidney function tests In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. St.Louis, MO: Elsevier Saunders 2006;797-835.
- 3 <http://www.kidney.org/>
- 4 <http://www.nkdep.nih.gov/>
- 5 Lamb EJ, Tomson CRV, Roderick PJ. Estimating kidney function in adults using formulae. Ann Clin Biochem 2005;42:321-345.
- 6 Miller WG. Editorial on Estimating glomerular filtration rate. Clin Chem Lab Med 2009;47(9):1017-1019.
- 7 Schwartz GJ, Muñoz A, Schneider MF, et al. New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. J Am Soc Nephrol 2009;20:629-637.
- 8 Schwartz GJ, Work DF. Measurement and Estimation of GFR in Children and Adolescents. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:1832-1843.
- 9 Staples A, LeBlond R, Watkins S, et al. Validation of the revised Schwartz estimating equation in a predominantly non-CKD population. Pediatr Nephrol 2010 Jul 22;25:2321-2326.
- 10 Jaffé M. Ueber den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalem Harn erzeugt und über eine neue Reaktion des Kreatinins. Z Physiol Chem 1886;10:391-400.
- 11 Fabiny DL, Ertinghausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with the CentrifChem Clin Chem. 1971;17:696-700.
- 12 Bartels H, Böhmer M. Micro-determination of creatinine. Clin Chim Acta 1971;32:81-85.
- 13 Guder WG, Narayanan S, Wisser H, et al. List of Analytes; Preanalytical Variables. Brochure in: Samples: From the Patient to the Laboratory. Darmstadt: GIT-Verlag 1996.
- 14 Guder W, Fonseca-Wollheim W, Ehret W, et al. Die Qualität Diagnostischer Proben, 6. Aufl. Heidelberg: BD Diagnostics, 2009.
- 15 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 16 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.

- 17 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 18 Ducharme MP, Smythe M, Strohs G. Drug-induced alterations in serum creatinine concentrations. Ann Pharmacotherapy 1993;27:622-633.
- 19 Kroll MH. Some observations on the reaction mechanism of Cefoxitin and Cephalothin with picrate. Microchim J 1990;42:241-249.
- 20 Mazzachi BC, Phillips JW, Peake MJ. Is the Jaffe creatinine assay suitable for neonates? Clin Biochem Revs 1998;19:82.
- 21 Filler G, Priem F, Lepage N, et al. β -Trace Protein, Cystatin C, β 2-Microglobulin, and Creatinine Compared for Detecting Impaired Glomerular Filtration Rates in Children. Clin Chem 2002;48:729-736.
- 22 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 23 Mazzachi BC, Peake MJ, Ehrhardt V. Reference Range and Method Comparison Studies for Enzymatic and Jaffé Creatinine Assays in Plasma and Serum and Early Morning Urine. Clin Lab 2000;53:55.
- 24 Schlebusch H, Liappis N, Kalina E, et al. High Sensitive CRP and Creatinine: Reference Intervals from Infancy to Childhood. J Lab Med 2002;26:341-346.
- 25 Junge W, Wilke B, Halabi A, et al. Determination of reference intervals for serum creatinine, creatinine excretion and creatinine clearance with an enzymatic and a modified Jaffé method. Clin Chim Acta 2004;344:137-148.
- 26 Zawta B, Delanghe J, Taes Y, et al. Arithmetic Compensation for Pseudo-Creatinine Interferences of the Creatinine Jaffé Method and its Effect on Creatinine Clearance Results. Clin Chem Part 2, Suppl S June 2001;46(6):487.
- 27 Wuyts B, Bernard D, van den Noortgate N, et al. Reevaluation of Formulas for Predicting Creatinine Clearance in Adults and Children Using Compensated Creatinine Methods. Clin Chem 2003;49:1011-1014.
- 28 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

CONTENT

Contents of kit



Volume after reconstitution or mixing

GTIN

Global Trade Item Number

FOR US CUSTOMERS ONLY: LIMITED WARRANTY

Roche Diagnostics warrants that this product will meet the specifications stated in the labeling when used in accordance with such labeling and will be free from defects in material and workmanship until the expiration date printed on the label. THIS LIMITED WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL ROCHE DIAGNOSTICS BE LIABLE FOR INCIDENTAL, INDIRECT, SPECIAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES.

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2019, Roche Diagnostics

0004810716190c501V20.0

CREJ2

Creatinine Jaffé Gen.2



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



Distribution in USA by:

Roche Diagnostics, Indianapolis, IN

US Customer Technical Support 1-800-428-2336

cobas[®]

ANNEXE 6: Fiche technique de l'urée

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
04460715 190	Urea/BUN 500 tests	System-ID 07 6303 9 cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c 311** analyzer:**UREAL:** ACN 418 (serum/plasma)**U-BUN:** ACN 421 (serum/plasma)**URELU:** ACN 417 (urine)**UBUNU:** ACN 428 (urine)**SUREA:** ACN 419 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma)**SUBUN:** ACN 427 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma)**SUREU:** ACN 420 (STAT, reaction time: 4, urine)**SBUNU:** ACN 429 (STAT, reaction time: 4, urine)For **cobas c 501** analyzer:**UREAL:** ACN 418 (serum/plasma/urine)**U-BUN:** ACN 421 (serum/plasma/urine)**SUREA:** ACN 419 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma/urine)**SUBUN:** ACN 427 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma/urine)For **cobas c 502** analyzer:**UREAL:** ACN 8418 (serum/plasma)**U-BUN:** ACN 8421 (serum/plasma)**URELU:** ACN 8417 (urine)**UBUNU:** ACN 8428 (urine)**SUREA:** ACN 8419 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma)**SUBUN:** ACN 8427 (STAT, reaction time: 4, serum/plasma)**SUREU:** ACN 8420 (STAT, reaction time: 4, urine)**SBUNU:** ACN 8429 (STAT, reaction time: 4, urine)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of urea/urea nitrogen in human serum, plasma and urine on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary¹

Urea is the major end product of protein nitrogen metabolism. It is synthesized by the urea cycle in the liver from ammonia which is produced by amino acid deamination. Urea is excreted mostly by the kidneys but minimal amounts are also excreted in sweat and degraded in the intestines by bacterial action.

Determination of blood urea nitrogen is the most widely used screening test for renal function. When used in conjunction with serum creatinine determinations it can aid in the differential diagnosis of the three types of azotemia: prerenal, renal and postrenal.

Elevations in blood urea nitrogen concentration are seen in inadequate renal perfusion, shock, diminished blood volume (prerenal causes), chronic nephritis, nephrosclerosis, tubular necrosis, glomerular nephritis (renal causes) and urinary tract obstruction (postrenal causes). Transient elevations may also be seen during periods of high protein intake. Unpredictable levels occur with liver diseases.

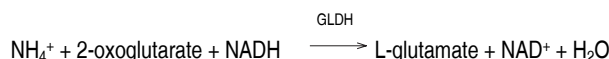
Test principle

Kinetic test with urease and glutamate dehydrogenase.^{2,3,4,5}

Urea is hydrolyzed by urease to form ammonium and carbonate.



In the second reaction 2-oxoglutarate reacts with ammonium in the presence of glutamate dehydrogenase (GLDH) and the coenzyme NADH to produce L-glutamate. In this reaction two moles of NADH are oxidized to NAD⁺ for each mole of urea hydrolyzed.



The rate of decrease in the NADH concentration is directly proportional to the urea concentration in the specimen and is measured photometrically.

Reagents - working solutions

R1 NaCl 9 %

R2 TRIS buffer: 220 mmol/L, pH 8.6; 2-oxoglutarate: 73 mmol/L; NADH: 2.5 mmol/L; ADP: 6.5 mmol/L; urease (jack bean): ≥ 300 μkat/L; GLDH (bovine liver): ≥ 80 μkat/L; preservative; nonreactive stabilizers

R1 is in position C and R2 is in position B.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

UREAL

Shelf life at 2-8 °C:

See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer:

8 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C:

See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer:

12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable. Serum

Plasma: Li-heparin and K₂-EDTA plasma. Do not use ammonium heparin.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems

from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Urine

Bacterial growth in the specimen and high atmospheric ammonia concentrations as well as contamination by ammonium ions may cause erroneously elevated results.

Stability in <i>serum/plasma</i> . ⁶	7 days at 15-25 °C
	7 days at 2-8 °C
	1 year at (-15)-(-25) °C

Stability in <i>urine</i> . ⁶	2 days at 15-25 °C
	7 days at 2-8 °C
	1 month at (-15)-(-25) °C

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 10-19 (STAT 4 / 10-19)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	10 µL	90 µL	
R2	38 µL	110 µL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	6 µL	15 µL	120 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 16-28 (STAT 4 / 16-28)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	10 µL	90 µL	
R2	38 µL	110 µL	

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	6 µL	15 µL	120 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 16-28 (STAT 4 / 16-28)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	10 µL	90 µL	
R2	38 µL	110 µL	

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	6 µL	15 µL	120 µL
Increased	4 µL	–	–

Application for urine

cobas c 311 test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 10-19 (STAT 4 / 10-19)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	10 µL	90 µL	
R2	38 µL	110 µL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	3 µL	147 µL
Decreased	2 µL	2 µL	178 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 501/502 test definition

Assay type	Rate A		
Reaction time / Assay points	10 / 16-28 (STAT 4 / 16-28)		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	10 µL	90 µL	
R2	38 µL	110 µL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	3 µL	147 µL
Decreased	2 µL	2 µL	178 µL
Increased	2 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration • after 4 weeks on board • after reagent lot change • as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against ID/MS.

Quality control

Serum/plasma

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

Urine

Quantitative urine controls are recommended for routine quality control.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

cobas c systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors:	mmol/L urea x 6.006 = mg/dL urea
	mmol/L urea x 0.06006 = g/L urea
	mmol/L urea nitrogen x 2.801 = mg/dL urea nitrogen
	mmol/L urea nitrogen x 0.02801 = g/L urea nitrogen
	mg/dL urea x 0.467 = mg/dL urea nitrogen

When 24-hour urine is used as the specimen, multiply the result by the 24-hour volume to obtain values in g or mmol/24 hours.

Limitations - interference

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at a urea concentration of 8.3 mmol/L (49.8 mg/dL urea, 23.2 mg/dL urea nitrogen) in serum/plasma and at a urea concentration of 150 mmol/L (901 mg/dL urea, 421 mg/dL urea nitrogen) in urine. Recovery within $\pm 10\%$ for drug interference.

Serum/plasma

Icterus:⁷ No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 μ mol/L (60 mg/dL)).

Hemolysis:⁷ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 621 μ mol/L (1000 mg/dL)).

Lipemia (Intralipid):⁷ No significant interference up to an L index of 1000. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Ammonium ions may cause erroneously elevated results.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{8,9}

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹⁰

Urine

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.⁹

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

Serum/plasma

0.5-40 mmol/L (3.0-240 mg/dL urea, 1.4-112 mg/dL urea nitrogen)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:3 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 3.

Urine

1-2000 mmol/L (6-12000 mg/dL urea, 2.8-5600 mg/dL urea nitrogen)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:1.8 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 1.8.

Determine samples having concentrations lower than the technical limit of 40 mmol/L (240 mg/dL urea and 112 mg/dL urea nitrogen) via the rerun function. Samples are measured undiluted.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

Serum/plasma

0.5 mmol/L (3.0 mg/dL urea, 1.4 mg/dL urea nitrogen)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Urine

1 mmol/L (6 mg/dL urea, 2.8 mg/dL urea nitrogen)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Expected values

Urea:

Serum/plasma¹¹

Adults	2.76-8.07 mmol/L	(16.6-48.5 mg/dL)
--------	------------------	-------------------

Urine

24-hour urine ¹²	428-714 mmol/24 h (25.7-42.9 g/24 h), corresponding to 286-595 mmol/L (1.71-3.57 g/dL) ^a
-----------------------------	---

a) Based on average urine output of 1.2-1.5 L/24 h

Urea nitrogen (BUN):

Serum/plasma¹²

Adults (18-60 years)	2.14-7.14 mmol/L	6-20 mg/dL
Adults (60-90 years)	2.86-8.21 mmol/L	8-23 mg/dL
Infants (< 1 year)	1.43-6.78 mmol/L	4-19 mg/dL
Infants/children	1.79-6.43 mmol/L	5-18 mg/dL

Urine

UREAL

Urea/BUN

cobas®

24-hour urine¹² 428-714 mmol/24 h (12-20 g/24 h),
corresponding to
286-595 mmol/L (801-1666 mg/dL)^b

^b Based on average urine output of 1.2-1.5 L/24 h

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (serum/plasma: 3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days; urine: 3 aliquots per run, 1 run per day, 10 days). The following results were obtained:

Serum/plasma

Repeatability	Mean	SD	CV
	mmol/L	mmol/L	%
	(mg/dL urea)	(mg/dL urea)	
Precinorm U	6.74 (40.5)	0.07 (0.4)	1.0
Precipath U	23.4 (141)	0.2 (1)	0.9
Human serum 1	9.18 (55.1)	0.09 (0.5)	1.0
Human serum 2	15.1 (90.7)	0.1 (0.6)	0.9
Intermediate precision	Mean	SD	CV
	mmol/L	mmol/L	%
	(mg/dL urea)	(mg/dL urea)	
Precinorm U	6.66 (40.0)	0.08 (0.5)	1.2
Precipath U	23.2 (139)	0.3 (2)	1.1
Human serum 3	9.13 (54.8)	0.10 (0.6)	1.1
Human serum 4	14.9 (89.5)	0.2 (1.2)	1.3

Urine

Repeatability	Mean	SD	CV
	mmol/L	mmol/L	%
	(mg/dL urea)	(mg/dL urea)	
Control level 1	161 (967)	4 (24)	2.2
Control level 2	288 (1730)	3 (18)	1.2
Human urine 1	324 (1946)	4 (24)	1.3
Human urine 2	137 (823)	3 (18)	1.9
Intermediate precision	Mean	SD	CV
	mmol/L	mmol/L	%
	(mg/dL urea)	(mg/dL urea)	
Control level 1	154 (925)	4 (24)	2.7
Control level 2	280 (1682)	6 (36)	2.3
Human urine 3	316 (1898)	6 (36)	2.0
Human urine 4	133 (799)	3 (18)	2.4

Method comparison

Urea values for human serum, plasma and urine samples obtained on a cobas c 501 analyzer (y) were compared with those determined on Roche/Hitachi 917/MODULAR P analyzers (x), using the corresponding Roche/Hitachi reagent.

Serum/plasma

Sample size (n) = 175

Passing/Bablok¹³

y = 0.990x + 0.138 mmol/L

τ = 0.959

Linear regression

y = 0.976x + 0.303 mmol/L

r = 0.998

The sample concentrations were between 2.27 and 39.4 mmol/L (13.6 and 237 mg/dL urea).

Urine

Sample size (n) = 267

Passing/Bablok¹³

y = 1.006x - 6.50 mmol/L

τ = 0.949

Linear regression

y = 1.035x - 14.1 mmol/L

r = 0.998

The sample concentrations were between 39.0 and 1314 mmol/L (234 and 7892 mg/dL urea).

References

- Rock RC, Walker WG, Jennings CD. Nitrogen metabolites and renal function. In: Tietz NW, ed. Fundamentals of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders 1987;669-704.
- Richterich R, Colombo JP. Klinische Chemie. 4th ed. Basel: Karger S 1978;319-324.
- Talke H, Schubert GA. Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. Klin Wochenschr 1965;43:174.
- Tiffany TO, Jansen JM, Burtis CA, et al. Enzymatic kinetic rate and end-point analyses of substrate, by use of a GeMSAEC Fast Analyzer. Clin Chem 1972;18:829-840.
- Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, et al. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: Optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. Clin Chem 1980;26:816-826.
- WHO Publication: Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:Jan 2002.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- Löhr B, El-Samallouti V, Junge W, et al. Reference Range Study for Various Parameters on Roche Clinical Chemistry Analyzers. Clin Lab 2009;55:465-471.
- Wu AHB, ed. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th edition. St. Louis (MO): Saunders Elsevier 2006;1096.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see dialog.roche.com for definition of symbols used):

CONTENT

Contents of kit



Volume after reconstitution or mixing

GTIN

Global Trade Item Number

0104460715190c501V13.0

UREAL

Urea/BUN

cobas[®]

COBAS, COBAS C, PRECINORM, PRECIPATH and PRECICONTROL are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2019, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



ANNEXE 7: Fiche technique de l'acide urique

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
03183807 190	Uric Acid ver.2 (400 tests)	System-ID 07 6615 1 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401
10759350 360	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL, for USA)	Code 401
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300
12149435 160	Precinorm U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 300
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301
12149443 160	Precipath U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 301
10171743 122	Precinorm U (20 x 5 mL)	Code 300
10171735 122	Precinorm U (4 x 5 mL)	Code 300
10171778 122	Precipath U (20 x 5 mL)	Code 301
10171760 122	Precipath U (4 x 5 mL)	Code 301
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05947626 160	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL, for USA)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
05947774 160	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL, for USA)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311 analyzer:

UA2: ACN 700 (serum/plasma)

UA2-U: ACN 702 (urine)

For **cobas c** 501 analyzer:

UA2: ACN 700 (serum/plasma/urine)

For **cobas c** 502 analyzer:

UA2: ACN 8700 (serum/plasma)

UA2-U: ACN 8702 (urine)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of uric acid in human serum, plasma and urine on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14}

Uric acid is the final product of purine metabolism in the human organism. Uric acid measurements are used in the diagnosis and treatment of numerous renal and metabolic disorders, including renal failure, gout, leukemia, psoriasis, starvation or other wasting conditions, and of patients receiving cytotoxic drugs.

The oxidation of uric acid provides the basis for two approaches to the quantitative determination of this purine metabolite. One approach is the reduction of phosphotungstic acid in an alkaline solution to tungsten blue, which is measured photometrically. The method is, however, subject to interferences from drugs and reducing substances other than uric acid.

A second approach, described by Praetorius and Poulsen, utilizes the enzyme uricase to oxidize uric acid; this method eliminates the interferences intrinsic to chemical oxidation. Uricase can be employed in methods that involve the UV measurement of the consumption of uric acid or in combination with other enzymes to provide a colorimetric assay.

Another method is the colorimetric method developed by Town et al. The sample is initially incubated with a reagent mixture containing ascorbate oxidase and a clearing system. In this test system it is important that any ascorbic acid present in the sample is eliminated in the preliminary reaction; this precludes any ascorbic acid interference with the subsequent POD indicator reaction. Upon addition of the starter reagent, oxidation of uric acid by uricase begins.

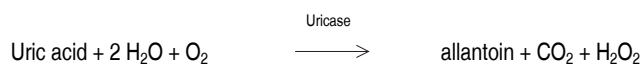
The Roche assay described here is a slight modification of the colorimetric method described above. In this reaction, the peroxide reacts in the presence of peroxidase (POD), N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline (TOOS), and

4-aminophenazone to form a quinone-diimine dye. The intensity of the red color formed is proportional to the uric acid concentration and is determined photometrically.

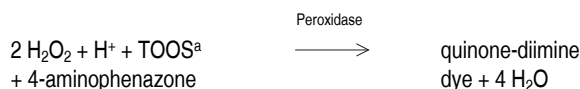
Test principle

Enzymatic colorimetric test.

Uricase cleaves uric acid to form allantoin and hydrogen peroxide.



In the presence of peroxidase, 4-aminophenazone is oxidized by hydrogen peroxide to a quinone-diimine dye.



The color intensity of the quinone-diimine formed is directly proportional to the uric acid concentration and is determined by measuring the increase in absorbance.

a) N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfoethyl)-3-methylaniline

Reagents - working solutions

R1 Phosphate buffer: 0.05 mol/L, pH 7.8; TOOS: 7 mmol/L; fatty alcohol polyglycol ether: 4.8 %; ascorbate oxidase (EC 1.10.3.3; zucchini) ≥ 83.5 µkat/L (25 °C); stabilizers

R3 Phosphate buffer: 0.1 mol/L, pH 7.8; potassium hexacyanoferrate (II): 0.3 mmol/L; 4-aminophenazone ≥ 3 mmol/L; uricase (EC 1.7.3.3; Arthrobacter protophormiae) ≥ 83.4 µkat/L (25 °C); peroxidase (POD) (EC 1.11.1.7; horseradish) ≥ 50 µkat/L (25 °C); stabilizers

R1 is in position B and R3 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

For USA: Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

H318 Causes serious eye damage.

Prevention:

P280 Wear eye protection/ face protection.

Response:

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.
+ P338 Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/ doctor.
+ P310

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590, USA: 1-800-428-2336

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

UA2

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 8 weeks

NaCl Diluent 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable. Serum.

Plasma: Li-heparin and K₂-EDTA plasma.

EDTA plasma values are approximately 7 % lower than serum values.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Urine: Assay urinary uric acid as soon as possible. Do not refrigerate.

To prevent ureate precipitation in urine samples, add sodium hydroxide to keep urine alkaline (pH > 8.0). To achieve stated uric acid stability, add NaOH prior to sample collection. Urine samples are diluted 1 + 10 with distilled/deionized water or 0.9 % NaCl. This dilution is taken into account in the calculation of the results.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Stability in serum/plasma:¹⁵
7 days at 4-8 °C
3 days at 20-25 °C
6 months at -20 °C

Stability in urine¹⁵ (upon NaOH addition): 4 days at 20-25 °C

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

See "Order information" section

General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 23-27		
Wavelength (sub/main)	700/546 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mg/dL (μmol/L, mg/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	72 μL	25 μL	
R3	14 μL	20 μL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	3 μL	–	–
Decreased	12 μL	15 μL	135 μL
Increased	3 μL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 34-42		
Wavelength (sub/main)	700/546 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mg/dL (μmol/L, mg/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	72 μL	25 μL	
R3	14 μL	20 μL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	3 μL	–	–
Decreased	12 μL	15 μL	135 μL
Increased	3 μL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 34-42		
Wavelength (sub/main)	700/546 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mg/dL (μmol/L, mg/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	72 μL	25 μL	
R3	14 μL	20 μL	

<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>		Normal	3 µL	15 µL	150 µL
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>	Decreased	3 µL	6 µL	160 µL
				Increased	6 µL	15 µL	150 µL
Normal	3 µL	–	–	Calibration			
Decreased	12 µL	15 µL	135 µL	Calibrators	S1: H ₂ O		
Increased	6 µL	–	–		S2: C.f.a.s.		
Application for urine				Calibration mode	Linear		
cobas c 311 test definition				Calibration frequency	2-point calibration		
Assay type	2-Point End				- after reagent lot change		
Reaction time / Assay points	10 / 23-27				- as required following quality control procedures		
Wavelength (sub/main)	700/546 nm			Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.			
Reaction direction	Increase			Traceability: This method has been standardized against ID/MS. ¹⁶			
Units	mg/dL (µmol/L, mg/L)			Quality control			
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)		<i>Serum/plasma</i>			
R1	72 µL	25 µL		For quality control, use control materials as listed in the “Order information” section. In addition, other suitable control material can be used.			
R3	14 µL	20 µL		<i>Urine</i>			
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>		Quantitative urine controls are recommended for routine quality control.			
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>	The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.			
Normal	3 µL	15 µL	150 µL	Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.			
Decreased	3 µL	6 µL	160 µL	Calculation			
Increased	3 µL	15 µL	150 µL	Roche/Hitachi cobas c systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.			
cobas c 501 test definition				Conversion factors:	mg/dL x 59.5 = µmol/L		
Assay type	2-Point End				mg/dL x 10 = mg/L		
Reaction time / Assay points	10 / 34-42			Limitations - interference			
Wavelength (sub/main)	700/546 nm			Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value at an uric acid concentration of 7 mg/dL (417 µmol/L).			
Reaction direction	Increase			<i>Serum/plasma</i>			
Units	mg/dL (µmol/L, mg/L)			Icterus: ¹⁷ No significant interference up to an I index of 40 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 684 µmol/L or 40 mg/dL).			
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)		Hemolysis: ¹⁷ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 621 µmol/L or 1000 mg/dL).			
R1	72 µL	25 µL		Lipemia (Intralipid): ¹⁷ No significant interference up to an L index of 1500. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.			
R3	14 µL	20 µL		Ascorbic acid < 0.17 mmol/L (< 3 mg/dL) does not interfere.			
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>		Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels. ^{18,19} Exceptions: Calcium dobesilate causes artificially low uric acid results.			
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>	Uricase reacts specifically with uric acid. Other purine derivatives can inhibit the uric acid reaction.			
Normal	3 µL	15 µL	150 µL	Dicynone (Etamsylate) at therapeutic concentrations may lead to false-low results. ²⁰			
Decreased	3 µL	6 µL	160 µL	Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-Acetylcysteine. N-Acetylcysteine at the therapeutic concentration when used as an antidote and the Acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low results.			
Increased	3 µL	15 µL	150 µL	Venipuncture should be performed prior to the administration of Metamizole. Venipuncture immediately after or during the administration of Metamizole may lead to falsely low results.			
cobas c 502 test definition				In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results. ²¹			
Assay type	2-Point End						
Reaction time / Assay points	10 / 34-42						
Wavelength (sub/main)	700/546 nm						
Reaction direction	Increase						
Units	mg/dL (µmol/L, mg/L)						
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)					
R1	72 µL	25 µL					
R3	14 µL	20 µL					
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>					
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>				

Urine

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.¹⁹ Exceptions: Calcium dobesilate, Levodopa and methyldopa can all cause artificially low uric acid results.

High homogenetic acid concentrations in urine samples lead to false results.

Dicynone (Etamsylate) at therapeutic concentrations may lead to false-low results.

Acetaminophen, Acetylcysteine and Metamizole are metabolized quickly. Therefore, interference from these substances is unlikely but cannot be excluded.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCin1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is not required.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

Serum/plasma

0.2-25.0 mg/dL (11.9-1487 µmol/L)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2.5 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.5.

Urine

2.2-275 mg/dL (131-16362 µmol/L)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2.5 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.5.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

Serum/plasma

0.2 mg/dL (11.9 µmol/L)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Urine

2.2 mg/dL (131 µmol/L)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Expected values

Serum/plasma²²

Males:	3.4-7.0 mg/dL	(202.3-416.5 µmol/L)
Females:	2.4-5.7 mg/dL	(142.8-339.2 µmol/L)

Urine (reference range according to Krieg and Colombo)

1st morning urine ²³	37-92 mg/dL	(2200-5475 µmol/L)
24-hour urine ²⁴	200-1000 mg/day	(1200-5900 µmol/day)
corresponding to	13-67 mg/dL	(773-3986 µmol/L)
(calculated from a urine volume of 1.5 L/24 h)		

Urine (reference range according to Tietz)²⁵

Average diet 250-750 mg/24 hours

Low purine diet

Females < 400 mg/24 hours

Males < 480 mg/24 hours

High purine diet < 1000 mg/24 hours

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

Serum/plasma

Repeatability	Mean mg/dL (µmol/L)	SD mg/dL (µmol/L)	CV %
Precinorm U	4.54 (270)	0.04 (2)	0.9
Precipath U	11.1 (660)	0.1 (6)	0.7
Human serum 1	4.03 (240)	0.04 (2)	1.0
Human serum 2	7.23 (430)	0.06 (4)	0.8

Intermediate precision	Mean mg/dL (µmol/L)	SD mg/dL (µmol/L)	CV %
Precinorm U	4.47 (266)	0.07 (4)	1.5
Precipath U	11.1 (660)	0.2 (12)	1.6
Human serum 3	3.96 (236)	0.05 (3)	1.3
Human serum 4	7.17 (427)	0.10 (6)	1.3

Urine

Repeatability	Mean mg/dL (µmol/L)	SD mg/dL (µmol/L)	CV %
Control level 1	11.7 (696)	0.1 (6)	1.2
Control level 2	21.7 (1291)	0.3 (18)	1.3
Urine 1	28.8 (1714)	0.6 (36)	2.1
Urine 2	32.5 (1934)	0.5 (30)	1.5

Intermediate precision	Mean mg/dL (µmol/L)	SD mg/dL (µmol/L)	CV %
Control level 1	11.4 (678)	0.2 (12)	1.9
Control level 2	21.3 (1267)	0.3 (18)	1.6
Urine 3	29.3 (1743)	0.9 (54)	3.0
Urine 4	32.1 (1910)	0.8 (48)	2.3

Method comparison

Uric acid values for human serum, plasma and urine obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Serum/plasma

Sample size (n) = 89

Passing/Bablok²⁶

y = 0.993x + 0.158 mg/dL

Linear regression

y = 0.986x + 0.224 mg/dL

$\tau = 0.969$ $r = 1.000$

The sample concentrations were between 2.70 and 23.4 mg/dL (161 and 1392 $\mu\text{mol/L}$).

Urine

Sample size (n) = 86

Passing/Bablok²⁶

Linear regression

$y = 0.997x + 0.456 \text{ mg/dL}$

$y = 0.998x + 0.522 \text{ mg/dL}$

$\tau = 0.952$

$r = 0.999$

The sample concentrations were between 6.35 and 269 mg/dL (378 and 16006 $\mu\text{mol/L}$).

References

- Greiling H, Gressner AM, eds. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag 1995.
- Keller H, ed. Klinisch-chemische Labordiagnostik für die Praxis, 2nd ed. Stuttgart/New York: Georg Thieme Verlag 1991.
- Rice EW, Grogan BS. 1960 survey of clinical chemistry procedures used by members of the American Association of Clinical Chemists. Clin Chem 1962;8:181-193.
- Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system Clin Chim Acta 1971;31:421-426.
- DiGiorgio J, Henry RJ, et al. eds. Clinical Chemistry: Principles and Technics. 2nd ed. New York, NY: Harper and Row 1974:532.
- Kaiser E, et al. Wiener Klin Wschr 1972;84:217.
- Kim EK, Waddell LD, Sunderland MLE, et al. Observations on Diagnostic Kits for the Determination of Uric Acid. Clin Biochem 1971;4:279-286.
- Elking MP, Karat HF. Drug induced modifications of laboratory test values. Am J Hosp Pharm 1968;25(9):484-519.
- Young DS, Thomas DW, Friedman RB, et al. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Clin Chem 1972;18(10):1041.
- Küffer H. Causes of misleading laboratory results: disturbances due to drugs. Therap Umschau 1971;28(10):669-680.
- Haug HG. Diagnostik 1972;5:85.
- Singh HP, Hebert MA, Gault MH. Effect of Some Drugs on Clinical Laboratory Values as Determined by the Technicon SMA 12-60. Clin Chem 1972;18(2):137-144.
- Praetorius E, Poulsen H. Enzymatic determination of uric acid; with detailed directions. Scand J Clin Lab Invest 1953;5(3):273-280.
- Town MH, Gehm S, Hammer B, et al. A sensitive colorimetric method for the enzymatic determination of uric acid. J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:591.
- WHO Publication: Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:Jan 2002.
- Siekman L. Determination of uric acid in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. J Clin Chem Clin Biochem 1985;23:129-135.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- Dastych M, Wiewiorka O, Benovska M. Ethamsylate (Dicynone) Interference in Determination of Serum Creatinine, Uric Acid, Triglycerides, and Cholesterol in Assays Involving the Trinder Reaction; In Vivo and In Vitro. Clin Lab 2014;60:1373-1376.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- Thefeld W, Hoffmeister H, Busch EW, et al. Normalwerte der Serumharnsäure in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht mit einem neuen enzymatischen Harnsäurefarbstest. Dtsch Med Wschr 1973;98:380-384.
- Krieg M, Gunsser KJ, Steinhagen-Thiessen E, et al. Vergleichende quantitative Analytik klinisch-chemischer Kenngrößen im 24-Stunden-Urin und Morgenurin. J Clin Chem Clin Biochem 1986 Nov;24(11):863-869.
- Colombo JP, ed. Klinisch-chemische Urindiagnostik. Rotkreuz: LABOLIFE-Verlagsgemeinschaft 1994:180.
- Wu AHB, ed. Tietz Clinical Guide to Laboratory Tests, 4th edition. St. Louis (MO): Saunders Elsevier 2006;1098-1100.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

CONTENT

Contents of kit



Volume after reconstitution or mixing

GTIN

Global Trade Item Number

FOR US CUSTOMERS ONLY: LIMITED WARRANTY

Roche Diagnostics warrants that this product will meet the specifications stated in the labeling when used in accordance with such labeling and will be free from defects in material and workmanship until the expiration date printed on the label. THIS LIMITED WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL ROCHE DIAGNOSTICS BE LIABLE FOR INCIDENTAL, INDIRECT, SPECIAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES.

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2017, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

Distribution in USA by:
Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
US Customer Technical Support 1-800-428-2336



ANNEXE 8: Fiche technique du cholestérol total

CHOL2

Cholesterol Gen.2

Order information

REF		CONTENT		Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
03039773190	03039773500	Cholesterol Gen.2 (400 tests)	System-ID 07 6726 3	cobas c 311 , cobas c 501/502 , COBAS INTEGRA 400 plus

Materials required (but not provided):

		cobas c 311 , cobas c 501/502	COBAS INTEGRA 400 plus
10759350190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401	System-ID 07 3718 6
12149435122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300	System-ID 07 7999 7
12149443122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301	System-ID 07 8000 6
05117003190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391	System-ID 07 7469 3
05947626190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391	System-ID 07 7469 3
05117216190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392	System-ID 07 7470 7
05947774190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392	System-ID 07 7470 7
04489357190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3	n.a.

English

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of cholesterol in human serum and plasma on **cobas c** and COBAS INTEGRA systems.

Summary

Measurements of cholesterol, performed with this assay in human serum and plasma, are used in screening an individual's risk of developing atherosclerotic disease and as an aid in diagnosis, therapy guidance and monitoring of disorders involving elevated cholesterol levels as well as lipid and lipoprotein metabolic disorders.

Cholesterol is a steroid with a secondary hydroxyl group in the C3 position. It is synthesized in many types of tissue, but particularly in the liver and intestinal wall. Approximately three quarters of cholesterol is newly synthesized and a quarter originates from dietary intake. Cholesterol assays are used for screening for atherosclerotic risk and in the diagnosis and treatment of disorders involving elevated cholesterol levels as well as lipid and lipoprotein metabolic disorders.^{1,2,3}

Cholesterol analysis was first reported by Liebermann in 1885 followed by Burchard in 1889.^{4,5} In the Liebermann-Burchard reaction, cholesterol forms a blue-green dye from polymeric unsaturated carbohydrates in an acetic acid/acetic anhydride/concentrated sulfuric acid medium. The Abell and Kendall method is specific for cholesterol, but is technically complex and requires the use of corrosive reagents.⁶ In 1974, Roeschlau and Allain described the first fully enzymatic method.^{7,8} This method is based on the determination of Δ^4 -cholestenone after enzymatic cleavage of the cholesterol ester by cholesterol esterase, conversion of cholesterol by cholesterol oxidase, and subsequent measurement by the Trinder reaction of the hydrogen peroxide formed.⁹ Optimization of ester cleavage (> 99.5 %) allows standardization using primary and secondary standards and a direct comparison with the CDC and NIST reference methods.^{10,11}

Nonfasting sample results may be slightly lower than fasting results.^{12,13,14}

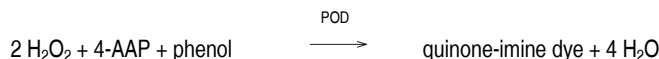
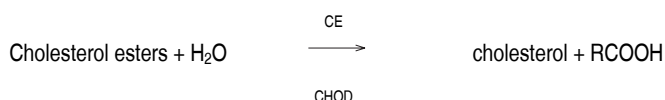
The Roche cholesterol assay meets the 1992 National Institutes of Health (NIH) goal of less than or equal to 3 % for both precision and bias.¹⁴

The assay is optionally standardized against Abell/Kendall and isotope dilution/mass spectrometry.

Test principle

Enzymatic, colorimetric method.

Cholesterol esters are cleaved by the action of cholesterol esterase to yield free cholesterol and fatty acids. Cholesterol oxidase then catalyzes the oxidation of cholesterol to cholest-4-en-3-one and hydrogen peroxide. In the presence of peroxidase, the hydrogen peroxide formed effects the oxidative coupling of phenol and 4-aminoantipyrine (4-AAP) to form a red quinone-imine dye.



The color intensity of the dye formed is directly proportional to the cholesterol concentration. It is determined by measuring the increase in absorbance.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use for health care professionals. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Infectious or microbial waste:

Warning: handle waste as potentially biohazardous material. Dispose of waste according to accepted laboratory instructions and procedures.

Environmental hazards:

Apply all relevant local disposal regulations to determine the safe disposal.

Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Warning

H319 Causes serious eye irritation.

Prevention:

P264 Wash skin thoroughly after handling.

P280 Wear eye protection/ face protection.

Response:

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.

P337 + P313 If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

Reagent handling

Ready for use

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

CHOL2

Cholesterol Gen.2

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.
Serum/Plasma: Li-heparin or K₂-EDTA plasma (Use of EDTA-plasma leads to slightly lower values.)

Do not use citrate, oxalate or fluoride.¹⁵

Fasting and nonfasting samples can be used.¹³

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Stability: ^{1,16}	7 days at 15-25 °C
	7 days at 2-8 °C
	3 months at (-15)-(-25) °C

Freeze only once.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Calculation

The systems automatically calculate the analyte concentration of each sample. For more details, please refer to Data Analysis in the Online Help.

Conversion factors:	mmol/L x 38.66 = mg/dL
	mmol/L x 0.3866 = g/L
	mg/dL x 0.0259 = mmol/L

Expected values

Clinical interpretation according to the recommendations of the European Atherosclerosis Society:²

	mmol/L	mg/dL	Lipid metabolic disorder
Cholesterol	< 5.2	(< 200)	No
Triglycerides	< 2.3	(< 200)	No
Cholesterol	5.2-7.8	(200-300)	Yes, if HDL-cholesterol < 0.9 mmol/L (< 35 mg/dL)
Cholesterol	> 7.8	(> 300)	Yes
Triglycerides	> 2.3	(> 200)	Yes

Recommendations of the NCEP Adult Treatment Panel for the following risk-cutoff thresholds for the US American population:³

Desirable cholesterol level	< 5.17 mmol/L	(< 200 mg/dL)
Borderline high cholesterol	5.17-6.18 mmol/L	(200-239 mg/dL)
High cholesterol	≥ 6.21 mmol/L	(≥ 240 mg/dL)

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

cobas c systems

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

CHO2I: ACN 798: ID/MS Standardization

CHO2A: ACN 433: Abell/Kendall Standardization

For **cobas c** 502 analyzer:

CHO2I: ACN 8798: ID/MS Standardization

CHO2A: ACN 8433: Abell/Kendall Standardization

Reagents – working solutions

R1 PIPES buffer: 225 mmol/L, pH 6.8; Mg²⁺: 10 mmol/L; sodium cholate: 0.6 mmol/L; 4-aminoantipyrine: ≥ 0.45 mmol/L; phenol: ≥ 12.6 mmol/L; fatty alcohol polyglycol ether: 3 %; cholesterol esterase (*Pseudomonas spec.*): ≥ 25 µkat/L (≥ 1.5 U/mL); cholesterol oxidase (*E. coli*): ≥ 7.5 µkat/L (≥ 0.45 U/mL); peroxidase (horseradish): ≥ 12.5 µkat/L (≥ 0.75 U/mL); stabilizers; preservative

R1 is in position B.

Storage and stability

CHOL2

Shelf life at 2-8 °C:	See expiration date on cobas c pack label.
-----------------------	---

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 4 weeks

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	1-Point
Reaction time / Assay points	10 / 57
Wavelength (sub/main)	700/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	47 µL 93 µL
Sample volumes	Sample Sample dilution
	Sample Diluent (NaCl)
Normal	2 µL – –
Decreased	2 µL 15 µL 135 µL
Increased	2 µL – –

cobas c 501 test definition

Assay type	1-Point
Reaction time / Assay points	10 / 70
Wavelength (sub/main)	700/505 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	47 µL 93 µL
Sample volumes	Sample Sample dilution
	Sample Diluent (NaCl)
Normal	2 µL – –
Decreased	2 µL 15 µL 135 µL
Increased	2 µL – –

CHOL2

Cholesterol Gen.2

cobas c 502 test definition

Assay type	1-Point		
Reaction time / Assay points	10 / 70		
Wavelength (sub/main)	700/505 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	47 µL	93 µL	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	2 µL	15 µL	135 µL
Increased	4 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O
	S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	Blank calibration
	- every 7 days on-board
	- every 7 days during shelf life
	2-point calibration
	- after reagent lot change
	- as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized according to Abell/Kendall¹⁴ and also by isotope dilution/mass spectrometry.¹⁷

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Limitations – interference

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial values at a cholesterol concentration of 5.2 mmol/L (200 mg/dL).

Icterus:¹⁸ No significant interference up to an I index of 16 for conjugated bilirubin and 14 for unconjugated bilirubin (approximate conjugated bilirubin concentration 274 µmol/L or 16 mg/dL; approximate unconjugated bilirubin concentration 239 µmol/L or 14 mg/dL).

Hemolysis:¹⁸ No significant interference up to an H index of 700 (approximate hemoglobin concentration: 435 µmol/L or 700 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹⁸ No significant interference up to an L index of 2000. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{19,20}

Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-Acetylcysteine. N-Acetylcysteine at the therapeutic concentration when used as an antidote and the Acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low results.

Venipuncture should be performed prior to the administration of Metamizole. Venipuncture immediately after or during the administration of Metamizole may lead to falsely low results.

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.²¹

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

0.1-20.7 mmol/L (3.86-800 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:10 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 10.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

0.1 mmol/L (3.86 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained on the **cobas c** 501 analyzer:

Repeatability	Mean	SD	CV
	mmol/L (mg/dL)	mmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	2.29 (88.5)	0.02 (0.8)	1.1
Precipath U	4.74 (183)	0.04 (2)	0.9
Human serum 1	2.85 (110)	0.03 (1)	1.1
Human serum 2	7.39 (286)	0.05 (2)	0.7
Intermediate precision	Mean	SD	CV
	mmol/L (mg/dL)	mmol/L (mg/dL)	%
Precinorm U	2.31 (89.3)	0.04 (1.6)	1.6
Precipath U	4.85 (188)	0.08 (3)	1.6
Human serum 3	1.97 (76.2)	0.03 (1.2)	1.6
Human serum 4	7.13 (276)	0.10 (4)	1.4

The data obtained on **cobas c** 501 analyzer(s) are representative for **cobas c** 311 analyzer(s).

Method comparison

Cholesterol values for human serum and plasma samples obtained on a **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Sample size (n) = 266

Passing/Bablok ²²	Linear regression
y = 1.002x + 0.045 mmol/L	y = 1.012x - 0.015 mmol/L
r = 0.953	r = 0.997

CHOL2

Cholesterol Gen.2

The sample concentrations were between 1.53 and 18.5 mmol/L (59.1 and 715 mg/dL).

The data obtained on **cobas c 501** analyzer(s) are representative for **cobas c 311** analyzer(s).

COBAS INTEGRA systems

System information

CHOL2: Test ID 0-586

Reagents - working solutions

R PIPES^{a)} buffer: 225 mmol/L, pH 6.8; Mg²⁺: 10 mmol/L; sodium cholate: 0.6 mmol/L; 4-aminoantipyrine: ≥ 0.45 mmol/L; phenol: ≥ 12.6 mmol/L; fatty alcohol polyglycol ether: 3 %; cholesterol esterase (*Pseudomonas spec.*): ≥ 25 μ kat/L (≥ 1.5 U/mL); cholesterol oxidase (*E. coli*): ≥ 7.5 μ kat/L (≥ 0.45 U/mL); peroxidase (horseradish): ≥ 12.5 μ kat/L (≥ 0.75 U/mL); stabilizers; preservative

a) PIPES = Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)

R is in position B.

Storage and stability

Shelf life at 2-8 °C

See expiration date on **cobas c** pack label

On-board in use at 10-15 °C

8 weeks

Application for serum and plasma

Test definition

Measuring mode	Absorbance
Abs. calculation mode	Endpoint
Reaction mode	R-S
Reaction direction	Increase
Wavelength A/B	512/659 nm
Calc. first/last	17/69
Unit	mmol/L

Pipetting parameters

		Diluent (H ₂ O)
R	47 μ L	70 μ L
Sample	2 μ L	23 μ L
Total volume	142 μ L	

Calibration

Calibrator	Calibrator f.a.s. Use deionized water as zero calibrator.
Calibration mode	Linear regression
Calibration replicate	Duplicate recommended
Calibration interval	Each lot and as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized by ID-MS^{b)} and also according to Abell-Kendall. This complies with the requirements of the National Institute of Standards and Technology (NIST).

b) Isotope dilution - mass spectrometry

Quality control

Reference range	Precinorm U plus or PreciControl ClinChem Multi 1
-----------------	--

Pathological range

Precipath U plus or
PreciControl ClinChem Multi 2

Control interval

24 hours recommended

Control sequence

User defined

Control after calibration

Recommended

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section. In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Limitations - interference

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value.

Icterus:¹⁸ No significant interference up to an I index of 16 for conjugated bilirubin and 11 for unconjugated bilirubin (approximate conjugated bilirubin concentration: 274 μ mol/L or 16 mg/dL; approximate unconjugated bilirubin concentration: 188 μ mol/L or 11 mg/dL).^{c)}

Hemolysis:¹⁸ No significant interference up to an H index of 810 (approximate hemoglobin concentration: 503 μ mol/L or 810 mg/dL).^{c)}

Lipemia (Intralipid):¹⁸ No significant interference up to an L index of 2000.^{c)} There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{19,20}

Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-Acetylcysteine. N-Acetylcysteine at the therapeutic concentration when used as an antidote and the Acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low results.

Venipuncture should be performed prior to the administration of Metamizole. Venipuncture immediately after or during the administration of Metamizole may lead to falsely low results.

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.²¹

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

c) measured at cholesterol levels up to 5.28 mmol/L

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on COBAS INTEGRA analyzers. Refer to the CLEAN Method Sheet for further instructions and for the latest version of the Extra wash cycle list.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

0.1-20.7 mmol/L (3.87-800 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:10 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 10.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test:
0.1 mmol/L (3.87 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of a zero sample (zero sample + 3 SD, repeatability, n = 21).

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

CHOL2

Cholesterol Gen.2



Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (1 aliquot per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained on the COBAS INTEGRA 700 analyzer:

Repeatability	Level 1	Level 2
Mean	2.74 mmol/L (106 mg/dL)	6.20 mmol/L (240 mg/dL)
CV	0.5 %	0.8 %

Intermediate precision	Level 1	Level 2
Mean	2.61 mmol/L (101 mg/dL)	5.96 mmol/L (230 mg/dL)
CV	1.9 %	1.4 %

The data obtained on COBAS INTEGRA 700 analyzer(s) are representative for COBAS INTEGRA 400 analyzer(s).

Method comparison

Cholesterol values for human serum and plasma samples obtained on a COBAS INTEGRA 700 analyzer using the COBAS INTEGRA Cholesterol Gen.2 reagent (y) were compared to those determined by ID-MS (x).

ID-MS	Sample size (n) = 50
Passing/Bablok ²²	Linear regression
$y = 0.99x + 0.04 \text{ mmol/L}$	$y = 0.98x + 0.09 \text{ mmol/L}$
$r = 0.971$	$r = 0.999$
SD (md 95) = 0.115	Sy.x = 0.058

The sample concentrations were between 1.51 and 10.94 mmol/L (58.4 and 423 mg/dL).

The data obtained on COBAS INTEGRA 700 analyzer(s) are representative for COBAS INTEGRA 400 analyzer(s).

References

- 1 Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia PA: WB Saunders Company 1995;130-131.
- 2 Study Group, European Atherosclerosis Society. Strategies for the prevention of coronary heart disease: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. European Heart Journal 1987;8:77-88.
- 3 Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication No 01-3670; May 2001.
- 4 Liebermann NC. Über das Oxychinoterpen. Ber Dtsch chem Ges 1885;18:1803.
- 5 Burchard H. Beiträge zur Kenntnis der Cholesterine. Dissertation, Rostock 1889.
- 6 Abell LL, Levy BB, Kendall FE. Cholesterol in serum. In: Seligson D (ed.). Standard Methods of Clinical Chemistry. Vol 2. Academic Press, New York 1958;26-33.
- 7 Allain CC, Poon LS, Chan CS, et al. Enzymatic determination of total serum cholesterol. Clin Chem 1974;20(4):470-475.
- 8 Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. Z Klin Chem Klin Biochem 1974;12(5):226.
- 9 Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem 1969;6:24-27.
- 10 Siedel J, Hägele EO, Ziegenhorn J, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total cholesterol with improved lipolytic efficiency. Clin Chem 1983;29:1075-1080.
- 11 Wiebe DA, Bernert JT. Influence of incomplete cholesteryl ester hydrolysis on enzymatic measurements of cholesterol. Clin Chem 1984;30:352-356.

- 12 Cohn JS, McNamara JR, Schaefer EJ. Lipoprotein Cholesterol Concentrations in the Plasma of Human Subjects as Measured in the Fed and Fasted States. Clin Chem 1988;34:2456-2459.
- 13 Pisani T, Gebbski CP, Leary ET, et al. Accurate Direct Determination of Low-density Lipoprotein Cholesterol Using an Immunoseparation Reagent and Enzymatic Cholesterol Assay. Arch Pathol Lab Med 1995 Dec;119(12):1127-1135.
- 14 Recommendations for Improving Cholesterol Measurement: A Report from the Laboratory Standardization Panel of the National Cholesterol Education Program. NIH Publication No. 90-2964 1990.
- 15 Nader R, Dufour DR, Cooper GR. Preanalytical Variation in Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Testing. In: Rifai N, Warnick GR, and Dominiczak MH, editors. Handbook of Lipoprotein Testing. 2nd ed. Washington: AACC press p.176.
- 16 Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations. WHO Publication WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2: Jan 2002.
- 17 Siekmann L, Hüskes KP, Breuer H. Determination of cholesterol in serum using mass fragmentography - a reference method in clinical chemistry. Z Anal Chem 1976;279:145-146.
- 18 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 19 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 20 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 21 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 22 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Any serious incident that has occurred in relation to the device shall be reported to the manufacturer and the competent authority of the Member State in which the user and/or the patient is established.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see dialog.roche.com for definition of symbols used):

CONTENT	Contents of kit
→	Volume for reconstitution
GTIN	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2023, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim

www.roche.com

+800 5505 6606



ANNEXE 9: Fiche technique du cholestérol HDL

HDLC4

HDL-Cholesterol Gen.4

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
07528566 190	HDL-Cholesterol Gen.4 (350 tests)	System-ID 07 7589 4
12172623 122	Calibrator f.a.s. Lipids (3 x 1 mL)	Code 424
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

HDLC4: ACN 454

For **cobas c** 502 analyzer:

HDLC4: ACN 8454

Intended use

In vitro diagnostic test for the quantitative determination of the HDL-cholesterol concentration in human serum and plasma on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary

High density lipoproteins (HDL) are responsible for the reverse transport of cholesterol from the peripheral cells to the liver. In the liver, cholesterol is transformed to bile acids which are then excreted into the intestine via the biliary tract.

Monitoring of HDL-cholesterol in serum or plasma is of clinical relevance as the HDL-cholesterol concentration is important in the assessment of atherosclerotic risk. Elevated HDL-cholesterol concentrations protect against coronary heart disease (CHD), whereas reduced HDL-cholesterol concentrations, particularly in conjunction with elevated triglycerides, increase cardiovascular risk.¹

Two cholesterol related variables that are predictive of cardiovascular disease (CVD) have emerged. These are non-HDL-cholesterol^{2,3,4} (= cholesterol - HDL-cholesterol) and the rate of cholesterol transfer from the macrophages to HDL, also described as cholesterol efflux capacity.⁵ Whereas both cholesterol and HDL-cholesterol can be readily determined with high accuracy, currently, non-HDL-cholesterol appears to be best suited for patient management.

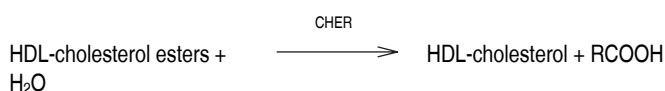
A variety of methods are available to determine HDL-cholesterol, including ultracentrifugation (reference method in combination with cholesterol measurement by the Abell-Kendall method), electrophoresis, HPLC, precipitation, and direct methods.⁶ Of these, the direct methods are used routinely. Roche HDLC4 is also a direct method. The automated HDLC4 assay uses detergents, cholesterol esterase (CHER), cholesterol oxidase (CHOD) and peroxidase to form a colored pigment that is measured optically.^{7,8}

The HDLC4 assay meets the 1998 National Institutes of Health (NIH) / National Cholesterol Education Program (NCEP) goals for precision and accuracy.^{9,10}

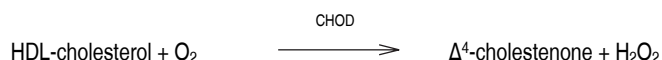
Test principle^{7,8}

Homogeneous enzymatic colorimetric test.

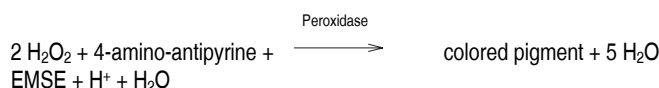
Non-HDL lipoproteins such as LDL, VLDL and chylomicrons are combined with polyanions and a detergent forming a water-soluble complex. In this complex the enzymatic reaction of CHER and CHOD towards non-HDL lipoproteins is blocked. Finally only HDL-particles can react with CHER and CHOD. The concentration of HDL-cholesterol is determined enzymatically by CHER and CHOD. Cholesterol esters are broken down quantitatively into free cholesterol and fatty acids by CHER.



In the presence of oxygen, cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase to Δ^4 -cholestenone and hydrogen peroxide.



In the presence of peroxidase, the hydrogen peroxide generated reacts with 4-amino-antipyrine and EMSE^{a)} to form a dye. The color intensity of this dye is directly proportional to the cholesterol concentration and is measured photometrically.



a) N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N'-succinylethylenediamine

Reagents - working solutions

R1 TAPSO^{b)} buffer: 62.1 mmol/L, pH 7.77; polyanion: 1.25 g/L; EMSE: 1.08 mmol/L; ascorbate oxidase (cucurbita): $\geq 50 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (horseradish): $\geq 166.7 \mu\text{kat/L}$; detergent; BSA: 2.0 g/L; preservative

R2 Bis-Tris^{c)} buffer: 20.1 mmol/L, pH 6.70; cholesterol esterase (microorganism): $\geq 7.5 \mu\text{kat/L}$; cholesterol oxidase (recombinant E. coli): $\geq 7.17 \mu\text{kat/L}$; cholesterol oxidase (microorganism): $\geq 76.7 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (horseradish): $\geq 333 \mu\text{kat/L}$; 4-amino-antipyrine: 1.48 mmol/L; BSA: 3.0 g/L; detergents; preservative

b) 2-Hydroxy-N-tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropanesulfonic acid

c) Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methane

R1 is in position B and R2 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

Reagent handling

Ready for use

The intrinsic color of the reagent does not interfere with the test.

Storage and stability

HDLC4

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

HDLC4

HDL-Cholesterol Gen.4



Only the specimens listed below were tested and found acceptable.
Serum.

Plasma: Li-heparin, K₂- and K₃-EDTA plasma.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Collect blood by using an evacuated tube or syringe. Specimens should preferably be analyzed on the day of collection.

Fasting and non-fasting samples can be used.^{11,12}

Stability in serum:	72 hours at 15-25 °C ¹³
	7 days at 2-8 °C ¹³
	12 months at -20 °C ¹⁴
	24 months at -70 °C ¹⁵

Stability in Li-heparin, K ₂ - and K ₃ -EDTA plasma:	72 hours at 15-25 °C ¹³
	7 days at 2-8 °C ¹³
	3 months at (-15)-(-25) °C ¹³
	18 months at -70 °C ¹³
	18 months at -80 °C ¹⁶

It is reported that EDTA stabilizes lipoproteins.¹⁷

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10/6-33		
Wavelength (sub/main)	700/600 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mmol/L (mg/dL)		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	120 µL	–	
R2	40 µL	–	
Sample volumes			
	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2.4 µL	–	–
Decreased	12.5 µL	15 µL	135 µL
Increased	2.4 µL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10/10-47

Wavelength (sub/main)	700/600 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mmol/L (mg/dL)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	120 µL	–
R2	40 µL	–

Sample volumes		Sample dilution	
	Sample	Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2.4 µL	–	–
Decreased	12.5 µL	15 µL	135 µL
Increased	2.4 µL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10/10-47	
Wavelength (sub/main)	700/600 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mmol/L (mg/dL)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	120 µL	–
R2	40 µL	–

Sample volumes		Sample dilution	
	Sample	Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2.4 µL	–	–
Decreased	12.5 µL	15 µL	135 µL
Increased	2.4 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O
	S2: C.f.a.s. Lipids
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration
	• after reagent lot change
	• as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against the designated CDC reference method (ultracentrifugation method).⁹ The standardization meets the requirements of the "HDL Cholesterol Method Evaluation Protocol for Manufacturers" of the US National Reference System for Cholesterol, CRMLN (Cholesterol Reference Method Laboratory Network), November 1994.¹³

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Quality control materials are intended for use only as monitors of accuracy and precision.

HDLC4

HDL-Cholesterol Gen.4



Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors: mmol/L x 38.66 = mg/dL
mg/dL x 0.0259 = mmol/L

Limitations - interference¹⁸

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at a HDL-cholesterol concentration of 1 mmol/L (38.7 mg/dL).

Icterus:¹⁹ No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 μ mol/L or 60 mg/dL).

Hemolysis:¹⁹ No significant interference up to an H index of 1200 (approximate hemoglobin concentration: 745 μ mol/L or 1200 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹⁹ No significant interference up to an L index of 2000. No significant interference from native triglycerides up to 13.7 mmol/L or 1200 mg/dL. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Other: Elevated concentrations of free fatty acids and denatured proteins may cause falsely elevated HDL-cholesterol results.

Ascorbic acid up to 2.84 mmol/L (50 mg/dL) does not interfere.

Abnormal liver function affects lipid metabolism; consequently, HDL and LDL results are of limited diagnostic value. In some patients with abnormal liver function, the HDL-cholesterol result may significantly differ from the DCM (designated comparison method) result due to the presence of lipoproteins with abnormal lipid distribution.²⁰

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{21,22}

Statins (Simvastatin) and fibrates (Bezafibrate) tested at therapeutic concentration ranges did not interfere.

N-acetylcysteine: No significant interference up to a N-acetylcysteine concentration of 2.76 mmol/L (450 mg/L).

Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-acetylcysteine. N-acetylcysteine at the therapeutic concentration when used as an antidote and the acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low HDL-cholesterol results.

Metamizole: Venipuncture should be performed prior to the administration of metamizole. Venipuncture immediately after or during the administration of metamizole may lead to falsely low results.

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.²³

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is not required.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

0.08-3.88 mmol/L (3.09-150 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 0.08 mmol/L (3.09 mg/dL)
Limit of Detection = 0.08 mmol/L (3.09 mg/dL)
Limit of Quantitation = 0.08 mmol/L (3.09 mg/dL)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is the lowest analyte concentration that can be reproducibly measured with a precision of $\leq 30\%$ CV. It has been determined using low concentration HDL-cholesterol samples.

Expected values

	No risk	Moderate risk	High risk
Females ^{24,25,26}	> 1.68 mmol/L (> 65 mg/dL)	1.15-1.68 mmol/L (45-65 mg/dL)	< 1.15 mmol/L (< 45 mg/dL)
Males ^{24,25,26}	> 1.45 mmol/L (> 55 mg/dL)	0.90-1.45 mmol/L (35-55 mg/dL)	< 0.90 mmol/L (< 35 mg/dL)

National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines:²⁷

< 40 mg/dL: Low HDL-cholesterol (major risk factor for CHD)

≥ 60 mg/dL: High HDL-cholesterol ("negative" risk factor for CHD)

HDL-cholesterol is affected by a number of factors, e.g. smoking, exercise, hormones, sex and age.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

National Cholesterol Education Program (NCEP) guidelines are based on serum values. When classifying patients, serum or serum equivalent values should be used. Therefore the NCEP recommends using a factor of 1.03 to convert EDTA plasma values to serum values. A later study found EDTA plasma concentrations to be 4.7 % lower than those in serum.²⁸ To comply with the 1998 NCEP goal of a bias < 5 % it is recommended that each laboratory validates this conversion factor and enters it into the test parameters for HDL-cholesterol.²⁹

Treatment goals for non-HDL-cholesterol have been proposed:²

	NCEP ATP III	ADA/AHA Guidelines for patients with increased cardiometabolic risk
Optional goal for very-high/highest risk patients (known CVD, diabetes with elevated risk)	< 3.37 mmol/L (< 130 mg/dL)	< 2.59 mmol/L (< 100 mg/dL)
Optional goal for those with established cardiovascular disease and multiple major risk factors	< 2.59 mmol/L (< 100 mg/dL)	
Optional goal for high-risk patients, CHD-risk-equivalent (Framingham 10-year risk score > 20 %/10 years, diabetes without other major risk factors)	< 3.37 mmol/L (< 130 mg/dL)	< 3.37 mmol/L (< 130 mg/dL)

HDLC4

HDL-Cholesterol Gen.4

cobas®

Optional goal for moderately-high/intermediate risk patients (≥ 2 major CVD risk factors, Framingham 10-year risk score from 10-20 %)

< 4.14 mmol/L
(< 160 mg/dL)

< 3.37 mmol/L
(< 130 mg/dL)

Optional goal for high-risk patients, CHD-risk-equivalent (Framingham 10-year risk score > 20 %/10 years, diabetes without other major risk factors)

< 3.37 mmol/L
(< 130 mg/dL)

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Repeatability and intermediate precision were determined using human samples and controls in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5 requirements (4 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

Repeatability	Mean	SD	CV
	mmol/L (mg/dL)	mmol/L (mg/dL)	%
PCCC Multi 1	0.73 (28.2)	0.004 (0.15)	0.6
PCCC Multi 2	1.76 (68.0)	0.01 (0.39)	0.6
Human serum 1	0.25 (9.67)	0.004 (0.15)	1.8
Human serum 2	1.05 (40.6)	0.01 (0.39)	0.7
Human serum 3	1.53 (59.1)	0.01 (0.39)	0.5
Human serum 4	2.05 (79.3)	0.01 (0.39)	0.6
Human serum 5	3.66 (141)	0.02 (0.77)	0.6
Intermediate precision	Mean	SD	CV
	mmol/L (mg/dL)	mmol/L (mg/dL)	%
PCCC Multi 1	0.73 (28.2)	0.01 (0.27)	1.0
PCCC Multi 2	1.72 (66.5)	0.02 (0.77)	1.4
Human serum 1	0.25 (9.67)	0.01 (0.19)	2.2
Human serum 2	1.05 (40.6)	0.01 (0.39)	0.8
Human serum 3	1.53 (59.1)	0.01 (0.39)	0.7
Human serum 4	2.05 (79.3)	0.02 (0.77)	0.8
Human serum 5	3.66 (141)	0.03 (1.16)	0.8

PCCC = PreciControl ClinChem

Method comparison

HDL-cholesterol values for human serum and plasma samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 701 analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (x).

Sample size (n) = 59

Passing/Bablok³⁰ Linear regression

$y = 1.006x + 0.032$ mmol/L $y = 1.012x + 0.021$ mmol/L

$r = 0.994$ $r = 1.000$

The sample concentrations were between 0.11 and 3.69 mmol/L (4.25 and 143 mg/dL).

HDL-cholesterol values for human serum and plasma samples obtained on a COBAS INTEGRA 400 plus analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (x).

Sample size (n) = 118

Passing/Bablok³⁰ Linear regression

$y = 0.980x + 0.013$ mmol/L $y = 0.988x + 0.001$ mmol/L

$r = 0.973$ $r = 0.998$

The sample concentrations were between 0.08 and 3.83 mmol/L (3.09 and 148 mg/dL).

HDL-cholesterol values for human serum samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined using the HDL Ultra Cholesterol Reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Sample size (n) = 111

Passing/Bablok³⁰ Linear regression

$y = 0.957x - 0.024$ mmol/L $y = 0.961x - 0.033$ mmol/L

$r = 0.944$ $r = 0.995$

The sample concentrations were between 0.13 and 3.86 mmol/L (5.03 and 149 mg/dL).

References

- Dominiczak M, McNamara J. The system of Cardiovascular prevention. 103.125; Nauk M, Wiebe D, Warnick G. Measurement of High-Density-Lipoprotein Cholesterol. 221.244. In: Handbook of Lipoprotein Testing (eds. Rifai, Warnick and Dominiczak), 2nd edition.
- Blaha MJ, Blumenthal RS, Brinton EA, et al. The importance of non-HDL cholesterol reporting in lipid management. J Clin Lipidol 2008 Aug;2(4):267-73.
- Boekholdt SM, Arsenault BJ, Mora S, et al. Association of LDL cholesterol, non-HDL cholesterol, and apolipoprotein B levels with risk of cardiovascular events among patients treated with statins: a meta-analysis. JAMA 2012 Mar 28;307(12):1302-9.
- Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2014;63:2889-2934.
- Rohatgi A, Khera A, Berry JD, et al. HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. N Engl J Med 2014 Dec 18;371(25):2383-93.
- Langlois MR, Bleton VH. Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: Impact on clinical and laboratory practice. Clin Chimica Acta 2006;369:168-178.
- Miida T, Nishimura K, Okamura T, et al. Validation of homogeneous assays for HDL-cholesterol using fresh samples from healthy and diseased subjects. Atherosclerosis 2014;233(1):253-9.
- Katayama Y, Soya H, Fujinaka M, et al. Evaluation of New Homogeneous Assay Kit to Determine HDL-C with a High Reactivity with Cholesterol in Various Types of HDL. AACC Meeting 2009, Poster Abstract B-103.
- Kimberly M, Leary E, Cole T, et al. Selection, Validation, Standardization and Performance of a Designated Comparison Method for HDL-Cholesterol for Use in the Cholesterol Reference Method Laboratory Network. Clin Chem 1999;45:1803-1812.
- Saraf S, Ray KK. Guidelines in the USA, a viewpoint contrary to those guidelines in Europe, Canada, Britain and the International Atherosclerosis Society. Curr Opin Lipidol 2014 Dec;25(6):413-7.
- Sidhu D, Naugler C. Fasting time and lipid levels in a community-based population: A cross sectional study. Arch. Intern. Med. Dec 10, 2012; 172(22):1707-10.
- Ontario Community Laboratory Guideline for Adult Lipid Testing (CLP017) 2013.
- Data on file at Roche Diagnostics.
- Jansen EHL, Beekhof PK, Schenk E. Long Term Stability of Lipid Metabolism in Frozen Human Serum: Triglycerides, Free Fatty Acids, Total-, HDL- and LDL-cholesterol, Apolipoprotein-A1 and B. J Mol Biomark Diagn 2014;5:4.

HDLC4

HDL-Cholesterol Gen.4

cobas®



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



- 15 Shih WJ, Bachorik PS, Haga JA, et al. Estimating the Long-Term Effects of Storage at -70°C on Cholesterol, Triglyceride, and HDL-Cholesterol Measurements in Stored Sera. Clin Chem 2000 Mar;46(3):351-64.
- 16 Kronenberg F, Lobentanz EM, König P, et al. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. J Lipid Res. 1994 Jul;35(7):1318-28.
- 17 Cooper GR, Myers GL, Smith SJ, et al. Standardization of Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Measurements. Clin Chem 1988;34(8B):B95-B105.
- 18 Kadri N, Douville P, Lachance P. Letter to editor. Clin Chem 2002;48:964.
- 19 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 20 Dati F, Metzmann E. Proteins Laboratory Testing and Clinical Use, Verlag: DiaSys; 1. Auflage (September 2005), page 242-243; ISBN-10: 3000171665.
- 21 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 22 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 23 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 24 Thomas L, ed. Labor und Diagnose, 4th ed. Marburg: Die Medizinische Verlagsgesellschaft 1992;208.
- 25 Assmann G. At what levels of total low- or high-density lipoprotein cholesterol should diet/drug therapy be initiated? European guidelines. Amer J Cardiol 1990;65:11F.
- 26 Assmann G, Schriewer H, Schmitz G, et al. Quantification of high-density-lipoprotein cholesterol by precipitation with phosphotungstic acid/MgCl₂. Clin Chem 1983;29(12):2026-2030.
- 27 Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication No 01-3670; May 2001.
- 28 Cloey T, Bachorik PS, Becker D, et al. Reevaluation of Serum-Plasma Differences in Total Cholesterol Concentration. JAMA 1990 May 23-30;263(20):2788-9.
- 29 National Cholesterol Education Program Recommendations for Measurement of High-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. Clin Chem 1995;41:1427-1433.
- 30 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS C and COBAS INTEGRA are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2017, Roche Diagnostics

ANNEXE 10 : Fiche technique du cholestérol LDL

LDLC3

LDL-Cholesterol Gen.3

cobas®

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
07005717 190	LDL-Cholesterol Gen.3 (200 tests)	System-ID 07 7565 7 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
12172623 122	Calibrator f.a.s. Lipids (3 x 1 mL)	Code 424
10781827 122	Precinorm L (4 x 3 mL)	Code 304
11778552 122	Precipath HDL/LDL-C (4 x 3 mL)	Code 319
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

LDLC3: ACN 552

For **cobas c** 502 analyzer:

LDLC3: ACN 8552

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of LDL-cholesterol in human serum and plasma on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary

Low Density Lipoproteins (LDL) play a key role in causing and influencing the progression of atherosclerosis and, in particular, coronary sclerosis.^{1,2} The LDLs are derived from VLDLs (Very Low Density Lipoproteins) rich in triglycerides by the action of various lipolytic enzymes and are synthesized in the liver. The elimination of LDL from plasma takes place mainly by liver parenchymal cells via specific LDL receptors. Elevated LDL concentrations in blood and an increase in their residence time coupled with an increase in the biological modification rate results in the destruction of the endothelial function and a higher LDL-cholesterol uptake in the monocyte/macrophage system as well as by smooth muscle cells in vessel walls. The majority of cholesterol stored in atherosclerotic plaques originates from LDL. The LDL-cholesterol value is the most powerful clinical predictor among all of the single parameters with respect to coronary atherosclerosis. Therefore, therapies focusing on lipid reduction primarily target the reduction of LDL-cholesterol which is then expressed in an improvement of the endothelial function, prevention of atherosclerosis and reducing its progression as well as preventing plaque rupture.

Various methods are available for the determination of LDL-cholesterol such as ultracentrifugation as the reference method, lipoprotein electrophoresis, HPLC and precipitation methods.^{3,4} In the precipitation methods apolipoprotein B-containing LDL-cholesterol is, for example, precipitated using either polyvinyl sulfate, dextran sulfate or polycyclic anions. The LDL-cholesterol content is usually calculated from the difference between total cholesterol and cholesterol in the remainder (VLDL and HDL-cholesterol) in the supernate after precipitation with polyvinyl sulfate and dextran sulfate.⁵ Lipid Research Clinics recommend a combination of ultracentrifugation and precipitation methods using polyanions in the presence of divalent cations. The precipitation methods are, however, time-consuming, cannot be automated and are susceptible to interference by hyperlipidemic serum, particularly at high concentrations of free fatty acids. A more recent method is based on the determination of LDL-cholesterol after the sample is subjected to immunoadsorption and centrifugation.⁶

The calculation of the LDL-cholesterol concentration according to Friedewald's formula is based on two cholesterol determinations (total cholesterol and HDL-cholesterol) and one triglyceride determination.⁷

Friedewald's formula for calculation of LDL-C presumes that a direct relationship exists between VLDL-cholesterol and triglycerides in fasting blood samples (VLDL-cholesterol = Trig./5 mg/dL, VLDL-cholesterol = Trig./2.2 mmol/L). The bias in calculating LDL-C using this assumption is only acceptable in samples with a triglyceride concentration < 2.0 mmol/L (177 mg/dL).^{8,9} Even in the presence of small amounts of chylomicrons or abnormal lipoproteins, the formula gives rise to artificially low LDL-cholesterol values. Non-fasting samples cannot be used for the calculation

of LDL-C because they contain a high concentration of chylomicrons and in many cases the limit of acceptable triglyceride concentration is exceeded.

For these reasons, a simple and reliable method for routine measurement of LDL-cholesterol without any preparatory steps was developed. This automated method for the direct determination of LDL-cholesterol takes advantage of the selective micellar solubilization of LDL-cholesterol by a nonionic detergent and the interaction of a sugar compound and lipoproteins (VLDL and chylomicrons). When a detergent is included in the enzymatic method for cholesterol determination (cholesterol esterase - cholesterol oxidase coupling reaction), the relative reactivities of cholesterol in the lipoprotein fractions increase in this order: HDL < chylomicrons < VLDL < LDL.

The combination of a sugar compound with detergent enables the selective determination of LDL-cholesterol in serum and plasma samples.

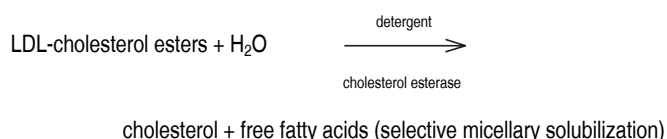
Non-fasting sample results are slightly lower than fasting results.

Comparable non-fasting results were observed with the beta quantification method.¹⁰ This direct assay meets the 1995 NCEP goals of < 4 % total CV, bias ≤ 4 % versus reference method, and ≤ 12 % total analytical error.^{11,12,13,14}

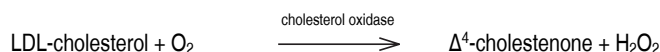
Test principle

Homogeneous enzymatic colorimetric assay

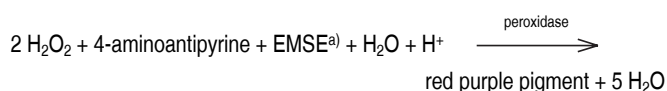
Cholesterol esters and free cholesterol in LDL are measured on the basis of a cholesterol enzymatic method using cholesterol esterase and cholesterol oxidase in the presence of surfactants which selectively solubilize only LDL. The enzyme reactions to the lipoproteins other than LDL are inhibited by surfactants and a sugar compound. Cholesterol in HDL, VLDL and chylomicron is not determined.



Cholesterol esters are broken down quantitatively into free cholesterol and fatty acids by cholesterol esterase.



In the presence of oxygen, cholesterol is oxidized by cholesterol oxidase to Δ^4 -cholestenone and hydrogen peroxide.



a) N-ethyl-N-(3-methylphenyl)-N-succinylethylenediamine

In the presence of peroxidase, the hydrogen peroxide generated reacts with 4-aminoantipyrine and EMSE to form a red purple dye. The color intensity of this dye is directly proportional to the cholesterol concentration and is measured photometrically.

LDLC3

LDL-Cholesterol Gen.3

cobas®

Reagents - working solutions

R1 Bis-tris^{b)} buffer: 20.1 mmol/L, pH 7.0; 4-aminoantipyrine: 0.98 mmol/L; ascorbate oxidase (AOD, Acremonium spec.): $\geq 66.7 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (recombinant from Basidiomycetes): $\geq 166.7 \mu\text{kat/L}$; BSA: 4.0 g/L; preservative

R2 MOPS^{c)} buffer: 20.1 mmol/L, pH 7.0; EMSE: 2.16 mmol/L; cholesterol esterase (Pseudomonas spec.): $\geq 33.3 \mu\text{kat/L}$; cholesterol oxidase (recombinant from E. coli): $\geq 31.7 \mu\text{kat/L}$; peroxidase (recombinant from Basidiomycetes): $\geq 333.3 \mu\text{kat/L}$; BSA: 4.0 g/L; detergents; preservative

b) bis(2-hydroxyethyl)-amino-tris-(hydroxymethyl)-methane

c) 3-morpholinopropane-1-sulfonic acid

R1 is in position B and R2 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Warning

H317 May cause an allergic skin reaction.

Prevention:

P261 Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.

P272 Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace.

P280 Wear protective gloves.

Response:

P333 + P313 If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Disposal:

P501 Dispose of contents/container to an approved waste disposal plant.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

LDLC3

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum

Plasma: Li-heparin, K₂- and K₃-EDTA plasma.

Fasting and non-fasting samples can be used.⁶

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Stability: ^{15,16}	7 days at 2-8 °C
	12 months at -20 °C
	12 months at -70 °C

It is reported that EDTA stabilizes lipoproteins.¹³

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

See "Order information" section

General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 6-31
Wavelength (sub/main)	700/600 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)

Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)
R1	150 μL	–
R2	50 μL	–

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 μL	–	–
Decreased	10 μL	15 μL	135 μL
Increased	2 μL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 10-47
Wavelength (sub/main)	700/600 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)

LDLC3

LDL-Cholesterol Gen.3

cobas®

Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	150 µL	–	
R2	50 µL	–	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	10 µL	15 µL	135 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End
Reaction time / Assay points	10 / 10-47
Wavelength (sub/main)	700/600 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)

Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	150 µL	–	
R2	50 µL	–	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	10 µL	15 µL	135 µL
Increased	4 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: C.f.a.s. Lipids
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration - after reagent lot change - as required following quality control procedures

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against the beta quantification method as defined in the recommendations in the LDL Cholesterol Method Certification Protocol for Manufacturers.¹⁷

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors: mmol/L × 38.66 = mg/dL
mmol/L × 0.3866 = g/L

Limitations – interference

Criterion: Recovery within ± 0.40 mmol/L of initial values of samples ≤ 4.0 mmol/L and within ± 10 % for samples > 4.0 mmol/L.

Icterus:¹⁸ No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 µmol/L or 60 mg/dL).

Hemolysis:¹⁸ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 621 µmol/L or 1000 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹⁸ No significant interference up to an L index of 1000. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

No significant interference from HDL-C (≤ 3.03 mmol/L or ≤ 117 mg/dL), VLDL-C (≤ 3.63 mmol/L or ≤ 140 mg/dL), or chylomicrons (≤ 22.6 mmol/L or ≤ 2000 mg/dL triglycerides).

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{19,20}

Nicotinic acid (Niacin), statins (Simvastatin) and fibrates (Clofibrate) tested at therapeutic concentration ranges did not interfere.

Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-acetylcysteine. N-acetylcysteine at the therapeutic concentration when used as an antidote and the acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low LDL-C results. Venipuncture should be performed prior to the administration of metemazole. Venipuncture immediately after or during the administration of metemazole may lead to falsely low results.

Ascorbic acid up to 28.4 mmol/L (500 mg/dL) does not interfere.

Abnormal liver function affects lipid metabolism; consequently HDL and LDL results are of limited diagnostic value. In some patients with abnormal liver function, the LDL-cholesterol result is significantly negatively biased versus beta quantification results.

EDTA plasma may cause decreased values compared to serum.²¹

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.²²

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is not required.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

0.10-14.2 mmol/L (3.87-549 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection, and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 0.10 mmol/L (3.87 mg/dL)

Limit of Detection = 0.10 mmol/L (3.87 mg/dL)

Limit of Quantitation = 0.10 mmol/L (3.87 mg/dL)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A2 requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from n ≥ 60 measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank

LDLC3

LDL-Cholesterol Gen.3



corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation for LDL-C is 0.10 mmol/L determined in accordance with the guidelines in CLSI document EP17-A2, based on a minimum of 48 determinations, and a total error goal of 10 % calculated using RMS error model.

Expected values²³

Levels in terms of risk for coronary heart disease.

Adult levels:

Optimal	< 2.59 mmol/L (< 100 mg/dL)
Near optimal/above optimal	2.59-3.34 mmol/L (100-129 mg/dL)
Borderline high	3.37-4.12 mmol/L (130-159 mg/dL)
High	4.14-4.89 mmol/L (160-189 mg/dL)
Very high	≥ 4.92 mmol/L (≥ 190 mg/dL)

Risk classification of patients and treatment therapies are described in international guidelines.²⁴

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Repeatability and intermediate precision were determined using human samples and controls in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5 requirements (4 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

Repeatability	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm L	2.69 (104)	0.02 (1)	0.7
Precipath HDL/LDL-C	4.93 (191)	0.03 (1)	0.7
Human serum 1	0.302 (11.7)	0.004 (0.2)	1.2
Human serum 2	2.93 (113)	0.02 (1)	0.7
Human serum 3	7.83 (303)	0.06 (2)	0.7
Human serum 4	3.67 (142)	0.03 (1)	0.7
Human serum 5	13.6 (526)	0.1 (4)	0.8
Intermediate precision	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm L	2.69 (104)	0.06 (2)	2.3
Precipath HDL/LDL-C	5.02 (194)	0.11 (4)	2.1
Human serum 1	0.316 (12.2)	0.008 (0.3)	2.5
Human serum 2	3.03 (117)	0.06 (2)	2.1
Human serum 3	8.14 (315)	0.16 (6)	1.9
Human serum 4	3.71 (143)	0.08 (3)	2.1
Human serum 5	13.7 (530)	0.3 (12)	2.0

Method comparison

LDL cholesterol values for human serum samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared to those determined using the previous reagent (LDL_C) on the same analyzer (x). Sample size (n) = 100

Passing/Bablok²⁵

$$y = 0.984x - 0.019 \text{ mmol/L}$$

$$r = 0.919$$

Linear regression

$$y = 0.971x + 0.043 \text{ mmol/L}$$

$$r = 0.999$$

The sample concentrations were between 0.129 and 13.8 mmol/L (4.99 and 534 mg/dL).

LDL cholesterol values for human serum samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared to those determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi **cobas c** 701 analyzer (x).

Sample size (n) = 167

Passing/Bablok²⁵

$$y = 0.988x + 0.021 \text{ mmol/L}$$

$$r = 0.937$$

Linear regression

$$y = 0.982x + 0.047 \text{ mmol/L}$$

$$r = 0.999$$

The sample concentrations were between 0.180 and 14.2 mmol/L (6.926 and 549 mg/dL).

References

- Rifai N, Warnick GR, McNamara JR, et al. Measurement of Low-Density-Lipoprotein Cholesterol in Serum: a Status Report. Clin Chem 1992;38:150-160.
- Naito HK, Strong JP, Scott MG, et al. Atherogenesis: current topics on etiology and risk factors. Clin Chem 1995;41:132-133.
- Wieland H, Seidel D. Quantitative Lipoprotein Electrophoresis. In: Handbook of Electrophoresis, Vol III, ed. Lewis A, Boca Raton: CRC Press 1983;83-102.
- Bachorik PS. Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. AACC Press 2000;12:245-263.
- Armstrong V, Seidel D. Evaluation of a Commercial Kit for the Determination of LDL-Cholesterol in Serum Based on Precipitation of LDL with Dextran Sulfate. Arztl Lab 1985;31:325-330.
- Pisani T, Gebiski CP, Leary ET, et al. Accurate Direct Determination of Low-density Lipoprotein Cholesterol Using an Immunoseparation Reagent and Enzymatic Cholesterol Assay. Arch Pathol Lab Med 1995 Dec;119(12):1127-1135.
- Friedewald WF, Levy RI, Frederickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. Clin Chem. 1972;18(6):499-502.
- van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Stek S, Tax M, et al. Measuring LDL-cholesterol: are we doing it wrong? Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012;37:221-222.
- Tighe DA, Ockene IS, Reed G, et al. Calculated low density lipoprotein cholesterol levels frequently underestimate directly measured low density lipoprotein cholesterol determinations in patients with serum triglyceride levels ≤ 4.52 mmol/L: An analysis comparing the LipiDirect® magnetic LDL assay with the Friedewald calculation. Clinica Chimica Acta 365 (2006):236-242.
- Cohn JS, McNamara JR, Schaefer EJ. Lipoprotein Cholesterol Concentrations in the Plasma of Human Subjects as Measured in the Fed and Fasted States. Clin Chem 1988;34:2456-2459.
- National Cholesterol Education Program. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). NIH Publication No. 93-3095 1995.
- Bachorik PS, Ross JW. National cholesterol education program recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol: executive summary. Clin Chem 1995;41:1414-1420.
- Cooper GR, Myers GL, Smith SJ, et al. Standardization of Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Measurements. Clin Chem 1988;34(8B):B95-B105.
- Data on file at Roche Diagnostics.
- WHO Publication: Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:Jan 2002.

LDLC3

LDL-Cholesterol Gen.3

- 16 Jansen EHL, Beekhof PK, Schenk E. Long Term Stability of Lipid Metabolism in Frozen Human Serum: Triglycerides, Free Fatty Acids, Total-, HDL- and LDL-cholesterol, Apolipoprotein-A1 and B. J Mol Biomark Diagn 2014;5:4.
- 17 LDL Cholesterol Method Certification Protocol for Manufacturers. National Reference System for Cholesterol. Cholesterol Reference Method Laboratory Network 1997, October.
- 18 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 19 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 20 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 21 Rifai N, Dufour RD, Cooper GR. Preanalytical Variation in Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Testing. In: Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH, eds. Handbook of Lipoprotein Testing. 2nd ed. Washington, AACC Press; 2000. p. 161-176.
- 22 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 23 Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). NIH Publication No 01-3670; May 2001.
- 24 Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol 2014;63:2889-2934.
- 25 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2017, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



ANNEXE 11 :Fiche technique des triglycérides

Triglycerides

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
20767107 322	Triglycerides (250 tests)	System-ID 07 6710 7 cobas c 311, cobas c 501/502
10759350 190	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL)	Code 401
10759350 360	Calibrator f.a.s. (12 x 3 mL, for USA)	Code 401
10171743 122	Precinorm U (20 x 5 mL)	Code 300
10171735 122	Precinorm U (4 x 5 mL)	Code 300
12149435 122	Precinorm U plus (10 x 3 mL)	Code 300
12149435 160	Precinorm U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 300
10781827 122	Precinorm L (4 x 3 mL)	Code 304
10171778 122	Precipath U (20 x 5 mL)	Code 301
10171760 122	Precipath U (4 x 5 mL)	Code 301
12149443 122	Precipath U plus (10 x 3 mL)	Code 301
12149443 160	Precipath U plus (10 x 3 mL, for USA)	Code 301
11285874 122	Precipath L (4 x 3 mL)	Code 305
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05947626 160	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL, for USA)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
05947774 160	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL, for USA)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c 311/501** analyzers:

TRIGL: ACN 781

For **cobas c 502** analyzer:

TRIGL: ACN 8781

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of triglycerides in human serum and plasma on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3,4,5,6}

Triglycerides are esters of the trihydric alcohol glycerol with 3 long-chain fatty acids. They are partly synthesized in the liver and partly ingested in food.

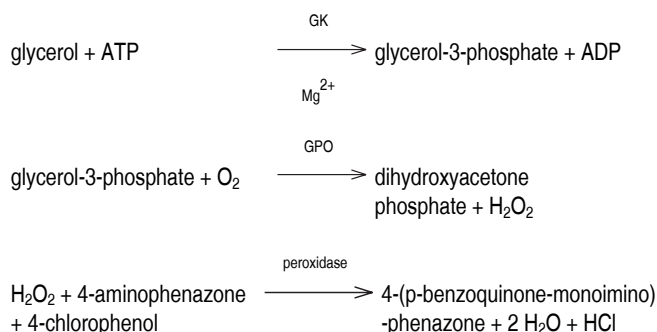
The determination of triglycerides is utilized in the diagnosis and treatment of patients having diabetes mellitus, nephrosis, liver obstruction, lipid metabolism disorders and numerous other endocrine diseases.

The enzymatic triglycerides assay as described by Eggstein and Kreutz still required saponification with potassium hydroxide. Numerous attempts were subsequently made to replace alkaline saponification by enzymatic hydrolysis with lipase. Bucolo and David tested a lipase/protease mixture; Wahlefeld used an esterase from the liver in combination with a particularly effective lipase from *Rhizopus arrhizus* for hydrolysis.

This method is based on the work by Wahlefeld using a lipoprotein lipase from microorganisms for the rapid and complete hydrolysis of triglycerides to glycerol followed by oxidation to dihydroxyacetone phosphate and hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide produced then reacts with 4-aminophenazone and 4-chlorophenol under the catalytic action of peroxidase to form a red dyestuff (Trinder endpoint reaction). The color intensity of the red dyestuff formed is directly proportional to the triglyceride concentration and can be measured photometrically.

Test principle⁶

Enzymatic colorimetric test.



Reagents - working solutions

R1 PIPES buffer: 50 mmol/L, pH 6.8; Mg^{2+} : 40 mmol/L; sodium cholate: 0.20 mmol/L; ATP: ≥ 1.4 mmol/L; 4-aminophenazone: ≥ 0.13 mmol/L; 4-chlorophenol: 4.7 mmol/L; lipoprotein lipase (*Pseudomonas spec.*): ≥ 83 $\mu\text{kat/L}$; glycerol kinase (*Bacillus stearothermophilus*): ≥ 3 $\mu\text{kat/L}$; glycerol phosphate oxidase (*E. coli*): ≥ 41 $\mu\text{kat/L}$; peroxidase (horseradish): ≥ 1.6 $\mu\text{kat/L}$; preservative, stabilizers

R1 is in position B.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

For USA: Caution: Federal law restricts this device to sale by or on the order of a physician.

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability**TRIGL**

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On board in use and refrigerated on the analyzer: 8 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum

Plasma: Li-heparin and K₂-EDTA plasma.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Sample stability claims were established by experimental data by the manufacturer or based on reference literature and only for the temperatures/time frames as stated in the method sheet. It is the responsibility of the individual laboratory to use all available references and/or its own studies to determine specific stability criteria for its laboratory.

Stability in serum:	2 days at 20-25 °C ⁷
	10 days at 4 °C ⁸
	3 months at -20 °C ⁹
	several years at -70 °C ⁹
Stability in plasma:	2 days at 20-25 °C ⁷
	15 days at 4 °C ¹⁰
	3 months at -20 °C ⁹
	several years at -70 °C ⁹

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

See "Order information" section

General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma**cobas c 311 test definition**

Assay type	1-Point
Reaction time / Assay points	10 / 57

Wavelength (sub/main)	700 / 505 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	120 µL 28 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	4 µL	15 µL	135 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	1-Point
Reaction time / Assay points	10 / 70
Wavelength (sub/main)	700 / 505 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	120 µL 28 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	4 µL	15 µL	135 µL
Increased	2 µL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	1-Point
Reaction time / Assay points	10 / 70
Wavelength (sub/main)	700 / 505 nm
Reaction direction	Increase
Units	mmol/L (mg/dL, g/L)
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)
R1	120 µL 28 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	2 µL	–	–
Decreased	4 µL	15 µL	135 µL
Increased	4 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O
	S2: C.f.a.s.
Calibration mode	Linear
Calibration frequency	2-point calibration
	- after reagent lot change - as required following quality control procedures

Triglycerides

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against the ID/MS method.

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors:

mmol/L x 88.5 = mg/dL mmol/L x 0.885 = g/L

mg/dL x 0.0113 = mmol/L mg/dL x 0.01 = g/L

Limitations - interference

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial values at triglyceride levels of 2.3 mmol/L (203 mg/dL).

Icterus:¹¹ No significant interference up to an I index of 10 for conjugated bilirubin and 35 for unconjugated bilirubin (approximate conjugated bilirubin concentration: 171 μ mol/L or 10 mg/dL; approximate unconjugated bilirubin concentration: 599 μ mol/L or 35 mg/dL).

Hemolysis:¹¹ No significant interference up to an H index of 700 (approximate hemoglobin concentration: 434 μ mol/L or 700 mg/dL).

Lipemia:¹¹ The L index correlates with sample turbidity but not with triglycerides level. Extremely lipemic samples (triglycerides greater than 3000 mg/dL) can produce normal results¹².

Prozone Check: The flag > Kin is an indicator for extremely high triglyceride concentrations in the sample. False normal results are due to oxygen depletion during assay reaction.

Endogenous unesterified glycerol in the sample will falsely elevate serum triglycerides.

Dicynone (Etamsylate) at therapeutic concentrations may lead to false-low results.¹³

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{14,15}

Exception: Ascorbic acid and calcium dobesilate cause artificially low triglyceride results. Intralipid is directly measured as analyte in this assay and leads to high triglyceride results.

Acetaminophen intoxications are frequently treated with N-Acetylcysteine. N-Acetylcysteine at a plasma concentration above 166 mg/L and the Acetaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) independently may cause falsely low results.

Venipuncture should be performed prior to the administration of Metamizole. Venipuncture immediately after or during the administration of Metamizole may lead to falsely low results. A significant interference may occur at plasma Metamizole concentrations above 0.05 mg/mL.

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹⁶

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

0.1-10.0 mmol/L (8.85-885 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:5 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 5.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

0.1 mmol/L (8.85 mg/dL)

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Expected values according to NCEP¹⁷

Normal range: < 1.70 mmol/L (< 150 mg/dL).

Clinical interpretation according to the recommendations of the European Atherosclerosis Society: ¹⁸

	mmol/L	mg/dL	Lipid metabolism disorder
Cholesterol	< 5.18	< 200	No
Triglycerides	< 2.26	< 200	No
Cholesterol	5.18-7.77	200-300	Yes if HDL-cholesterol < 0.9 mmol/L (< 35 mg/dL)
Cholesterol	> 7.77	> 300	Yes
Triglycerides	> 2.26	> 200	Yes

Note: If the free glycerol is to be taken into account, the 0.11 mmol/L (10 mg/dL) must be subtracted from the triglycerides value obtained.⁹

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

	Repeatability		
	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm U	1.41 (125)	0.01 (1)	0.9
Precipath U	2.40 (212)	0.02 (2)	0.8
Human serum 1	1.67 (148)	0.02 (2)	1.1
Human serum 2	2.72 (241)	0.02 (2)	0.7

	Intermediate precision		
	Mean mmol/L (mg/dL)	SD mmol/L (mg/dL)	CV %
Precinorm U	1.39 (123)	0.03 (3)	2.0
Precipath U	2.33 (206)	0.04 (4)	1.6
Human serum 3	1.18 (104)	0.02 (2)	1.9
Human serum 4	2.95 (261)	0.05 (4)	1.8

Method comparison

Triglycerides values for human serum and plasma samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those

Triglycerides

determined using the corresponding reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Sample size (n) = 71

Passing/Bablok¹⁹

Linear regression

$y = 1.015x - 0.005 \text{ mmol/L}$

$y = 1.001x + 0.018 \text{ mmol/L}$

$r = 0.976$

$r = 0.999$

The sample concentrations were between 0.560 and 9.13 mmol/L (49.6 and 808 mg/dL).

References

- Greiling H, Gressner AM, eds. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag 1995.
- Eggstein M, Kreutz FH. A new determination of the neutral fats in blood serum and tissue. I. Principles, procedure, and discussion of the method. Klin Wschr 1966;44(5):262-267.
- Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. Clin Chem 1973;19(5):476-482.
- Wahlefeld AW, Bergmeyer HU, eds. Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press Inc 1974;1831.
- Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann Clin Biochem 1969;6:24-27.
- Siedel J, Schmuck R, Staepels J, et al. Long term stable, liquid ready-to-use monoreagent for the enzymatic assay of serum or plasma triglycerides (GPO-PAP method). AACC Meeting Abstract 34. Clin Chem 1993;39:1127.
- WHO Publication: Use of anticoagulants in diagnostic laboratory investigations, WHO/DIL/LAB/99.1 Rev.2:Jan 2002.
- Evans K, Mitcheson J, Laker M. Effect of Storage at 4 °C and -20 °C on Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Concentrations. Clin Chem. 1995;41:392-396.
- Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995;610-611.
- Kronenberg F, Lobentanz EM, König P, et al. Effect of sample storage on the measurement of lipoprotein[a], apolipoproteins B and A-IV, total and high density lipoprotein cholesterol and triglycerides. J Lipid Res. 1994 Jul;35(7):1318-28.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- Shephard MDS, Whiting MJ. Falsely low estimation of triglycerides in lipemic plasma by the enzymatic triglyceride method with modified Trinder's chromogen. Clin Chem 1990;36(2):325-329.
- Dastych M, Wiewiorka O, Benovska M. Ethamsylate (Dicynone) Interference in Determination of Serum Creatinine, Uric Acid, Triglycerides, and Cholesterol in Assays Involving the Trinder Reaction; In Vivo and In Vitro. Clin Lab 2014;60:1373-1376.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES Public Health Service, NIH Publication No. 01-3305, May 2001.
- Study Group, European Atherosclerosis Society. Strategies for the prevention of coronary heart disease: A policy statement of the European Atherosclerosis Society. European Heart Journal 1987;8:77.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

CONTENT

Contents of kit



Volume after reconstitution or mixing

GTIN

Global Trade Item Number

FOR US CUSTOMERS ONLY: LIMITED WARRANTY

Roche Diagnostics warrants that this product will meet the specifications stated in the labeling when used in accordance with such labeling and will be free from defects in material and workmanship until the expiration date printed on the label. THIS LIMITED WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL ROCHE DIAGNOSTICS BE LIABLE FOR INCIDENTAL, INDIRECT, SPECIAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES.

COBAS, COBAS C, PRECICONTROL, PRECINORM and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2017, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

Distribution in USA by:

Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
US Customer Technical Support 1-800-428-2336



ANNEXE 12 : Fiche techniques de la fructosamine

Fructosamine

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
04537939 190	Fructosamine 150 tests	System-ID 07 3756 9 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
11098993 122	Precimat Fructosamine (3 x 1 mL)	Code 581
11098985 122	Precinorm Fructosamine (3 x 1 mL)	Code 321
11174118 122	Precipath Fructosamine (3 x 1 mL)	Code 322

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

FRA: ACN 667

For **cobas c** 502 analyzer:

FRA: ACN 8667

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of glycosylated proteins (fructosamine) in human serum and plasma on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3,4}

Fructosamine represents non-enzymatic glycation attached to blood and tissue proteins. The formation of fructosamine is a two-step reaction, which is dependent on the glucose concentration. As a first step a Schiff Base is formed by the reversible coupling of glucose to protein which, in a second step, is transformed by non-reversible Amadori rearrangement to the corresponding ketoamine. This ketoamine is designated as fructosamine. The formation of fructosamine increases with the level of blood glucose. Metabolization occurs within 1 to 3 weeks, corresponding to the turnover of most serum proteins. The concentration of fructosamine thus reflects the average of the continuously varying blood glucose concentrations during this period, serving as a blood glucose memory.

Fructosamine is therefore a rapid indicator of glycemia in the diagnosis and management of diabetes mellitus.

Test principle

Colorimetric test by reaction with nitroblue tetrazolium.^{5,6,7}

The colorimetric test for fructosamine (glycosylated protein) is based on the ability of ketoamines to reduce nitroblue tetrazolium in alkaline medium. The rate of formation of formazan is directly proportional to the fructosamine concentration and is measured photometrically.

Reagents - working solutions

R1 Nitroblue tetrazolium: 1.2 mmol/L; uricase (microbial): $\geq 12 \mu\text{kat/L}$; pH 7.5; non-reactive buffer; stabilizer; surfactants

R2 Carbonate buffer: 1.5 mol/L; pH 10.4

R1 is in position B and R2 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

For USA: For prescription use only.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

H315 Causes skin irritation.

H318 Causes serious eye damage.

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Prevention:

P273 Avoid release to the environment.

P280 Wear eye protection/ face protection.

Response:

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.
P310 Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/ physician.

P362 + P364 Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Product safety labeling primarily follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590, USA: 1-800-428-2336

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

FRA

Shelf life at 2-8 °C:

See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 8 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable. Serum (free from hemolysis): Collect serum using standard sampling tubes. Plasma (free from hemolysis): Li-heparin and K₂-EDTA plasma

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Stability: 3 days at 15-25 °C⁸
2 weeks at 2-8 °C⁸
2 months at (-15)-(-25) °C⁹

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section
- General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 52-57
Wavelength (sub/main)	700/546 nm
Reaction direction	Increase
Unit	µmol/L
Reagent pipetting	
R1	60 µL
R2	12 µL

Diluent (H₂O)

28 µL

20 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (H ₂ O)
Normal	6 µL	–	–
Decreased	3 µL	–	–
Increased	6 µL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 63-70
Wavelength (sub/main)	700/546 nm
Reaction direction	Increase
Unit	µmol/L
Reagent pipetting	
R1	60 µL
R2	12 µL

Diluent (H₂O)

28 µL

20 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (H ₂ O)
Normal	6 µL	–	–
Decreased	3 µL	–	–
Increased	6 µL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	Rate A
Reaction time / Assay points	10 / 63-70
Wavelength (sub/main)	700/546 nm
Reaction direction	Increase
Unit	µmol/L
Reagent pipetting	
R1	60 µL
R2	12 µL

Diluent (H₂O)

28 µL

20 µL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (H ₂ O)
Normal	6 µL	–	–
Decreased	3 µL	–	–
Increased	12 µL	–	–

Calibration

Calibrators	S1: H ₂ O S2: Precimat Fructosamine
Calibration mode	Linear

Calibration frequency

2-point calibration

- after reagent lot change
- as required following quality control procedures

Traceability: This method has been standardized against fructose polylysine standard.

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Limitations – interference

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value at a fructosamine concentration of 285 µmol/L.

Icterus:¹⁰ No significant interference up to an I index of 5 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 85 µmol/L (5 mg/dL)).

Hemolysis:¹⁰ No significant interference up to an H index of 100 (approximate hemoglobin concentration: 62 µmol/L (100 mg/dL)).

Lipemia:¹⁰ No significant interference up to an L index of 1800. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{11,12}

Exception: Levodopa causes artificially high fructosamine results. Oxytetracycline causes artificially high fructosamine results.

Other: Ascorbic acid levels of up to 170 µmol/L (30 mg/L) do not significantly interfere with the test.

In hydremic states (pregnancy for instance) it may be favorable to relate fructosamine to protein using the following formula:

$$\text{Fructosamine}_{\text{corr}} = \frac{\text{measured fructosamine} \times 72}{\text{measured total protein (in g/L)}}$$

Dysproteinemic states may affect fructosamine values.⁴

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹³

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is not required.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges**Measuring range**

14-1000 µmol/L

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:2 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 2.

Lower limits of measurement

Lower detection limit of the test

14 µmol/L

The lower detection limit represents the lowest measurable analyte level that can be distinguished from zero. It is calculated as the value lying 3 standard deviations above that of the lowest standard (standard 1 + 3 SD, repeatability, n = 21).

Expected values^{6,14}

Fructosamine concentrations were determined in 555 apparently healthy subjects between the ages of 20 and 60. A reference range of 205 to 285 µmol/L was determined in this study for adults without diabetes. In a poorly controlled diabetic population, mean fructosamine values were reported to be 396 µmol/L (range 228-563 µmol/L). A fructosamine concentration above the established expected value is an indicator for hyperglycemia during the preceeding 1-3 weeks or longer.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability (n = 21) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

<i>Repeatability</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	µmol/L	µmol/L	%
Precinorm Fructosamine	262	4	1.6
Precipath Fructosamine	498	4	0.7
Human serum 1	262	2	0.9
Human serum 2	208	2	1.0
<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	µmol/L	µmol/L	%
Precinorm Fructosamine	262	4	1.5
Precipath Fructosamine	489	6	1.2
Human serum 3	266	4	1.5
Human serum 4	210	4	1.8

Method comparison

Fructosamine values for human serum and plasma samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c 501** analyzer (y) were compared with those determined on Roche/Hitachi 917/MODULAR P analyzers (x), using the corresponding Roche/Hitachi reagent.

Sample size (n) = 231

Passing/Bablok ¹⁵	Linear regression
$y = 0.968x + 15.0 \text{ µmol/L}$	$y = 0.967x + 15.5 \text{ µmol/L}$
$r = 0.946$	$r = 0.998$

The sample concentrations were between 166 and 836 µmol/L.

References

- Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. Clin Chim Acta 1983;127:87-95.
- Armbruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. Clin Chem 1987;33(12):2153-2163.
- Cefalu WT, Bell-Farrow AD, Petty M, et al. Clinical validation of a second-generation fructosamine assay. Clin Chem 1991;37:1252-1256.
- Henrichs HR, ed. European Fructosamine Workshop. Wien Klin Wochenschr Suppl 1990;180.

- Siedel J, Vogt B, Kerscher L, et al. Serum fructosamine assay: two different color reagents compared with reference to a HPLC-procedure. Clin Chem 1988;34:1316.
- Kruse-Jarres JD, Jarausch J, Lehmann P, et al. A new colorimetric method for the determination of fructosamine. Lab Med 1989;13:245-253.
- Schleicher ED, Vogt BW. Standardization of serum fructosamine assays. Clin Chem 1990;36:136-139.
- Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders 1999;797.
- Koskinen P, Irjala K. Stability of Serum Fructosamine during Storage. Clin Chem 1988;34(12):2545-2546.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- Melzi d'Eril GV, Bosini T, Solerte SB, et al. Performance and clinical significance of the new fructosamine assay in diabetic patients. Wien Klin Wochenschr Suppl 1990;180:60-63.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard.

CONTENT	Contents of kit
→	Volume after reconstitution or mixing
GTIN	Global Trade Item Number

FOR US CUSTOMERS ONLY: LIMITED WARRANTY

Roche Diagnostics warrants that this product will meet the specifications stated in the labeling when used in accordance with such labeling and will be free from defects in material and workmanship until the expiration date printed on the label. THIS LIMITED WARRANTY IS IN LIEU OF ANY OTHER WARRANTY, EXPRESS OR IMPLIED, INCLUDING ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL ROCHE DIAGNOSTICS BE LIABLE FOR INCIDENTAL, INDIRECT, SPECIAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES.

COBAS, COBAS C, PRECINORM, PRECIMAT and PRECIPATH are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2015, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

Distribution in USA by:
Roche Diagnostics, Indianapolis, IN
US Customer Technical Support 1-800-428-2336



ANNEXE 13 : Fiche technique de l'homocystéine

Homocysteine Enzymatic Assay

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
05385415 190	Homocysteine Enzymatic Assay 100 tests	System-ID 07 7487 1
05385504 190	HCYS Calibrator Kit (2 x 3 mL)	Code 590
05142423 190	HCYS Control Kit Control 1 (2 x 3 mL)	Code 254
	HCYS Control Kit Control 2 (2 x 3 mL)	Code 255
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

HCYS: ACN 778

For **cobas c** 502 analyzer:

HCYS: ACN 8778

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of total L-homocysteine in human serum and plasma on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The assay can assist in the diagnosis of patients suspected of having hyperhomocysteinemia or homocystinuria.

Summary^{1,2,3}

Homocysteine (Hcy) is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionine. Total homocysteine (tHcy) represents the sum of all forms of Hcy including forms of oxidized, protein-bound and free.

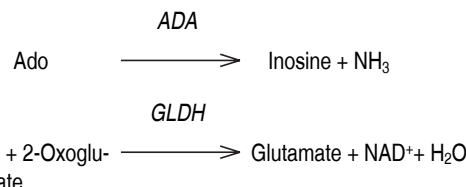
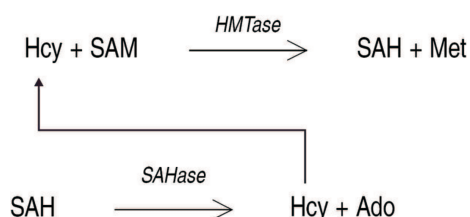
Elevated levels of tHcy has emerged as an important risk factor in the assessment of cardiovascular disease.^{1,2,3} Excess Hcy in the blood stream may cause injuries to arterial vessels due to its irritant nature, and result in inflammation and plaque formation, which may eventually cause blockage of blood flow to the heart.

Elevated tHcy levels are caused by four major factors, including:

1. genetic deficiencies in enzymes involved in Hcy metabolism such as cystathionine beta-synthase (CBS), methionine synthase (MS), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR);
2. nutritional deficiency in B vitamins such as B₆, B₁₂ and folate;
3. renal failure for effective amino acid clearance; and
4. drug interactions, such as with nitric oxide, methotrexate and phenytoin that interfere with Hcy metabolism. Elevated levels of tHcy are also linked with Alzheimer's disease⁴, neuropsychiatric diseases⁵ and Osteoporosis.⁶ Guidelines for tHcy determination in clinical laboratories have been established.^{7,8}

Test principle

Homocysteine Enzymatic Assay is based on a novel enzyme cycling assay principle that assesses the co-substrate conversion product instead of assessing co-substrate or Hcy conversion products of Hcy. In this assay, oxidized Hcy is first reduced to free Hcy which then reacts with a co-substrate, S-adenosylmethionine (SAM), to form methionine (Met) and S-adenosylhomocysteine (SAH), catalyzed by a Hcy S-methyltransferase. SAH is assessed by coupled enzyme reactions where SAH is hydrolyzed into adenosine (Ado) and Hcy by SAH hydrolase, and Hcy is cycled into the Hcy conversion reaction to form a reaction cycle that amplifies the detection signal. The formed Ado is immediately hydrolyzed into inosine and ammonia. In the last step, the enzyme glutamate dehydrogenase (GLDH) catalyzes the reaction of ammonia with 2-oxoglutarate and NADH to form NAD⁺. The concentration of Hcy in the sample is directly proportional to the amount of NADH converted to NAD⁺ ($\Delta A_{340\text{ nm}}$).



Reagents - working solutions

R1 NADH reagent

S-adenosylmethionine 0.1 mmol/L, TCEP* > 0.5 mmol/L, 2-oxoglutarate < 5.0 mmol/L, NADH > 0.2 mmol/L, buffer, pH 9.1 (25 °C), preservative, stabilizer

R2 Enzyme reagent

Homocysteine S-methyltransferase (HMTase) 5.0 kU/L, glutamate dehydrogenase (GLDH) 10 kU/L, casein (bovine) ≤ 0.2 %, buffer, pH 7.2 (25 °C), preservative, detergent

R3 Start reagent

Adenosine deaminase (bovine) 5.0 kU/L, S-adenosyl-homocysteine hydrolase (SAHase) 3.0 kU/L, casein (bovine) ≤ 0.2 %, buffer, pH 7.2 (25 °C), preservative, stabilizer

*Tris(2-carboxyethyl)phosphine

R1 is in position A, R2 is in position B and R3 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use. Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents. Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

HCYS

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 4 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C: See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Do not freeze.

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable. Serum.

Plasma: Li-heparin, K₂-EDTA and K₃-EDTA plasma.

It is important to centrifuge blood samples immediately after collection to separate the plasma from the blood cells. If immediate centrifugation is not

Homocysteine Enzymatic Assay

possible, collected blood specimens should be kept on ice and centrifuged within an hour. Hemolysed or turbid specimens or severely lipemic specimens are not recommended for the Hcy assay.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Stability:^{8,9,10}

4 days at 15-25 °C

4 weeks at 2-8 °C

10 months at -20 °C

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

See the limitations and interferences section for details about possible sample interferences.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

See "Order information" section

General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 36-57		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	μmol/L		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	176 μL	–	
R2	28 μL	–	
R3	20 μL	–	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	14 μL	–	–
Decreased	14 μL	30 μL	120 μL
Increased	14 μL	–	–

cobas c 501/502 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 51-70		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Decrease		
Units	μmol/L		
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)		
R1	176 μL	–	
R2	28 μL	–	
R3	20 μL	–	
Sample volumes	Sample	Sample dilution	

		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	14 μL	–	–
Decreased	14 μL	30 μL	120 μL
Increased	14 μL	–	–

Calibration

Calibrators	S1-5: HCYS Calibrator Kit	
	Multiply the lot-specific HCYS Calibrator Kit calibrator value by the factors below to determine the standard concentrations for the 5-point calibration curve:	
	S1: 0.050	S4: 0.500
	S2: 0.100	S5: 1.00
	S3: 0.250	
Calibration mode	RCM	
Calibration frequency	Full calibration	
	• every 7 days • after reagent lot change • as required following quality control procedures	

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Traceability: This method has been standardized against NIST SRM 1955 reference material.

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

cobas c systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Limitations - interference

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value for analyte concentrations $> 15 \mu\text{mol/L}$ or $\pm 1.5 \mu\text{mol/L}$ for analyte concentrations $\leq 15 \mu\text{mol/L}$.

Icterus:¹¹ No significant interference up to an I index of 20 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 342 μmol/L or 20 mg/dL).

Hemolysis:¹¹ No significant interference up to an H index of 100 (approximate hemoglobin concentration: 62 μmol/L or 100 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹¹ No significant interference up to an L index of 250. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{12,13}

Exceptions: 0.5 mmol/L Glutathione, 100 μmol/L Cystathionine, 0.5 mmol/L Pyruvate.

Patients who are taking methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anticonvulsants, or 6-azuridine triacetate, may have higher levels of Hcy due to metabolic interference with Hcy metabolism.^{7,10}

S-Adenosylhomocysteine (SAH) will cause a significant positive interference. However, SAH is only detectable at sub-nmol/L concentrations in normal plasma, and should not cause concern.¹⁴

Addition of 3-deazaadenosine to inhibit Hcy production in red cells has been suggested. However, the Homocysteine Enzymatic Assay can not use samples containing 3-deazaadenosine since it inhibits one of the key enzymes used in the assay.

Homocysteine Enzymatic Assay

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹⁵

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOH-SMS-SmpCln1+2-SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is required in certain cases.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

3-50 µmol/L

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:5 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 5.

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 3 µmol/L

Limit of Detection = 3 µmol/L

Limit of Quantitation = 5.5 µmol/L

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is the lowest analyte concentration that can be reproducibly measured with a total error of 30 %. It has been determined using low concentration homocysteine samples.

Expected values

In most of the U.S. clinical laboratories, 15 µmol/L is used as the cut-off value for normal levels of Hcy in adults.

In European laboratories, 12 µmol/L is used as the cut-off value for normal levels of Hcy in adults.⁸

Age, pregnancy, and renal function are important. The intake of folic acid as either supplements or through fortification of foods must also be considered:

Group	Folate supplemented	Nonsupplemented
Fasting/basal tHcy, µmol/L		
Pregnancy	8	10
Children < 15 years	8	10
Adults 15-65 years	12	15
Elderly > 65 years	16	20

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5 requirements with repeatability ($n = 21$) and intermediate precision (2 aliquots per run, 2 runs per day, 21 days). The following results were obtained:

Repeatability	Mean	SD	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.2	1.5
Homocysteine Control 2	39.1	0.7	1.8
Human serum 1	8.26	0.16	2.0
Human serum 2	13.1	0.2	1.8
Human serum 3	30.0	0.4	1.4
Human serum 4	44.4	0.9	2.0

Intermediate precision	Mean	SD	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.3	2.1
Homocysteine Control 2	39.1	0.8	2.0
Human serum 1	8.26	0.19	2.3
Human serum 2	13.1	0.3	2.1
Human serum 3	30.0	0.5	1.8
Human serum 4	44.4	1.0	2.2

Method comparison

Hcy values for human serum samples obtained on the **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined using the corresponding reagent on a COBAS INTEGRA 400 analyzer (x).

Sample size (n) = 56

Passing/Bablok ¹⁶	Linear regression
$y = 0.962x + 0.248 \text{ µmol/L}$	$y = 0.993x - 0.175 \text{ µmol/L}$
$r = 0.971$	$r = 0.999$

The sample concentrations were between 3.03 and 47.2 µmol/L.

References

- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131(5):363-375.
- Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996;89(8):561-563.
- Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337(4):230-236.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346(7):476-483.
- Stanger O, Fowler B, Piertz K, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 2009;9(9):1393-1412.
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350(20):2042-2049.
- Refsum H. Total Homocysteine: Guidelines for Determination in the Clinical Laboratory. *Clin Lab News* 2002 May;12-14 (www.aacc.org).
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3-32.

- 9 Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. Clin Chem 1993 Feb;39(2):263-271.
- 10 Rasmussen K and Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. Ann Clin Biochem 2000;37:627-648.
- 11 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. Clin Chem 1986;32:470-475.
- 12 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996;34:385-386.
- 13 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. Ann Clin Biochem 2001;38:376-385.
- 14 Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, et al. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? Nephrol Dial Transplant 1998;13(3):656-661.
- 15 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 16 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see dialog. Roche.com for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS C and COBAS INTEGRA are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2019, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.Roche.com



ANNEXE 14 : Fiche technique de la vitamine B12

Vitamin B12 II

REF		SYSTEM
07212771 190	100	MODULAR ANALYTICS E170 cobas e 411 cobas e 601 cobas e 602

English

System information

For **cobas e 411** analyzer: test number 1410
For MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e 601** and **cobas e 602**
analyzers: Application Code Number 224

Intended use

Binding assay for the in vitro quantitative determination of vitamin B12 in human serum and plasma.

The electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" is intended for use on Elecsys and **cobas e** immunoassay analyzers.

Summary

Vitamin B12, also referred to as cobalamin, is a complex organometallic compound in which a cobalt atom is situated within a corrin ring. It is a water-soluble vitamin which is synthesized by microorganisms. It cannot be synthesized in the human body and is seldom found in products of plant origin. Main sources of vitamin B12 are meat, fish, eggs and dairy products.¹ The uptake in the gastrointestinal tract depends on intrinsic factor, which is synthesized by the gastric parietal cells, and on the "cubam receptor" in the distal ileum. The most frequent cause of severe vitamin B12 deficiency is a lack of intrinsic factor due to autoimmune atrophic gastritis. The disease is historically called "pernicious anemia", even though many patients present with mainly neurologic manifestations. Examples of other causes for vitamin B12 deficiency are malabsorption due to gastrectomy, inflammatory bowel disease or dietary deficiency, e.g. in strict vegetarians (vegans).²

Vitamin B12 is the cofactor for two enzymes, methionine synthase and methylmalonyl CoA mutase.^{2,3} Methionine synthase, located in the cytoplasm, requires vitamin B12 in the form of methylcobalamin and catalyzes the conversion of homocysteine to methionine, an essential amino acid. During this step a methyl group is transferred from methyltetrahydrofolate to the amino acid.³ This enzyme links the methylation pathway through synthesis of the methyl donor S-Adenosyl methionine and the pathway in which purine and pyrimidine are synthesized via generation of tetrahydrofolate.³ In the form of 5'-deoxyadenosylcobalamin, vitamin B12 is also required for the mitochondrial enzyme methylmalonyl CoA mutase, which converts methylmalonyl CoA to succinyl CoA. This is a step in the oxidation of odd-chain fatty acids and catabolism of ketogenic amino acids.³ Thus, vitamin B12 is important for DNA synthesis, regenerating methionine for protein synthesis and methylation, as well as for the development and initial myelination of the central nervous system (CNS) and for the maintenance of normal CNS function.^{2,3}

Vitamin B12 deficiencies are common in wealthier countries principally among the elderly and are most prevalent in poorer populations. In general the prevalence increases with age.^{4,5}

Vitamin B12 deficiency impacts red blood cell synthesis, resulting in megaloblastic anemia due to abnormal DNA synthesis.³ In addition it impairs neurological function, in particular demyelination of nerves in part due to abnormal methylation, leading to peripheral neuropathy, dementia, poor cognitive performance, and depression.³ Other effects of vitamin B12 deficiency or depletion are increased risk of neural tube defects, osteoporosis, cerebrovascular and cardiovascular diseases.³ Early diagnosis is essential, because of the latent nature of this disorder and the risk of permanent neurological damage.^{3,5}

Generally, the primary test performed to confirm the diagnosis of vitamin B12 deficiency is measurement of serum vitamin B12 level.² Recent publications suggest that in addition the following biomarkers should be measured to improve the specificity of diagnosis: folate, methylmalonic acid (MMA), homocysteine and holotranscobalamin.^{2,5,6,7}

The Elecsys Vitamin B12 II assay employs a competitive test principle using intrinsic factor specific for vitamin B12. Vitamin B12 in the sample competes with the added vitamin B12 labeled with biotin for the binding sites on the ruthenium-labeled intrinsic factor complex^{a)}.

a) Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-complex (Ru(bpy)₃²⁺)

Test principle

Competition principle. Total duration of assay: 27 minutes.

- 1st incubation: By incubating the sample (15 µL) with the vitamin B12 pretreatment 1 and pretreatment 2, bound vitamin B12 is released.
- 2nd incubation: By incubating the pretreated sample with the ruthenium labeled intrinsic factor, a vitamin B12-binding protein complex is formed, the amount of which is dependent upon the analyte concentration in the sample.
- 3rd incubation: After addition of streptavidin-coated microparticles and vitamin B12 labeled with biotin, the still-vacant sites of the ruthenium labeled intrinsic factor become occupied, with formation of a ruthenium labeled intrinsic factor vitamin B12 biotin complex. The entire complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.
- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed with ProCell/ProCell M. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the reagent barcode or e-barcode.

Reagents - working solutions

The reagent rackpack (M, R1, R2) and the pretreatment reagents (PT1, PT2) are labeled as B12 II.

PT1 Pretreatment reagent 1 (white cap), 1 bottle, 4 mL:

Dithiothreitol 1.028 g/L; stabilizer, pH 5.5.

PT2 Pretreatment reagent 2 (gray cap), 1 bottle, 4 mL:

Sodium hydroxide 40 g/L; sodium cyanide 2.205 g/L.

M Streptavidin-coated microparticles (transparent cap), 1 bottle, 6.5 mL:

Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.

R1 Intrinsic factor-Ru(bpy)₃²⁺ (gray cap), 1 bottle, 10 mL:

Ruthenium labeled recombinant porcine intrinsic factor 4 µg/L; cobinamide dicyanide 15 µg/L; stabilizer; human serum albumin; phosphate buffer, pH 5.5; preservative.

R2 Vitamin B12-biotin (black cap), 1 bottle, 8.5 mL:

Biotinylated vitamin B12 25 µg/L; biotin 3 µg/L; phosphate buffer, pH 7.0; preservative.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

H290

May be corrosive to metals.

Vitamin B12 II

H314 Causes severe skin burns and eye damage.

H412 Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Prevention:

P273 Avoid release to the environment.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

Response:

P301 + P330 IF SWALLOWED: Rinse mouth. Do NOT induce vomiting.
+ P331

P303 + P361 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated
+ P353 clothing. Rinse skin with water/shower.

P304 + P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep
+ P310 comfortable for breathing.
Immediately call a POISON CENTER/doctor.

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several
+ P338 minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do.
+ P310 Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/
doctor.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

All human material should be considered potentially infectious. All products derived from human blood are prepared exclusively from the blood of donors tested individually and shown to be free from HBsAg and antibodies to HCV and HIV. The testing methods used assays approved by the FDA or cleared in compliance with the European Directive 98/79/EC, Annex II, List A.

However, as no testing method can rule out the potential risk of infection with absolute certainty, the material should be handled with the same level of care as a patient specimen. In the event of exposure, the directives of the responsible health authorities should be followed.^{8,9}

Avoid foam formation in all reagents and sample types (specimens, calibrators and controls).

Reagent handling

The reagents in the kit have been assembled into a ready-for-use unit that cannot be separated.

All information required for correct operation is read in from the respective reagent barcodes.

Storage and stability

Store at 2-8 °C.

Do not freeze.

Store the Elecsys reagent kit **upright** in order to ensure complete availability of the microparticles during automatic mixing prior to use.

Stability:	
unopened at 2-8 °C	up to the stated expiration date
after opening at 2-8 °C	84 days (12 weeks)
on the analyzers	35 days (5 weeks) onboard or 60 days when stored alternatively in the refrigerator and on the analyzer, with the total time onboard on the analyzer not exceeding 10 x 8 hours

Specimen collection and preparation

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum collected using standard sampling tubes or tubes containing separating gel.

Na-heparin, Li-heparin, K₂-EDTA and K₃-EDTA plasma. Li-heparin plasma tubes containing separating gel can be used.

Criterion: Slope 0.9-1.1 + intercept within $\pm 2 \times$ Limit of Blank + coefficient of correlation ≥ 0.95 .

Stable for 2 hours at 15-25 °C, 48 hours at 2-8 °C, 56 days at -20 °C (± 5 °C). Freeze once only.

Stability of serum obtained with separating tubes: 24 hours at 2-8 °C (note the data provided by the tube manufacturer).

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

Avoid hemolysis.

Do not use samples and controls stabilized with azide.

Vitamin B12 determinations should be performed on serum or plasma samples from fasting patients.

Note: Samples with extremely high total protein concentrations (e.g. patients suffering from Waldenström's macroglobulinemia) are not suitable for use in this assay, since they may lead to the formation of protein gel in the assay cup. Processing protein gel may cause a run abort. The critical protein concentration is dependent upon the individual sample composition. The formation of protein gel was seen in samples (spiked with human IgG or human serum albumin) having a total protein concentration > 160 g/L.

Ensure the samples, calibrators and controls are at 20-25 °C prior to measurement.

Due to possible evaporation effects, samples, calibrators and controls on the analyzers should be analyzed/measured within 2 hours.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- REF 07212780190, Vitamin B12 II CalSet, for 4 x 1.0 mL
- REF 05618860190, PreciControl Varia, for 4 x 3.0 mL
- REF 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL sample diluent or
REF 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL sample diluent

- General laboratory equipment
- MODULAR ANALYTICS E170 or **cobas e** analyzer

Accessories for **cobas e** 411 analyzer:

- REF 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL system buffer
- REF 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL measuring cell cleaning solution
- REF 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL washwater additive
- REF 11933159001, Adapter for SysClean
- REF 11706802001, AssayCup, 60 x 60 reaction cups
- REF 11706799001, AssayTip, 30 x 120 pipette tips
- REF 11800507001, Clean-Liner

Accessories for MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 and **cobas e** 602 analyzers:

- REF 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L system buffer
- REF 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L measuring cell cleaning solution
- REF 03023141001, PC/CC-Cups, 12 cups to prewarm ProCell M and CleanCell M before use
- REF 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL cleaning solution for run finalization and rinsing during reagent change
- REF 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL detection cleaning solution
- REF 12102137001, AssayTip/AssayCup, 48 magazines x 84 reaction cups or pipette tips, waste bags

Vitamin B12 II

- [REF] 03023150001, WasteLiner, waste bags
- [REF] 03027651001, SysClean Adapter M

Accessories for all analyzers:

- [REF] 11298500316, ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL system cleaning solution

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

Resuspension of the microparticles takes place automatically prior to use. Read in the test-specific parameters via the reagent barcode. If in exceptional cases the barcode cannot be read, enter the 15-digit sequence of numbers (except for the **cobas e 602** analyzer).

MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e 601** and **cobas e 602** analyzers: PreClean M solution is necessary.

Bring the cooled reagents to approximately 20 °C and place on the reagent disk (20 °C) of the analyzer. Avoid foam formation. The system automatically regulates the temperature of the reagents and the opening/closing of the bottles.

Calibration

Traceability: This method has been standardized against the Vitamin B12 assay ([REF] 04745736190).

Accuracy to WHO Standard 03/178: A study was performed to evaluate the accuracy of the Elecsys Vitamin B12 II assay using the Vitamin B12 World Health Organization International Standard 03/178.¹⁰ Two reagent lots were used on 16 instruments. The mean recovery of the target value of WHO IS 03/178 (480 pg/mL) was 102 %.

Every Elecsys reagent set has a barcoded label containing specific information for calibration of the particular reagent lot. The predefined master curve is adapted to the analyzer using the relevant CalSet.

Calibration frequency: Calibration must be performed once per reagent lot using fresh reagent (i.e. not more than 24 hours since the reagent kit was registered on the analyzer).

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Renewed calibration is recommended as follows:

- after 1 month (28 days) when using the same reagent lot
- after 7 days (when using the same reagent kit on the analyzer)
- as required: e.g. quality control findings outside the defined limits

Quality control

For quality control, use PreciControl Varia.

In addition, other suitable control material can be used.

Controls for the various concentration ranges should be run individually at least once every 24 hours when the test is in use, once per reagent kit, and following each calibration.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

If necessary, repeat the measurement of the samples concerned.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

The analyzer automatically calculates the analyte concentration of each sample (either in pmol/L or pg/mL).

Conversion factors:

pmol/L x 1.36 = pg/mL
pg/mL x 0.738 = pmol/L

Limitations - interference

The assay is unaffected by icterus (bilirubin ≤ 1112 µmol/L or ≤ 65 mg/dL), hemolysis (Hb ≤ 0.025 mmol/L or ≤ 0.04 g/dL), lipemia (Intralipid ≤ 17.1 mmol/L or ≤ 1500 mg/dL), biotin (≤ 205 nmol/L or ≤ 50 ng/mL), IgG ≤ 28 g/L, IgA ≤ 16 g/L and IgM ≤ 10 g/L.

Criterion: Recovery within ± 10 % of initial value with samples > 200 pg/mL and ≤ ± 20 pg/mL with samples ≤ 200 pg/mL.

Samples should not be taken from patients receiving therapy with high biotin doses (i.e. > 5 mg/day) until at least 8 hours following the last biotin administration.

No interference was observed from rheumatoid factors up to a concentration of 1500 IU/mL.

In vitro tests were performed on 16 commonly used pharmaceuticals. No interference with the assay was found.

In rare cases, interference due to extremely high titers of antibodies to analyte-specific antibodies, streptavidin or ruthenium can occur. These effects are minimized by suitable test design.

Because intrinsic factor is typically used as the binding protein in serum vitamin B12 assays, anti-intrinsic factor antibodies (which are common in pernicious anemia) can lead to elevated vitamin B12 measurement values.^{2,11,12} The Elecsys Vitamin B12 II assay is designed to avoid interference due to anti-intrinsic factor antibodies.¹³

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

Note: The presence of immunoglobulin-vitamin B12 complexes may cause unexpectedly high values of vitamin B12.^{14,15}

Limits and ranges

Measuring range

50.0-2000 pg/mL or 36.9-1476 pmol/L (defined by the Limit of Blank and the maximum of the master curve). Values below the Limit of Blank are reported as < 50.0 pg/mL or < 36.9 pmol/L. Values above the measuring range are reported as > 2000 pg/mL or > 1476 pmol/L.

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 50 pg/mL (36.9 pmol/L)

Limit of Detection = 100 pg/mL (73.8 pmol/L)

Limit of Quantitation = 150 pg/mL (111 pmol/L)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from n ≥ 60 measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples. The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is defined as the lowest amount of analyte in a sample that can be accurately quantitated with a allowable imprecision of ≤ 20 %.

It has been determined using low concentration vitamin B12 samples.

Dilution

Samples with vitamin B12 concentrations above the measuring range can be manually diluted 1:2 with Diluent Universal. The concentration of the diluted sample must be > 738 pmol/L or > 1000 pg/mL. After manual dilution, multiply the results by the dilution factor 2.

Note: Sample-dependent non-linearity upon dilution is seen with samples having analyte levels beyond the measuring range. As Diluent Universal may contain low levels of endogenous vitamin B12, it is recommended that linearity studies be performed using a known low analyte-containing serum pool. Samples outside the measuring range can be diluted 1:2 with Diluent Universal; the effect of endogenous vitamin B12 concentration is insignificant at these levels.

Expected values

Because differences may exist with respect to population and dietary status, it is recommended that normal ranges be determined by each laboratory over a suitable period of time and in a statistically significant number of assays before clinical significance is attached to the results of these tests.

Vitamin B12 II



The values shown below were performed on samples from an apparently healthy population, using the Elecsys Vitamin B12 II assay. The calculation is based on 135 sera (68 men, 67 women). The age range was between 20 and 78 years. Pregnant women were excluded. The reference population was selected according to normal homocysteine values.

N	Median		Range (2.5 th -97.5 th percentile)	
	pg/mL	pmol/L	pg/mL	pmol/L
135	425	314	197-771	145-569

These values should only be used as guidelines.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using Elecsys reagents, pooled human sera and controls in a protocol (EP5-A2) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute); 2 runs per day in duplicate each for 21 days (n = 84). The following results were obtained:

cobas e 411 analyzer					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	pg/mL	pg/mL	%	pg/mL	%
Human serum 1	176	8.86	5.0	12.7	7.2
Human serum 2	405	13.0	3.2	17.5	4.3
Human serum 3	960	19.7	2.1	31.0	3.2
Human serum 4	1230	27.4	2.2	46.4	3.8
Human serum 5	1940	40.9	2.1	72.6	3.7
PreciControl Varia1	447	12.2	2.7	18.6	4.2
PreciControl Varia2	934	20.2	2.2	38.4	4.1

cobas e 411 analyzer					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	pmol/L	pmol/L	%	pmol/L	%
Human serum 1	130	6.54	5.0	9.37	7.2
Human serum 2	299	9.59	3.2	12.9	4.3
Human serum 3	708	14.5	2.1	22.9	3.2
Human serum 4	908	20.2	2.2	34.2	3.8
Human serum 5	1432	30.2	2.1	53.6	3.7
PreciControl Varia1	330	9.00	2.7	13.7	4.2
PreciControl Varia2	689	14.9	2.2	28.3	4.1

MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	pg/mL	pg/mL	%	pg/mL	%
Human serum 1	176	5.84	3.3	9.14	5.2
Human serum 2	407	8.24	2.0	12.7	3.1
Human serum 3	1010	13.2	1.3	21.1	2.1

MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	pg/mL	pg/mL	%	pg/mL	%
Human serum 4	1230	19.8	1.6	28.8	2.3
Human serum 5	1890	29.8	1.6	41.5	2.2
PreciControl Varia1	448	7.16	1.6	15.3	3.4
PreciControl Varia2	917	12.0	1.3	27.8	3.0

MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	pmol/L	pmol/L	%	pmol/L	%
Human serum 1	130	4.31	3.3	6.75	5.2
Human serum 2	300	6.08	2.0	9.37	3.1
Human serum 3	745	9.74	1.3	15.6	2.1
Human serum 4	908	14.6	1.6	21.3	2.3
Human serum 5	1395	22.0	1.6	30.6	2.2
PreciControl Varia1	331	5.28	1.6	11.3	3.4
PreciControl Varia2	677	8.86	1.3	20.5	3.0

Method comparison

a) A comparison of the Elecsys Vitamin B12 assay (calibrated with Vitamin B12 CalSet II; x) and the Elecsys Vitamin B12 II assay (calibrated with Vitamin B12 II CalSet; y) using clinical samples gave the following correlations (pg/mL):

Number of samples measured: 100

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 0.952x + 15.1$ $y = 0.957x + 11.6$
 $r = 0.977$ $r = 0.999$

The sample concentrations were between 69 and 1890 pg/mL (51 and 1395 pmol/L).

b) A comparison of the Elecsys Vitamin B12 II assay (y) and a commercially available method (x) using clinical samples gave the following correlations (pg/mL):

Number of samples measured: 106

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 0.923x + 4.90$ $y = 0.881x + 27.6$
 $r = 0.952$ $r = 0.993$

The sample concentrations were between 182 and 1797 pg/mL (134 and 1326 pmol/L).

c) A comparison of the Elecsys Vitamin B12 II assay on the cobas e 601 analyzer (y) and the Elecsys Vitamin B12 II assay on the cobas e 411 analyzer (x) using clinical samples gave the following correlations (pg/mL):

Number of samples measured: 117

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 1.01x - 2.77$ $y = 1.01x + 3.22$
 $r = 0.933$ $r = 0.995$

The sample concentrations were between 56 and 1887 pg/mL (41 and 1393 pmol/L).

Analytical specificity

The following cross-reactivities were found, tested with vitamin B12 concentrations of 129 pg/mL and 550 pg/mL.

Vitamin B12 II

cobas®

Cross-reactant	Maximum concentration tested ng/mL	Cross-reactivity %
Cobinamide dicyanide	210	0.003

References

- 1 Thomas L. Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results; 1st Edition, Frankfurt/Main: TH-Books-Verl.-Ges., 1998:424-431.
- 2 Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Engl J Med 2013;368:149-160.
- 3 Allen LH. Vitamin B-12. Adv Nutr 2012;3(1):54-55. doi: 10.3945/an.111.001370. Epub 2012 Jan 5.
- 4 Allen LH. How common is vitamin B-12 deficiency? Am J Clin Nutr 2009;89(2):693S-696S. Epub 2008 Dec 30.
- 5 Chatthanawaree W. Biomarkers of cobalamin (vitamin B12) deficiency and its application. J Nutr Health Aging 2011 Mar;15(3):227-313.
- 6 Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al., Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. Am J Clin Nutr 2011 Jul;94(1):313S-321S.
- 7 Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency - an update. Haematologica 2006;91(11):1506-1512.
- 8 Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- 9 Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- 10 Thorpe SJ, Heath A, Blackmore S, et al. International Standard for serum vitamin B12 and serum folate: international collaborative study to evaluate a batch of lyophilised serum for B12 and folate content. Clin Chem Lab Med 2007;45(3):380-386.
- 11 Yang DT, Cook RJ. Spurious elevations of vitamin B12 with pernicious anemia. N Engl J Med 2012;366:1742-1743.
- 12 Carmel R, Agrawal YP. Failures of cobalamin assays in pernicious anemia. N Engl J Med 2012;367:385-386. [Erratum, N Engl J Med 2012;367:976.]
- 13 Schilling KA, Wiesgigl M. The Elecsys® Vitamin B12 assay is not affected by anti-intrinsic factor antibodies. Clin Chem Lab Med 2013 Jun 29;51(11):e251-e252.
- 14 Jeffery J, Millar H, MacKenzie P, et al. An IgG complexed form of vitamin B12 is a common cause of elevated serum concentrations. Clin Biochem 2010 Jan;43(1-2):82-88. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.08.022. Epub 2009 Sep 8.
- 15 Bowen RA, Drake SK, Vanjani R, et al. Markedly increased vitamin B12 concentrations attributable to IgG-IgM-vitamin B12 immune complexes. Clin Chem 2006;52(11):2107-2114.
- 16 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

For further information, please refer to the appropriate operator's manual for the analyzer concerned, the respective application sheets, the product information and the Method Sheets of all necessary components (if available in your country).

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

CONTENT	Contents of kit
SYSTEM	Analyzers/Instruments on which reagents can be used
REAGENT	Reagent
CALIBRATOR	Calibrator



Volume after reconstitution or mixing

GTIN

Global Trade Item Number

COBAS, COBAS E, ELECSYS and PRECICONTROL are trademarks of Roche. INTRALIPID is a trademark of Fresenius Kabi AB.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2017, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



ANNEXE 15 : Fiche technique de la vitamine B9 (Folate)

Elecsys Folate III

cobas®

REF		SYSTEM
07559992 190	100	MODULAR ANALYTICS E170 cobas e 411 cobas e 601 cobas e 602

English

System information

For **cobas e 411** analyzer: test number 1520
For MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e 601** and **cobas e 602** analyzers: Application Code Number 721

Intended use

Binding assay for the in vitro quantitative determination of folate in human serum and plasma.

The binding assay is intended for use on Elecsys and **cobas e** immunoassay analyzers.

Summary

Folate belongs to the family of B-group vitamins composed of an aromatic pteridine ring linked through a methylene group to p-aminobenzoic acid and a glutamate residue. Folate (folic acid) is vital for normal cellular functions and plays an essential role in nucleic acid synthesis, methionine regeneration, shuttling and redox reactions of one-carbon units required for normal metabolism and regulation.^{1,2}

The folate metabolism can be exemplified as a cycle, where folate facilitates the transfer of one-carbon units from one molecule to another required in various biochemical reactions: for example, tetrahydrofolate (THF) accepts a single carbon unit from serine, which is reduced in a number of steps to 5-methyltetrahydrofolate (5-MTHF). 5-MTHF gives its methyl group to homocysteine, which is - with involvement of methionine synthase and vitamin B12 - enzymatically converted to methionine. The resulting THF starts again the cycle of methyl group synthesis. From methionine, the methyl groups are transferred to S-adenosylmethionine (SAM).³ SAM serves as a methyl group donor in several methylation reactions, like DNA, RNA and protein methylation.¹

The methionine cycle is highly sensitive to folate deficiency: with a low folate status, the ability of the cell to re-methylate homocysteine is impaired and this results in increased homocysteine concentrations in plasma.²

Folate also plays an essential role in the synthesis of purine and pyrimidine precursors of nucleic acids. Altered distribution of methyl groups and impaired DNA synthesis play an essential role in the development of cancers. Abnormal folate status has also been linked with the development of diseases like cardiovascular diseases, neural tube defects, cleft lip and palate, late pregnancy complications, neurodegenerative and psychiatric disorders.^{1,2}

Folate belongs to the group of essential vitamins, i.e. it cannot be synthesized by the human organism and therefore must be absorbed from diet. Primary sources of folates are green and leafy vegetables, sprouts, fruits, brewer's yeast and liver.^{1,2}

Folate deficiency can be caused by decreased nutritional intake, poor absorption of ingested folate in the intestine or increased demand of folate, for example during physical activity or pregnancy. Deficiency of folate can also be a result of liver diseases or impaired folate metabolism due to genetic defects or drug interactions.²

A clinical manifestation of both folate and vitamin B12 deficiency is the so called megaloblastic (macrocytic) anemia: due to the affected DNA synthesis and cell maturation, especially involving the cells of erythropoiesis, the total count of erythrocytes is significantly reduced. The hemoglobin synthesis capacity however is normal, which leads to abnormally large erythrocyte precursors ("macrocytes" or "megaloblasts"), which have an elevated hemoglobin content ("hyperchromic anemia").^{3,4}

Because vitamin B12 and folate are closely interrelated in the cellular one-carbon unit metabolism, and also hematologic and clinical consequences of the two vitamin deficiency states might be similar, it is advisable to determine both parameters simultaneously in patients with the relevant symptoms of vitamin deficiency.^{3,4}

Test principle

Competition principle. Total duration of assay: 27 minutes.

- 1st incubation: By incubating 25 µL of sample with the folate pretreatment reagents 1 and 2, bound folate is released from endogenous folate binding proteins.
- 2nd incubation: By incubating the pretreated sample with the ruthenium labeled folate binding protein, a folate complex is formed, the amount of which is dependent upon the analyte concentration in the sample.
- 3rd incubation: After addition of streptavidin-coated microparticles and folate labeled with biotin, the unbound sites of the ruthenium labeled folate binding protein become occupied, with formation of a ruthenium labeled folate binding protein-folate biotin complex. The entire complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin.
- The reaction mixture is aspirated into the measuring cell where the microparticles are magnetically captured onto the surface of the electrode. Unbound substances are then removed with ProCell/ProCell M. Application of a voltage to the electrode then induces chemiluminescent emission which is measured by a photomultiplier.
- Results are determined via a calibration curve which is instrument-specifically generated by 2-point calibration and a master curve provided via the reagent barcode or e-barcode.

Reagents - working solutions

The reagent rackpack (M, R1, R2) and the pretreatment reagents (PT1, PT2) are labeled as Fol III.

- PT1 Pretreatment reagent 1 (white cap), 1 bottle, 4 mL:
Sodium 2-mercaptoethanesulfonate (MESNA) 40 g/L, pH 5.5.
- PT2 Pretreatment reagent 2 (gray cap), 1 bottle, 5 mL:
Sodium hydroxide 25 g/L.
- M Streptavidin-coated microparticles (transparent cap), 1 bottle, 6.5 mL:
Streptavidin-coated microparticles 0.72 mg/mL; preservative.
- R1 Folate binding protein-Ru(bpy)₃²⁺ (gray cap), 1 bottle, 9 mL:
Ruthenium labeled folate binding protein 75 µg/L; human serum albumin (stabilizer); borate/phosphate/citrate buffer 70 mmol/L, pH 5.5; preservative.
- R2 Folate-biotin (black cap), 1 bottle, 8 mL:
Biotinylated folate 17 µg/L; biotin 120 µg/L; human serum albumin (stabilizer); borate buffer 100 mmol/L, pH 9.0; preservative.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

This kit contains components classified as follows in accordance with the Regulation (EC) No. 1272/2008:



Danger

H290



May be corrosive to metals.

H314

Causes severe skin burns and eye damage.

Elecsys Folate III



H360FD May damage fertility. May damage the unborn child.

Prevention:

P201 Obtain special instructions before use.

P280 Wear protective gloves/ protective clothing/ eye protection/ face protection.

Response:

P303 + P361 IF ON SKIN (or hair): Take off immediately all contaminated clothing. Rinse skin with water.

P304 + P340 IF INHALED: Remove person to fresh air and keep comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER/ doctor.

P305 + P351 IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. Immediately call a POISON CENTER/ doctor.

P308 + P313 IF exposed or concerned: Get medical advice/attention.

Product safety labeling follows EU GHS guidance.

Contact phone: all countries: +49-621-7590

All human material should be considered potentially infectious. All products derived from human blood are prepared exclusively from the blood of donors tested individually and shown to be free from HBsAg and antibodies to HCV and HIV. The testing methods used assays approved by the FDA or cleared in compliance with the European Directive 98/79/EC, Annex II, List A.

However, as no testing method can rule out the potential risk of infection with absolute certainty, the material should be handled with the same level of care as a patient specimen. In the event of exposure, the directives of the responsible health authorities should be followed.^{5,6}

Avoid foam formation in all reagents and sample types (specimens, calibrators and controls).

Reagent handling

The reagents in the kit have been assembled into a ready-for-use unit that cannot be separated.

All information required for correct operation is read in from the respective reagent barcodes.

Storage and stability

Store at 2-8 °C.

Do not freeze.

Store the Elecsys reagent kit **upright** in order to ensure complete availability of the microparticles during automatic mixing prior to use.

Stability:	
unopened at 2-8 °C	up to the stated expiration date
after opening at 2-8 °C	56 days (8 weeks)
on the analyzers	14 days (2 weeks) onboard or 28 days (4 weeks) when stored alternatively in the refrigerator and on the analyzer, with the total time onboard on the analyzer not exceeding 10 x 8 hours

Specimen collection and preparation

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Serum collected using standard sampling tubes or tubes containing separating gel.

Li-heparin plasma. Li-heparin plasma tubes containing separating gel can be used.

Criterion: Method comparison serum versus Li-heparin plasma, slope 0.9-1.1 + intercept within $\pm 2 \times$ Limit of Blank (LoB), coefficient of correlation ≥ 0.95 .

Serum: Stable for 2 hours at 15-25 °C, 48 hours at 2-8 °C, 28 days at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once. Protect from light. Store the samples at 2-8 °C if they cannot be measured immediately.

Li-heparin plasma: Stable for 2 hours at 15-25 °C, 48 hours at 2-8 °C, 28 days at -20 °C (± 5 °C). Freeze only once. Protect from light. Store the samples at 2-8 °C if they cannot be measured immediately.

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Samples should not subsequently be altered with additives (biocides, anti-oxidants or substances possibly changing the pH of the sample) in order to avoid erroneous folate recovery.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

Ensure the samples, calibrators and controls are at 20-25 °C prior to measurement.

Due to possible evaporation effects, samples, calibrators and controls on the analyzers should be analyzed/measured within 2 hours.

Note: Hemolysis may significantly increase folate values due to high concentrations of folate in red blood cells. Therefore, hemolyzed samples are not suitable for use in this assay. Samples for folate determinations should be collected from fasting persons.

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- REF 07560001190, Folate III CalSet, for 4 x 1.0 mL
- REF 05618860190, PreciControl Varia, for 4 x 3.0 mL
- REF 11732277122, Diluent Universal, 2 x 16 mL sample diluent or
REF 03183971122, Diluent Universal, 2 x 36 mL sample diluent

- General laboratory equipment
- MODULAR ANALYTICS E170 or **cobas e** analyzer

Accessories for **cobas e** 411 analyzer:

- REF 11662988122, ProCell, 6 x 380 mL system buffer
- REF 11662970122, CleanCell, 6 x 380 mL measuring cell cleaning solution
- REF 11930346122, Elecsys SysWash, 1 x 500 mL washwater additive
- REF 11933159001, Adapter for SysClean
- REF 11706802001, AssayCup, 60 x 60 reaction cups
- REF 11706799001, AssayTip, 30 x 120 pipette tips
- REF 11800507001, Clean-Liner

Accessories for MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e** 601 and **cobas e** 602 analyzers:

- REF 04880340190, ProCell M, 2 x 2 L system buffer
- REF 04880293190, CleanCell M, 2 x 2 L measuring cell cleaning solution
- REF 03023141001, PC/CC-Cups, 12 cups to prewarm ProCell M and CleanCell M before use
- REF 03005712190, ProbeWash M, 12 x 70 mL cleaning solution for run finalization and rinsing during reagent change
- REF 03004899190, PreClean M, 5 x 600 mL detection cleaning solution
- REF 12102137001, AssayTip/AssayCup, 48 magazines x 84 reaction cups or pipette tips, waste bags
- REF 03023150001, WasteLiner, waste bags
- REF 03027651001, SysClean Adapter M

Accessories for all analyzers:

Elecsys Folate III



- [REF] 11298500316, ISE Cleaning Solution/Elecsys SysClean, 5 x 100 mL system cleaning solution

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

Resuspension of the microparticles takes place automatically prior to use. Read in the test-specific parameters via the reagent barcode. If in exceptional cases the barcode cannot be read, enter the 15-digit sequence of numbers (except for the **cobas e 602** analyzer).

MODULAR ANALYTICS E170, **cobas e 601** and **cobas e 602** analyzers: PreClean M solution is necessary.

Bring the cooled reagents to approximately 20 °C and place on the reagent disk (20 °C) of the analyzer. Avoid foam formation. The system automatically regulates the temperature of the reagents and the opening/closing of the bottles.

Calibration

Traceability: This method has been standardized against the WHO International Standard NIBSC code: 03/178.

Every Elecsys reagent set has a barcoded label containing specific information for calibration of the particular reagent lot. The predefined master curve is adapted to the analyzer using the relevant CalSet.

Calibration frequency: Calibration must be performed once per reagent lot using fresh reagent (i.e. not more than 24 hours since the reagent kit was registered on the analyzer).

Calibration interval may be extended based on acceptable verification of calibration by the laboratory.

Renewed calibration is recommended as follows:

- after 1 month (28 days) when using the same reagent lot
- after 7 days (when using the same reagent kit on the analyzer)
- as required: e.g. quality control findings outside the defined limits

Quality control

For quality control, use PreciControl Varia.

In addition, other suitable control material can be used.

Controls for the various concentration ranges should be run individually at least once every 24 hours when the test is in use, once per reagent kit, and following each calibration.

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

If necessary, repeat the measurement of the samples concerned.

Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

The analyzer automatically calculates the analyte concentration of each sample (either in nmol/L or ng/mL).

Conversion factors:

$$\text{nmol/L} \times 0.44 = \text{ng/mL}$$

$$\text{ng/mL} \times 2.27 = \text{nmol/L}$$

Limitations - interference

The assay is unaffected by icterus (bilirubin $\leq 496 \mu\text{mol/L}$ or $\leq 29 \text{ mg/dL}$), lipemia (Intralipid $\leq 1500 \text{ mg/dL}$), biotin ($\leq 86.1 \text{ nmol/L}$ or $\leq 21 \text{ ng/mL}$), IgG $\leq 16 \text{ g/L}$, IgA $\leq 4.0 \text{ g/L}$ and IgM $\leq 10 \text{ g/L}$.

Criterion: Recovery within $\pm 10 \%$ of initial value with samples $> 4 \text{ ng/mL}$ and $\leq \pm 0.4 \text{ ng/mL}$ with samples $\leq 4 \text{ ng/mL}$.

Hemolysis may significantly increase folate values due to high concentrations of folate in red blood cells. Therefore, hemolyzed samples are not suitable for use in this assay.

Samples should not be taken from patients receiving therapy with high biotin doses (i.e. $> 5 \text{ mg/day}$) until at least 8 hours following the last biotin administration.

No interference was observed from rheumatoid factors up to a concentration of 1000 IU/mL.

In vitro tests were performed on 16 commonly used pharmaceuticals and in addition on human erythropoietin. No interference with the assay was found.

It is contraindicated to measure samples of patients receiving therapy with certain pharmaceuticals, e.g. methotrexate or leucovorin, because of the cross-reactivity of folate binding protein with these compounds.

Samples with extremely high total protein concentrations (hyperproteinemia) are not suitable for use in this assay. Hyperproteinemia may be caused by, but not limited to, the following conditions: Lymphoma^{7,8}, bone marrow disorders such as multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), Waldenström macroglobulinemia, plasmocytoma^{7,8,9,10,11,12,13}, Amyloidosis^{13,14}. Respective samples may lead to the formation of protein gel in the assay cup, which may cause a run abort. The critical total protein concentration is dependent upon the individual sample composition.

In rare cases, interference due to extremely high titers of antibodies to streptavidin and ruthenium can occur. These effects are minimized by suitable test design.

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with RBC folate, the patient's medical history, clinical examination, and other findings.

Limits and ranges

Measuring range

0.6-20.0 ng/mL or 1.36-45.4 nmol/L (defined by the Limit of Blank and the maximum of the master curve). Values below the Limit of Blank are reported as $< 0.6 \text{ ng/mL}$ ($< 1.36 \text{ nmol/L}$). Values above the measuring range are reported as $> 20.0 \text{ ng/mL}$ ($> 45.4 \text{ nmol/L}$).

Lower limits of measurement

Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation

Limit of Blank = 0.6 ng/mL (1.36 nmol/L)

Limit of Detection = 1.2 ng/mL (2.72 nmol/L)

Limit of Quantitation = 2.0 ng/mL (4.54 nmol/L)

The Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples. The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

The Limit of Quantitation is defined as the lowest amount of analyte in a sample that can be accurately quantitated with a total allowable relative error of $\leq 20 \%$.

It has been determined using low concentration folate samples.

Dilution

Samples with folate concentrations above the measuring range can be diluted manually with Diluent Universal. The recommended dilution is 1:2. The concentration of the diluted sample must be $> 8.5 \text{ ng/mL}$ or $> 19.3 \text{ nmol/L}$. After manual dilution, multiply the results by the dilution factor 2.

Expected values

Referring to "The American Journal of Clinical Nutrition"¹⁵ serum folate (folic acid) values were found as follows:

Sex	Age	N	Median		2.5 th -97.5 th percentile	
	years		ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
Both	all	23345	13.0	29.5	4.6-34.8	10.4-78.9
Male	all	11387	12.3	27.9	4.5-32.2	10.2-73.0
Female	all	11958	13.3	30.1	4.8-37.3	10.9-84.5
Both	4-11	3595	17.2	39.0	8.6-37.7	19.5-85.4
Both	12-19	6390	12.1	27.4	5.0-27.2	11.3-61.6
Both	20-59	8689	11.6	26.3	4.4-31.0	10.0-70.2

Sex	Age	N	Median		2.5 th -97.5 th percentile	
	years		ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
Both	≥ 60	4671	16.6	37.6	5.6-45.8	12.7-103.8

These values were obtained in the USA during the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2004.

The values shown below were performed on samples from an apparently healthy population, using the Elecsys Folate III assay.

The calculation is based on 404 sera (177 men, 227 women). The age range was between 20 and 65 years. Pregnant or lactating women were excluded. The reference population was selected according to normal homocysteine values.

N	Median		2.5 th -97.5 th percentile	
	ng/mL	nmol/L	ng/mL	nmol/L
404	8.94	20.3	3.89-26.8	8.83-60.8

Please note: These values should only be used as a guideline.

It should be taken into consideration that differences in the expected values may exist with respect to population and dietary status.

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Folate deficient sample values

25 samples considered to be deficient^{a)} in serum folate concentration were assessed using the Elecsys Folate III assay. All samples were found to be below the 2.5th percentile as given in the table above.

a) Folate deficiency was assessed by measurement of serum folate by two commercially available folate assays.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using Elecsys reagents, pooled human sera and controls in a protocol (EP5-A2) of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 runs per day in duplicate each for 21 days (n = 84). The following results were obtained:

cobas e 411 analyzer					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	%
Human serum 1	1.88	0.150	8.0	0.205	10.9
Human serum 2	3.92	0.200	5.1	0.318	8.1
Human serum 3	11.9	0.346	2.9	0.571	4.8
Human serum 4	13.4	0.301	2.2	0.574	4.3
Human serum 5	17.8	0.440	2.5	0.666	3.7
PreciControl Varia1	3.24	0.215	6.6	0.309	9.5
PreciControl Varia2	11.6	0.314	2.7	0.566	4.9

cobas e 411 analyzer					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	nmol/L	nmol/L	%	nmol/L	%
Human serum 1	4.27	0.341	8.0	0.465	10.9
Human serum 2	8.90	0.454	5.1	0.722	8.1
Human serum 3	27.0	0.785	2.9	1.30	4.8
Human serum 4	30.4	0.683	2.2	1.30	4.3

cobas e 411 analyzer					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	nmol/L	nmol/L	%	nmol/L	%
Human serum 5	40.4	0.999	2.5	1.51	3.7
PreciControl Varia1	7.35	0.488	6.6	0.701	9.5
PreciControl Varia2	26.3	0.713	2.7	1.28	4.9

MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	ng/mL	ng/mL	%	ng/mL	%
Human serum 1	1.66	0.255	15.4	0.268	16.1
Human serum 2	4.10	0.219	5.4	0.303	7.4
Human serum 3	11.1	0.449	4.1	0.503	4.6
Human serum 4	12.2	0.454	3.7	0.467	3.8
Human serum 5	16.4	0.502	3.1	0.625	3.8
PreciControl Varia1	2.34	0.189	8.1	0.228	9.8
PreciControl Varia2	10.1	0.443	4.4	0.489	4.9

MODULAR ANALYTICS E170, cobas e 601 and cobas e 602 analyzers					
		Repeatability		Intermediate precision	
Sample	Mean	SD	CV	SD	CV
	nmol/L	nmol/L	%	nmol/L	%
Human serum 1	3.77	0.579	15.4	0.608	16.1
Human serum 2	9.31	0.497	5.4	0.688	7.4
Human serum 3	25.2	1.02	4.1	1.14	4.6
Human serum 4	27.7	1.03	3.7	1.06	3.8
Human serum 5	37.2	1.14	3.1	1.42	3.8
PreciControl Varia1	5.31	0.429	8.1	0.518	9.8
PreciControl Varia2	22.9	1.01	4.4	1.11	4.9

Method comparison

a) A comparison of the Elecsys Folate III assay (traceable to WHO IS 03/178; y) and the Elecsys Folate III assay prior to standardization against WHO IS 03/178 (x) using clinical samples gave the following correlations (ng/mL):

Number of samples measured: 113

Passing/Bablok¹⁶
$$v = 1.14x - 1.97$$
$$T = 0.939$$

Linear regression

$$y = 1.11x - 1.77$$
 $r = 0.994$

The sample concentrations were between 2.1 and 18 ng/mL (4.8 and 41 nmol/L).

b) A comparison of the Elecsys Folate III assay (y) with a commercially available method (x) using clinical samples gave the following correlations (ng/mL):

Number of samples measured: 106

Passing/Bablok¹⁶
$$y = 0.980x - 0.095$$
$$\tau = 0.924$$

Linear regression

$$y = 1.09x - 0.659$$
 $r = 0.984$

The sample concentrations were between 1.9 and 17 ng/mL (4.3 and 39 nmol/L).

Elecsys Folate III

cobas®

c) A comparison of the Elecsys Folate III assay on the **cobas e 601** analyzer (y) with the Elecsys Folate III assay on the **cobas e 411** analyzer (x) using clinical samples gave the following correlations (ng/mL):

Number of samples measured: 105

Passing/Bablok¹⁶ Linear regression
 $y = 1.05x - 0.303$ $y = 0.981x + 0.143$
 $r = 0.868$ $r = 0.982$

The sample concentrations were between 1.6 and 19 ng/mL (3.6 and 43 nmol/L).

Analytical specificity

The following cross-reactivities were found, tested with folate concentrations of approximately 3.5 ng/mL, 10 ng/mL and 19 ng/mL.

Cross-reactant	Concentration tested ng/mL	Cross-reactivity %
Amethopterin	750	2.5
Aminopterin	750	4.4
Folinic acid	750	0.7

References

- Nazki FH, Sameer AS, Ganaie BA. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases. *Gene* 2014;533(1):11-20.
- Scaglione F, Panzavolta G. Folate, folic acid and 5-methyltetrahydrofolate are not the same thing. *Xenobiotica* 2014;44(5):480-488.
- Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handb Clin Neurol* 2014;120:927-43.
- Wick M, Pinggera W, Lehmann P. Clinical Aspects and Laboratory. Iron metabolism, Anemias. Springer Verlag, Wien, New York, 6th edition 2011:41-42.
- Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Wu AHB. Tietz clinical guide to laboratory tests, 4th ed. St. Louis, Saunders/Elsevier 2006:608-609, 916-917.
- Paricaud K, Moulis G, Combis MS, et al. Causes of protidemia above 100 g/L. *Eur J Intern Med* 2014;25:e123.
- Filippatos TD, Liamis G, Christopoulou F, et al. Ten common pitfalls in the evaluation of patients with hyponatremia. *Eur J Intern Med* 2016;29:22-25.
- Mailankody S, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and Waldenström's macroglobulinemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2016;29:187-193.
- Morel P, Duhamel A, Gobbi P, et al. International prognostic scoring system for Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 2009;113:4163-4170.
- Rajkumar SV. Multiple Myeloma. *Curr Probl Cancer* 2009;33:7-64.
- Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2016 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol* 2016;91:947-956.
- Wu AHB. Tietz clinical guide to laboratory tests, 4th ed. St. Louis, Saunders/Elsevier 2006: 916-917, 925.
- Pfeiffer CM, Johnson CL, Jain RB, et al. Trends in blood folate and vitamin B-12 concentrations in the United States, 1988-2004. *Am J Clin Nutr* 2007;86:718-727.
- Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

For further information, please refer to the appropriate operator's manual for the analyzer concerned, the respective application sheets, the product information and the Method Sheets of all necessary components (if available in your country).

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard (for USA: see <https://usdiagnostics.roche.com> for definition of symbols used):

	Contents of kit
	Analyzers/Instruments on which reagents can be used
	Reagent
	Calibrator
	Volume after reconstitution or mixing
	Global Trade Item Number

COBAS, COBAS E, ELECSYS and PRECICONTROL are trademarks of Roche. INTRALIPID is a trademark of Fresenius Kabi AB.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Additions, deletions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2018, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



ANNEXE 16 : Fiche technique de la micro-albuminurie

ALBT2

Tina-quant Albumin Gen.2

Order information

REF	CONTENT	Analyzer(s) on which cobas c pack(s) can be used
04469658 190	Tina-quant Albumin Gen.2 100 tests	System-ID 07 6743 3 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
03121305 122	C.f.a.s. PUC (5 x 1 mL)	Code 489
03121313 122	Precinorm PUC (4 x 3 mL)	Code 240
03121291 122	Precipath PUC (4 x 3 mL)	Code 241
10557897 122	Precinorm Protein (3 x 1 mL)	Code 302
11333127 122	Precipath Protein (3 x 1 mL)	Code 303
05117003 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (20 x 5 mL)	Code 391
05947626 190	PreciControl ClinChem Multi 1 (4 x 5 mL)	Code 391
05117216 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (20 x 5 mL)	Code 392
05947774 190	PreciControl ClinChem Multi 2 (4 x 5 mL)	Code 392
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	System-ID 07 6869 3

English

System information

For **cobas c** 311/501 analyzers:

ALBU2: ACN 253 (Albumin in urine)

ALBS2: ACN 128 (Albumin in serum)

ALBC2: ACN 412 (Albumin in CSF)

For **cobas c** 502 analyzer:

ALBU2: ACN 8253 (Albumin in urine)

ALBS2: ACN 8128 (Albumin in serum)

ALBC2: ACN 8412 (Albumin in CSF)

Intended use

In vitro test for the quantitative determination of albumin in human urine, serum, plasma and CSF (albumin CSF/serum ratio) on Roche/Hitachi **cobas c** systems.

Summary^{1,2,3,4,5,6,7,8,9,10}

Albumin is a non-glycosylated protein with a molecular weight of 66000 daltons. It is synthesized in liver parenchymal cells at a rate of 14 g/day. Quantitatively, albumin is normally the most important protein component (> 50 %) in plasma, CSF and urine. A small, but abnormal albumin excretion in urine is known as microalbuminuria. Causes of microalbuminuria can be glomerular (e.g. due to diabetic microangiopathy, hypertension, minor glomerular lesion), tubular (inhibition of reabsorption) or postrenal. Albumin is also a marker protein for various forms of proteinuria.

In selective glomerular proteinuria, 100-3000 mg albumin/g creatinine are excreted in the urine. Non-selective glomerular proteinuria is characterized by elevated excretion of high-molecular weight proteins (IgG more than 10 % of the albumin value). Prerenal proteinuria is recognized by a discrepancy between albumin and total protein (albumin accounting for less than 30 %, with concurrent elevation of total protein). Simultaneous elevation of albumin and microproteins is found in glomerulotubular proteinuria occurring due to overloading of tubular reabsorption in glomerulopathy (e.g. nephrotic syndrome), combined glomerular tubulointerstitial nephropathy or in renal failure following diabetic nephropathy or other causes (overflow proteinuria). Albumin has two main functions in plasma: maintaining the oncotic pressure (80 % due to albumin in plasma) and transport. It is the most important transport protein for substances having low water solubility (such as free fatty acids, bilirubin, metal ions, hormones and pharmaceuticals).

Depressed albumin levels are caused by hyperhydration, hepatocellular synthesis insufficiency, secretion disorders in the intravascular space, abnormal distribution between the intravascular and extravascular space, catabolism and loss of albumin, acute phase reactions and congenital analbuminemia.

Blood brain barrier disorders can be reliably quantified with the aid of the albumin CSF/serum ratio. Elevated albumin ratios are indicative of a blood brain barrier disorder.

By simultaneously determining IgG in CSF and serum while taking into account the individual albumin ratios, it is possible to differentiate between IgG originating from the blood and CNS-synthesized immunoglobulin. IgG

predominates in multiple sclerosis, chronic HIV encephalitis, neurosyphilis and herpes simplex encephalitis.

A variety of methods, such as radial immunodiffusion, nephelometry and turbidimetry, are available for the determination of albumin.

Test principle¹

Immunoturbidimetric assay.

Anti-albumin antibodies react with the antigen in the sample to form antigen/antibody complexes which, following agglutination, are measured turbidimetrically.

Reagents - working solutions

R1 TRIS buffer: 50 mmol/L, pH 8.0; PEG: 4.2 %; EDTA: 2.0 mmol/L; preservative

R2 Polyclonal anti-human albumin antibodies (sheep): dependent on titer; TRIS buffer: 100 mmol/L, pH 7.2; preservative

R3 Reagent for antigen excess check.

Albumin in diluted serum (human); NaCl: 150 mmol/L; phosphate buffer: 50 mmol/L, pH 7.0; preservative

R1 is in position A, R2 is in position B and R3 is in position C.

Precautions and warnings

For in vitro diagnostic use.

Exercise the normal precautions required for handling all laboratory reagents.

Disposal of all waste material should be in accordance with local guidelines. Safety data sheet available for professional user on request.

All human material should be considered potentially infectious. All products derived from human blood are prepared exclusively from the blood of donors tested individually and shown to be free from HBsAg and antibodies to HCV and HIV.

The testing methods applied were FDA-approved or cleared in compliance with the European Directive 98/79/EC, Annex II, List A.

However, as no testing method can rule out the potential risk of infection with absolute certainty, the material should be handled with the same level of care as a patient specimen. In the event of exposure, the directives of the responsible health authorities should be followed.^{11,12}

Reagent handling

Ready for use

Storage and stability

ALBT2

Shelf life at 2-8 °C:

See expiration date on **cobas c** pack label.

On-board in use and refrigerated on the analyzer:

12 weeks

Diluent NaCl 9 %

Shelf life at 2-8 °C:

See expiration date on **cobas c** pack label.

ALBT2

Tina-quant Albumin Gen.2



On-board in use and refrigerated on the analyzer: 12 weeks

Specimen collection and preparation

For specimen collection and preparation only use suitable tubes or collection containers.

Only the specimens listed below were tested and found acceptable.

Urine

Serum

Plasma: Li-heparin and K₂-EDTA plasma

CSF

The sample types listed were tested with a selection of sample collection tubes that were commercially available at the time of testing, i.e. not all available tubes of all manufacturers were tested. Sample collection systems from various manufacturers may contain differing materials which could affect the test results in some cases. When processing samples in primary tubes (sample collection systems), follow the instructions of the tube manufacturer.

Centrifuge samples containing precipitates before performing the assay.

CSF

Stability: ¹³	up to 3 days	at 2-8 °C
	6 months	at (-15)-(-25) °C
	indefinitely	at (-60)-(-80) °C

Serum, plasma

Stability: ¹⁴	10 weeks	at 15-25 °C
	5 months	at 2-8 °C
	4 months	at (-15)-(-25) °C

Urine

Spontaneous, 24-hour urine or 2nd morning urine.

Stability: ¹⁴	7 days	at 15-25 °C
	1 month	at 2-8 °C
	6 months	at (-15)-(-25) °C

Materials provided

See "Reagents – working solutions" section for reagents.

Materials required (but not provided)

- See "Order information" section

General laboratory equipment

Assay

For optimum performance of the assay follow the directions given in this document for the analyzer concerned. Refer to the appropriate operator's manual for analyzer-specific assay instructions.

The performance of applications not validated by Roche is not warranted and must be defined by the user.

Application for urine

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 6-15	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mg/L (μmol/L, mg/dL)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	100 μL	–
R2	20 μL	–
R3	6 μL	20 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	6.0 μL	–	–
Decreased	6.0 μL	15 μL	150 μL
Increased	6.0 μL	–	–

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 10-34	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mg/L (μmol/L, mg/dL)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	100 μL	–
R2	20 μL	–
R3	6 μL	20 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	6.0 μL	–	–
Decreased	6.0 μL	15 μL	150 μL
Increased	6.0 μL	–	–

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 10-34	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	mg/L (μmol/L, mg/dL)	
Reagent pipetting	Diluent (H ₂ O)	
R1	100 μL	–
R2	20 μL	–
R3	6 μL	20 μL

Sample volumes	Sample	Sample dilution	
		Sample	Diluent (NaCl)
Normal	6.0 μL	–	–
Decreased	6.0 μL	15 μL	150 μL
Increased	12 μL	–	–

Application for serum and plasma

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End	
Reaction time / Assay points	10 / 6-18	
Wavelength (sub/main)	700/340 nm	
Reaction direction	Increase	
Units	g/L (μmol/L, mg/dL)	

ALBT2

Tina-quant Albumin Gen.2



Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	1.5 µL	1.5 µL	180 µL
Decreased	1.5 µL	1.5 µL	180 µL
Increased	1.5 µL	1.5 µL	180 µL

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 10-34		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	g/L (µmol/L, mg/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	2.0 µL	2.1 µL	175 µL
Decreased	2.0 µL	1.7 µL	180 µL
Increased	2.0 µL	2.1 µL	175 µL

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 10-34		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	g/L (µmol/L, mg/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	2.0 µL	2.1 µL	175 µL
Decreased	2.0 µL	1.7 µL	180 µL
Increased	4.0 µL	2.1 µL	175 µL

Application for CSF

cobas c 311 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 6-15		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		

Reaction direction	Increase		
Units	mg/L (µmol/L, mg/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
R3	6 µL	20 µL	

<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	6.0 µL	10 µL	110 µL
Decreased	3 µL	5 µL	180 µL
Increased	6.0 µL	10 µL	110 µL

cobas c 501 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 10-34		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mg/L (µmol/L, mg/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
R3	6 µL	20 µL	

<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	6.0 µL	10 µL	110 µL
Decreased	3 µL	5 µL	180 µL
Increased	6.0 µL	10 µL	110 µL

cobas c 502 test definition

Assay type	2-Point End		
Reaction time / Assay points	10 / 10-34		
Wavelength (sub/main)	700/340 nm		
Reaction direction	Increase		
Units	mg/L (µmol/L, mg/dL)		
Reagent pipetting		Diluent (H ₂ O)	
R1	100 µL	–	
R2	20 µL	–	
R3	6 µL	20 µL	

<i>Sample volumes</i>	<i>Sample</i>	<i>Sample dilution</i>	
		<i>Sample</i>	<i>Diluent (NaCl)</i>
Normal	6.0 µL	10 µL	110 µL
Decreased	3 µL	5 µL	180 µL
Increased	12.0 µL	10 µL	110 µL

ALBT2

Tina-quant Albumin Gen.2

cobas®

Calibration

Calibrators S1: H₂O
S2-6: C.f.a.s. PUC

Multiply the lot-specific C.f.a.s. PUC calibrator value by the factors below to determine the standard concentrations for the 6-point calibration curve:

cobas c 501/502	S2:	0.0138	S5:	0.467
	S3:	0.0228	S6:	1.00
	S4:	0.0455		

cobas c 311	S2:	0.0276	S5:	0.467
	S3:	0.0456	S6:	1.00
	S4:	0.0909		

Calibration mode RCM

Calibration Full calibration
frequency - after reagent lot change
- and as required following quality control procedures

Traceability: This method has been standardized against the certified reference material in human serum of the IRMM (Institute for Reference Material and Measurements) ERM-DA470k/IFCC.

Quality control

For quality control, use control materials as listed in the "Order information" section.

In addition, other suitable control material can be used.

ALBU2: Precinorm PUC, Precipath PUC

ALBS2: Precinorm Protein, Precipath Protein, PreciControl ClinChem Multi 1, PreciControl ClinChem Multi 2

ALBC2: undiluted Precipath PUC

The control intervals and limits should be adapted to each laboratory's individual requirements. Values obtained should fall within the defined limits. Each laboratory should establish corrective measures to be taken if values fall outside the defined limits.

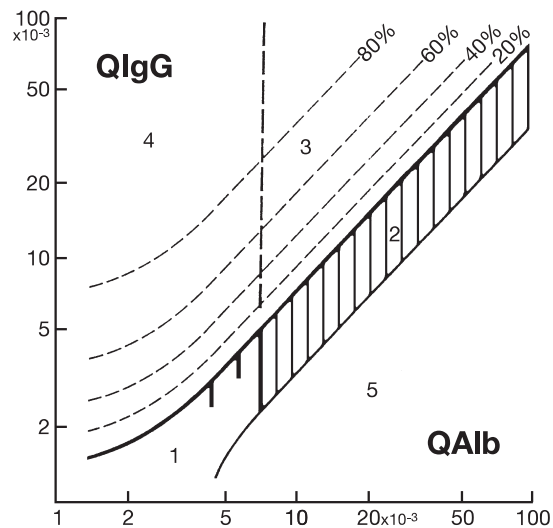
Follow the applicable government regulations and local guidelines for quality control.

Calculation

Roche/Hitachi **cobas c** systems automatically calculate the analyte concentration of each sample.

Conversion factors: g/L x 100 = mg/dL
g/L x 15.2 = μ mol/L
mg/L x 0.1 = mg/dL
mg/L x 0.0152 = μ mol/L

The calculation employs a ratio diagram including hyperbolic functions as differential lines according to Reiber and Felgenhauer. Results from the determination of IgG and albumin in CSF and serum (IgG and albumin ratios)¹⁵ are plotted.



1. Reference range. 2. Blood brain barrier functional disorder without local IgG-synthesis in the CNS. 3. Blood brain barrier functional disorder with concomitant IgG-synthesis in the CNS. 4. IgG synthesis in the CNS without blood brain barrier functional disorder. 5. As confirmed empirically, there are no values in this region (i.e. values here are due to errors introduced by blood sampling or analytical errors). Generally speaking, cases not associated with local IgG synthesis in the CNS lie below the bold line (hyperbolic function). The percentage values indicate what percentage of the total IgG in CSF (minimum) originates in the CNS relative to the statistically-defined 0 % differential lines.

Limitations - interference

Urine

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at an albumin concentration of 20 mg/L (0.30 μ mol/L, 2 mg/dL).

Icterus: No significant interference up to a conjugated bilirubin concentration of 855 μ mol/L or 50 mg/dL.

Hemolysis: No significant interference up to a hemoglobin concentration of 248 μ mol/L or 400 mg/dL.

No interference by acetone ≤ 60 mmol/L, ammonia chloride ≤ 0.11 mol/L, calcium ≤ 40 mmol/L, creatinine ≤ 0.18 mol/L, γ -globulin ≤ 500 mg/L, glucose ≤ 0.19 mol/L, urea ≤ 0.8 mol/L, uric acid ≤ 5.95 mmol/L and urobilinogen ≤ 378 μ mol/L.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.¹⁶

High dose hook-effect: Using the prozone check, no false result without a flag was observed up to an albumin concentration of 40000 mg/L (608 μ mol/L, 4000 mg/dL).

Serum/plasma

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at an albumin concentration of 35 g/L (532 μ mol/L, 3500 mg/dL).

Icterus:¹⁷ No significant interference up to an I index of 60 for conjugated and unconjugated bilirubin (approximate conjugated and unconjugated bilirubin concentration: 1026 μ mol/L or 60 mg/dL).

Hemolysis:¹⁷ No significant interference up to an H index of 1000 (approximate hemoglobin concentration: 621 μ mol/L or 1000 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹⁷ No significant interference up to an L index of 1500. There is poor correlation between the L index (corresponds to turbidity) and triglycerides concentration.

Rheumatoid factors ≤ 1200 IU/mL do not interfere.

Drugs: No interference was found at therapeutic concentrations using common drug panels.^{18,16}

In very rare cases, gammopathy, in particular type IgM (Waldenström's macroglobulinemia), may cause unreliable results.¹⁹

CSF

Criterion: Recovery within $\pm 10\%$ of initial value at an albumin concentration of 240 mg/L (3.65 μ mol/L, 24 mg/dL).

Hemolysis: No significant interference up to a hemoglobin concentration of 620 µmol/L or 1000 mg/dL.

High dose hook-effect: Using the prozone check, no false result without a flag was observed up to an albumin concentration of 30000 mg/L (456 µmol/L, 3000 mg/dL).

For diagnostic purposes, the results should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.

ACTION REQUIRED

Special Wash Programming: The use of special wash steps is mandatory when certain test combinations are run together on Roche/Hitachi **cobas c** systems. The latest version of the carry-over evasion list can be found with the NaOHD/SMS/Multiclean/SCCS or the NaOHD/SMS/SmpCln1+2/SCCS Method Sheets. For further instructions refer to the operator's manual. **cobas c** 502 analyzer: All special wash programming necessary for avoiding carry-over is available via the **cobas** link, manual input is not required.

Where required, special wash/carry-over evasion programming must be implemented prior to reporting results with this test.

Limits and ranges

Measuring range

Urine

cobas c 501/502: 3-400 mg/L (0.05-6.08 µmol/L, 0.3-40 mg/dL)

cobas c 311: 3-200 mg/L (0.05-3.04 µmol/L, 0.3-20 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:11 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 11.

Serum, plasma

cobas c 501/502: 3-101 g/L (46-1540 µmol/L, 300-10100 mg/dL)

cobas c 311: 3-96 g/L (46-1459 µmol/L, 300-9600 mg/dL)

cobas c 501/502: Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:1.27 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 1.27.

cobas c 311: Determine samples having higher concentrations by a manual predilution of 1:2. Calculate the final results by multiplying the measured value with a factor of 2.

CSF

cobas c 501/502: 36-4800 mg/L (0.55-73.0 µmol/L, 3.6-480 mg/dL)

cobas c 311: 36-2400 mg/L (0.55-36.5 µmol/L, 3.6-240 mg/dL)

Determine samples having higher concentrations via the rerun function. Dilution of samples via the rerun function is a 1:6.2 dilution. Results from samples diluted using the rerun function are automatically multiplied by a factor of 6.2.

Lower limits of measurement

Limit of Blank (LoB) and Limit of Detection (LoD)

Urine

LoB = 2 mg/L

LoD = 3 mg/L

Serum, plasma

LoB = 1 g/L

LoD = 2 g/L

CSF

LoB = 20 mg/L

LoD = 36 mg/L

The Limit of Blank and Limit of Detection were determined in accordance with the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A requirements.

The Limit of Blank is the 95th percentile value from $n \geq 60$ measurements of analyte-free samples over several independent series. The Limit of Blank

corresponds to the concentration below which analyte-free samples are found with a probability of 95 %.

The Limit of Detection is determined based on the Limit of Blank and the standard deviation of low concentration samples.

The Limit of Detection corresponds to the lowest analyte concentration which can be detected (value above the Limit of Blank with a probability of 95 %).

Values below the Limit of Detection (≤ 3 mg/L (urine); ≤ 3 g/L (serum, plasma); ≤ 36 mg/L (CSF)) will not be flagged by the instrument.

Expected values

Urine

2nd morning urine:⁵

Adults: < 20 mg albumin/g creatinine or
< 2.26 g (34.35 µmol) albumin/mol creatinine

Children (3-5 years):²⁰ < 20 mg/L (0.304 µmol/L, 2 mg/dL) albumin
< 37 mg albumin/g creatinine

24-hour urine:²¹ < 20 mg/L (0.304 µmol/L, 2 mg/dL)
< 30 mg/24 h (0.456 µmol/24 h)

Serum/plasma

Reference Range Study:²²

Adults 3.56-4.61 g/dL (35.6-46.1 g/L; 541-701 µmol/L)

Consensus values:²³

Adults 3.5-5.2 g/dL (35-52 g/L; 532-790 µmol/L)

Reference intervals according to Tietz:²⁴

Newborns 0-4 d: 2.8-4.4 g/dL (28-44 g/L; 426-669 µmol/L)

Children 4 d-14 yr: 3.8-5.4 g/dL (38-54 g/L; 578-821 µmol/L)

Children 14-18 yr: 3.2-4.5 g/dL (32-45 g/L; 486-684 µmol/L)

Albumin CSF/serum ratio ($Q_{ALB} \times 10^3$)

Adults: ⁶	up to 15 years	5.0
	up to 40 years	6.5
	up to 60 years	8.0

Each laboratory should investigate the transferability of the expected values to its own patient population and if necessary determine its own reference ranges.

Specific performance data

Representative performance data on the analyzers are given below. Results obtained in individual laboratories may differ.

Precision

Precision was determined using human samples and controls in an internal protocol with repeatability ($n = 21$) and intermediate precision (3 aliquots per run, 1 run per day, 21 days). The following results were obtained:

Urine

<i>Repeatability</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>CV</i>
	<i>mg/L (µmol/L, mg/dL)</i>	<i>mg/L (µmol/L, mg/dL)</i>	<i>%</i>
Precinorm PUC	30.7 (0.467, 3.07)	0.2 (0.003, 0.02)	0.8
Precipath PUC	108 (1.64, 10.8)	1 (0.01, 0.1)	0.7
Human urine 1	14.3 (0.217, 1.43)	0.2 (0.003, 0.02)	1.6
Human urine 2	252 (3.83, 25.2)	4 (0.06, 0.4)	1.6

<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>SD</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>CV</i> %
Precinorm PUC	31.2 (0.474, 3.12)	0.5 (0.008, 0.05)	1.7
Precipath PUC	105 (1.60, 10.5)	1 (0.02, 0.1)	1.2
Human urine 3	13.6 (0.207, 1.36)	0.4 (0.006, 0.04)	2.8
Human urine 4	60.6 (0.921, 6.06)	1.4 (0.021, 0.14)	2.3

Serum/plasma

<i>Repeatability</i>	<i>Mean</i> g/L (μmol/L, mg/dL)	<i>SD</i> g/L (μmol/L, mg/dL)	<i>CV</i> %
Precinorm Protein	39.9 (606, 3990)	0.5 (8, 50)	1.2
Precipath Protein	66.6 (1012, 6660)	1.4 (21, 140)	2.1
Human serum 1	27.6 (420, 2760)	0.3 (5, 40)	1.3
Human serum 2	62.5 (950, 6250)	0.9 (14, 90)	1.5

<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i> g/L (μmol/L, mg/dL)	<i>SD</i> g/L (μmol/L, mg/dL)	<i>CV</i> %
Precinorm Protein	42.3 (643, 4230)	0.9 (14, 90)	2.0
Precipath Protein	70.5 (1072, 7050)	1.6 (24, 160)	2.2
Human serum 3	7.78 (118, 778)	0.74 (11, 74)	9.5
Human serum 4	36.2 (550, 3620)	0.7 (11, 70)	2.1

CSF

<i>Repeatability</i>	<i>Mean</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>SD</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>CV</i> %
Precipath PUC	99.2 (1.51, 9.92)	1.4 (0.02, 0.14)	1.4
Human CSF 1	174 (2.64, 17.4)	3 (0.05, 0.3)	1.7
Human CSF 2	383 (5.82, 38.3)	4 (0.06, 0.4)	1.0
C.f.a.s. PUC	454 (6.90, 45.4)	4 (0.06, 0.4)	0.8

<i>Intermediate precision</i>	<i>Mean</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>SD</i> mg/L (μmol/L, mg/dL)	<i>CV</i> %
Precipath PUC	91.0 (1.38, 9.1)	2.9 (0.04, 0.29)	3.2
Control level 2	389 (5.91, 38.9)	7 (0.11, 0.7)	1.7
Human CSF 3	166 (2.53, 16.6)	4 (0.06, 0.4)	2.3
Human CSF 4	366 (5.56, 36.6)	5 (0.07, 0.5)	1.3

Method comparison**Urine**

Albumin values for human urine samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined using the same reagent on a Roche/Hitachi 917 analyzer (x).

Sample size (n) = 129

Passing/Bablok ²⁵	Linear regression
y = 1.021x - 2.91 mg/L	y = 1.026x - 3.66 mg/L
τ = 0.984	r = 0.999

The sample concentrations were between 4.60 and 386 mg/L (0.070 and 5.87 μmol/L, 0.460 and 38.6 mg/dL).

Serum/plasma

Albumin values for human serum and plasma samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined with a nephelometric albumin test (x).

Sample size (n) = 80

Passing/Bablok ²⁵	Linear regression
y = 0.950x + 0.195 g/L	y = 0.941x + 0.581 g/L
τ = 0.923	r = 0.993

The sample concentrations were between 5.70 and 107 g/L (86.6 and 1626 μmol/L, 570 and 10700 mg/dL).

CSF

Albumin values for human CSF samples obtained on a Roche/Hitachi **cobas c** 501 analyzer (y) were compared with those determined with a nephelometric albumin test (x).

Sample size (n) = 85

Passing/Bablok ²⁵	Linear regression
y = 1.000x - 8.75 mg/L	y = 0.991x + 0.301 mg/L
τ = 0.936	r = 0.992

The sample concentrations were between 115 and 2640 mg/L (1.75 and 40.1 μmol/L, 11.5 and 264 mg/dL).

References

- Multicenter study of Tina-quant Albumin in urine and β-N-acetylglucosaminidase (β-NAG) in urine. Workshop Munich, November 29-30, 1990 Wien Klin Wschr 1991;103 Suppl.189:1-64.
- Greiling H, Gressner AM, eds. Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3rd ed. Stuttgart/New York: Schattauer Verlag 1995:749-750.
- Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. Hepatology 1988;8(2):385-401.
- Schäufelberger H, Caduff F, Engler F, et al. Evaluation eines Streifentests (Micral-Test) zur semiquantitativen Erfassung der Mikroalbuminurie in der Praxis. Schweiz Med Wschr 1992;122:576-581.
- Hofmann W, Guder WG. A diagnostic program for quantitative analysis of proteinuria. J Clin Chem Clin Biochem 1989;27:589-600.
- Reiber H. External Quality Assessment in Clinical Neurochemistry: Survey of Analysis for Cerebrospinal Fluid (CSF) Proteins based on CSF/Serum Quotients. Clin Chem 1995;41:256-263.
- Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer of the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. Clin Chim Acta 1987;163(3):319-328.
- Reiber H. Die diagnostische Bedeutung neuroimmunologischer Reaktionsmuster im Liquor cerebrospinalis. Lab med 1995;19:444-462.
- Zimmermann K, Marr U, Linke E. Liquordiagnostik, MTA 1996;11:258-260.
- Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci 1994;122:189-203.
- Occupational Safety and Health Standards: bloodborne pathogens. (29 CFR Part 1910.1030). Fed. Register.
- Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
- Tietz NW, ed. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company 1995;24.
- Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations. WHO Publication WHO/DIL/LAB/99.1 Rev. 2. Jan. 2002.
- Reiber H. The hyperbolic function: a mathematical solution of the protein flux/CSF flow model for blood-CSF barrier function. J Neurol Sci 1994;126:243-245.

- 16 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. *Ann Clin Biochem* 2001;38:376-385.
- 17 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.
- 18 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:385-386.
- 19 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(9):1240-1243.
- 20 Hubbuch A. Results of a multicenter study of provisional reference ranges for albumin in urine of children and adults. Roche publication.
- 21 Hasslacher C. Diagnostische Überwachung und Therapie in den Stadien der diabetischen Nierenerkrankung. *Akt Endokr Stoffw* 1989;10:60-63.
- 22 Junge W, Bossert-Reuther S, Klein G, et al. Reference Range Study for Serum Albumin using different methods. *Clin Chem Lab Med* (June 2007 Poster EUROMEDLAB) 2007;45 Suppl:194.
- 23 Dati F, Schumann G, Thomas L, et al. Consensus of a group of professional societies and diagnostic companies on guidelines for interim reference ranges for 14 proteins in serum based on the standardization against the IFCC/BCR/CAP reference material (CRM 470). *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:517-520.
- 24 Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. St Louis, Missouri; Elsevier Saunders 2006;549.
- 25 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

A point (period/stop) is always used in this Method Sheet as the decimal separator to mark the border between the integral and the fractional parts of a decimal numeral. Separators for thousands are not used.

Symbols

Roche Diagnostics uses the following symbols and signs in addition to those listed in the ISO 15223-1 standard.

CONTENT

Contents of kit



Volume after reconstitution or mixing

COBAS, COBAS C, PRECINORM, PRECIPATH, PRECICONTROL and TINA-QUANT are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

Significant additions or changes are indicated by a change bar in the margin.

© 2013, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com



المخلص

المقدمة:

لوحظ أن المرضى الذين لديهم مستويات مماثلة من HbA1c يظهرون تباينات في المخاطر ومتوسط السكر في الدم. يُعرف هذا الظاهرة باسم التباين البيولوجي للجليكيشن، ويمكن تقييمها من خلال تقدير فجوة الجليكيشن (G-Gap) الهدف من دراستنا هو تقييم مفهوم فجوة الجليكيشن بين عينة من مرضى السكري من النوع الثاني وفحص تأثير تقلبات الجليكيشن على مستويات الهوموسيستين والألبومين الدقيق في البول لهؤلاء المرضى.

المواد والطرق:

هذه دراسة وصفية عرضية تحليلية أجريت على 170 مريضاً بالسكري من النوع الثاني بدون مضاعفات. تم تجنيد هؤلاء المرضى خلال استشارات متخصصة في أمراض الغدد الصماء والسكري في ثلاثة عيادات في مقاطعة عنابة. تم إجراء تقييمات بيوكيميائية روتينية، تشمل الجلوكوز، HbA1c، الفركتوزامين، ومعايير ملف الدهون جنباً إلى جنب مع حساب المؤشرات الأثيروجينية. كما تم قياس مستويات الهوموسيستين، وكذلك الألبومين الدقيق في البول في عينة بول صباحية، معبراً عنها بملغ/مول من الكرياتينين (RAC).

النتائج:

كان متوسط عمر المرضى المصابين بالسكري في دراستنا 60.01 ± 9.11 سنة. نسبة الإناث إلى الذكور هي 1.61. أغلبية الموضوعات، والتي تمثل 71%، كانوا مجليكين بمعدل متوسط ($G-GAP = [-1 \sim +1]$)، بينما كان 15.29% منهم مجليكين مرتفعين ($G-GAP > +1$). كانت فجوة الجليكيشن ($G-GAP$) أعلى في المرضى المصابين بارتفاع ضغط الدم ($p=0.007$) وأولئك الذين كانت مدة إصابتهم بالسكري أكثر من 7 سنوات ($p=0.046$) كما كانت أعلى بشكل ملحوظ في المرضى الذين يعالجون بالأنسولين مقارنة بأولئك الذين يتناولون الأدوية المضادة للسكري عن طريق الفم ($p=0.039$). أظهر تحليل الارتباط بيرسون ارتباطات إيجابية ومعنوية بين $G-GAP$ وعدة معايير بيوكيميائية، بما في ذلك $HbA1c$ ($r = 0.744, p < 0.001$)، الكوليسترول الكلي ($r = 0.285, p < 0.001$)، كوليسترول LDL ($r = 0.285, p < 0.001$)، الكوليسترول غير الـHDL ($r = 0.270, p = 0.000$)، مستويات الهوموسيستين ($r = 0.487, p < 0.001$)، ونسبة μALB كرياتينين ($r = 0.472, p < 0.0001$). علاوة على ذلك، تميز المجليكين المرتفعين بمحيط خصر أعلى وتواتر ديسليبيديا (42.3%) بشكل ملحوظ مقارنة بالمجليكين المنخفض والمتوسط. كانت مستويات RAC والهوموسيستين أعلى بشكل ملحوظ ($p=0.000$) في المجليكين المرتفعين مقارنة بالمجليكين المتوسط والمنخفض. كان للمرضى الذين لديهم نسبة RAC مرضية أكبر من 3 ملغ/مول ومستوى هوموسيستين مرضي أكثر من 15 $\mu mol/l$ مخاطر أعلى بكثير للحصول على ملف جليكيشن مرتفع ($G-GAP$ أكبر من 1)، مع زيادة في الخطر 32 مرة (فترة الثقة 95% $[10.66 - 89.87]$) و 19 مرة (فترة الثقة 95% $[2.56 - 47.4]$) على التوالي، مقارنة بأولئك الذين لديهم مستويات طبيعية.

الخلاصة

ارتفاع في $G-Gap$ يرتبط بعدم التوازن الجلوكومي، ملف ليبيد مضطرب، ومخاطر قلبية وعائية في مرضى السكري من النوع الثاني. ندعو إلى إجراء دراسات طولية ودراسات حالة-ضابط لاستكشاف هذه العلاقة بشكل أكبر، الأمر الذي قد يكون مفيداً لإدارة خطر تطوير مضاعفات قلبية وعائية خطيرة في الأفراد المصابين بالسكري من النوع الثاني.

الكلمات المفتاحية: السكري، فجوة الجليكيشن، الهوموسيستين، الألبومين الدقيق في البول، المضاعفات.

ABSTRACT

Introduction: It has been observed that patients with equivalent HbA1c levels exhibit variations in risk and average glycemia. This phenomenon, known as the biological variation of glycation, can be assessed by estimating the glycation gap (G-Gap). The aim of our study is to evaluate the glycation gap concept among a sample of type 2 diabetic patients and to examine the impact of glycation variability on homocysteine levels and microalbuminuria in these patients.

Materials and Methods: This is a cross-sectional study with an analytical component, conducted with 170 type 2 diabetic subjects without complications. These subjects were recruited during specialized consultations in endocrinology and diabetology at three polyclinics in the ANNABA province. Routine biochemical assessments were performed, including glucose, HbA1c, fructosamines, and lipid profile parameters along with atherogenic indices calculations. Homocysteine levels were also measured, as well as microalbuminuria in a morning urine sample, expressed in mg/mol of creatinine (RAC).

Results: The average age of the diabetic patients in our study is 60.01 ± 9.118 years. The female to male ratio is 1.61. The majority of subjects, 71%, were average glycators (G-GAP = $[-1 \sim +1]$), while 15.29% were high glycators (G-GAP $> +1$). The G-GAP was higher in diabetics suffering from hypertension ($p=0.007$) and those with a diabetes duration longer than 7 years ($p=0.046$). It was also significantly higher in insulin-treated diabetics compared to those on oral antidiabetic drugs ($p=0.039$). Pearson correlation analysis revealed significant positive correlations between G-GAP and several biochemical parameters, including HbA1c ($r = 0.744$, $p < 0.001$), total cholesterol ($r = 0.285$, $p < 0.001$), LDL cholesterol ($r = 0.285$, $p < 0.001$), non-HDL cholesterol ($r=0.270$, $p=0.000$), homocysteine levels ($r = 0.487$, $p < 0.001$), and the RAC ($r = 0.472$, $p < 0.0001$). Furthermore, high glycators were characterized by a significantly higher average waist circumference and a frequency of dyslipidemia (42.3%) compared to low and average glycators ($p=0.000$). The average RAC and homocysteine levels were significantly higher ($p=0.000$) in high glycators compared to medium and low glycators. Diabetics with a pathological RAC greater than 3 mg/mol and a pathological homocysteine level greater than $15\mu\text{mol/l}$ had significantly higher risks of having a high glycation profile (G-GAP greater than 1), with a 32 times increased risk (95% confidence interval = $[10.66 - 89.87]$) and 19 times (95% confidence interval = $[2.56 - 47.4]$) respectively, compared to those with normal levels.

Conclusion: An elevation in the G-Gap is associated with glycemic imbalance, disturbed lipid profile, and cardiovascular risk in type 2 diabetics. We advocate for the performance of longitudinal and case-control studies to further explore this relationship, which could be beneficial for managing the risk of developing serious cardiovascular complications in type 2 diabetic individuals.

KEYWORDS: Diabetes, Glycation gap, Homocysteine, Microalbuminuria, Complications.

RESUME

Introduction : Il a été constaté que, les patients ayant des niveaux d'HbA1c équivalents présentent des différences en termes de risque et de glycémie moyenne. Ce phénomène, connu sous le nom de variation biologique de la glycation, peut être évalué par l'estimation du trou de glycation (Glycation Gap = G-Gap). L'objectif de notre étude était d'évaluer le concept de trou de glycation chez un échantillon de patients diabétiques de type 2 (DT2) et examiner l'impact de la variabilité de la glycation sur les niveaux d'homocystéine et de micro-albuminurie chez ces patients.

Matériel et méthodes : Il s'agit d'une étude transversale à visée analytique réalisée avec 170 sujets diabétiques type 2 ne présentant aucune complication, ils étaient recrutés lors des consultations spécialisées en endocrinologie diabétologie dans 03 polycliniques de la wilaya d'ANNABA. Un bilan biochimique de routine a été réalisé à savoir : la glycémie, l'HbA1c, la fructosamine et les paramètres du bilan lipidique accompagné par le calcul des indices d'athérogénécité. Le dosage de l'homocystéine a été réalisé aussi ainsi que le dosage de la micro-albuminurie dans un échantillon urinaire matinal et exprimé en mg/mmol de créatininurie (RAC).

Résultats : L'âge moyen des patients diabétiques dans notre étude était de $60,01 \pm 9,11$ ans. Le sexe ratio F/H était de 1,61. La majorité des sujets soit 71% étaient des glyqueurs moyens ($G-GAP = [-1 \sim +1]$) contre 15,29 % des glyqueurs élevés ($G-GAP > +1$). Le G-GAP était plus élevé chez les diabétiques ayant une ancienneté du diabète supérieur à 7ans ($p=0,046$). Il est également significativement plus élevé chez les diabétiques sous insuline par rapport à ceux sous antidiabétiques oraux ($p=0,039$). L'analyse de corrélation de Pearson a révélé **des corrélations positives et significatives** entre le G-GAP et plusieurs paramètres biochimiques à savoir : l'HbA1c ($r = 0,744, p < 0,001$), le cholestérol total ($r = 0,285, p < 0,001$), le cholestérol-LDL ($r = 0,285, p < 0,001$), le cholestérol non HDL ($r=0,270, (p<10^{-3})$), l'homocystéinémie ($r = 0,487, p < 0,001$) et le RAC ($r = 0,472, p<0,0001$). Par ailleurs, les glyqueurs élevés se caractérisent par une moyenne de tour de taille et une fréquence de dyslipidémie (42,3%) significativement ($(p<10^{-3})$) plus élevées par rapport aux glyqueurs bas ($p=0,000$) et moyens ($(p<10^{-3})$).

La moyenne du RAC et de l'homocystéinémie étaient significativement ($p<10^{-3}$) supérieures chez les glyqueurs élevés par rapport aux glyqueurs moyens et bas.

Les diabétiques ayant RAC pathologique supérieur à 3mg/mmol et une homocystéinémie pathologique supérieure à 15 μ mol/l présentaient 30 fois plus de risque (IC à 95% = [10,66 – 89,87]) et 19 fois plus de risque (intervalle de confiance à 95%= [2,56 – 47,41]) d'avoir un profil de glycation élevé respectivement, comparativement à ceux présentant des niveaux normaux.

Conclusion :

Une élévation du G-Gap est liée à un déséquilibre glycémique, un profil lipidique perturbé et un risque cardiovasculaire chez les diabétiques de type 2. Nous préconisons la réalisation d'études longitudinales et cas-témoins afin d'approfondir cette relation, ce qui pourrait être bénéfique pour la gestion du risque de développer des complications cardiovasculaires graves chez les individus diabétiques type 2.

MOTS CLES : Diabète, Glycation gap, Homocystéine, Micro-albuminurie, Complications.