

## **ESERCITAZIONE:**

**Dosaggio del glucosio in siero equino  
Mediante saggio spettrofotometrico**

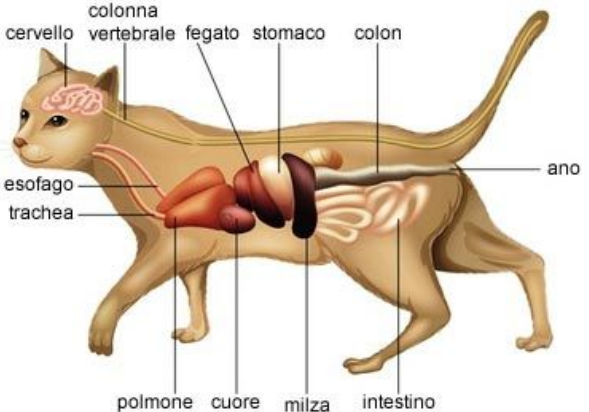
# Markers di tipo BIOCHIMICO utilizzati per la diagnosi clinica

IONI, SALI, MINERALI	PICCOLE MOLECOLE ORGANICHE	GRANDI MACROMOLECOLE BIOLOGICHE: PROTEINE
Sodio Potassio Calcio Cloruro Magnesio Fosforo Piombo Ferro	<b>METABOLITI</b>  Colesterolo Urea Acido Lattico Bilirubina Creatinina Trigliceridi <b>Glucosio</b>	<b>TRASPORTO</b> Albumina Trasferrina Ferritina  <b>ENZIMI</b> Lipasi Amilasi Trasferasi (Aspartato aminotrasferasi (AST), Alanina Aminotrasferasi (ALT)) Fosfatasi alcalina Lattato deidrogenasi Creatina chinasi  <b>LIPOPROTEINE (LDL, HDL)</b>  <b>MARKER SPECIFICI</b> Immunoglobuline <b>HbA<sub>1c</sub> (Hb glicata)</b>


# COMBINAZIONE DI TEST: PROFILI (PANELS)

Generalmente un solo test non è sufficiente per effettuare una diagnosi, ma occorre effettuare una **combinazione di test**, ossia delineare un PROFILO utilizzando diversi markers

PROFILO ELETTROLITICO	PROFILO EPATICO	PROFILO METABOLICO BASALE	PROFILO LIPIDICO
Sodio Potassio Cloro Diossido di carbonio	<ul style="list-style-type: none"><li>• ENZIMI: Fosfatasi alcalina Gamma GT Transaminasi Lattato deidrogenasi</li><li>• PROTEINE: Albumina</li><li>• PRODOTTI DI DEGRADAZIONE Bilirubina</li></ul>	Sodio Cloruro Potassio CO <sub>2</sub> <b>Glucosio</b> Creatinina Urea	Colesterolo totale Trigliceridi LDL HDL



# Principali METODI DI RILEVAZIONE DEI Markers di tipo biochimico



Spettrofometria/spettrofluorimetria, colorimetria, chemiluminescenza (saggi enzimatici)

ELETTROFORETICI (SDS-PAGE, 2D-PAGE, IEF)

Dosaggi Immunologici (riconoscimento antigene/anticorpo) (ELISA)

Cromatografici: separazione in funzione di proprietà dell'analita

# FONTI PRINCIPALI DEGLI ANALITI DI TIPO BIOCHIMICO: FLUIDI

## FLUIDI CONTENENTI ANALITI BIOCHIMICI

**Sangue (intero, plasma, siero)**

Urine

Liquido amniotico

Saliva

Liquido sinoviale

....

# COMPOSIZIONE DEL SANGUE

## SANGUE INTERO

### SIERO

### Elementi cellulari

Amino acids

Nitrogenous waste

Piastrine

Glucosio,  
Colesterolo  
trigliceridi

Nutrients

Electrolytes

Leukocytes

Erythrocytes

Proteins

Gases

Granulocytes

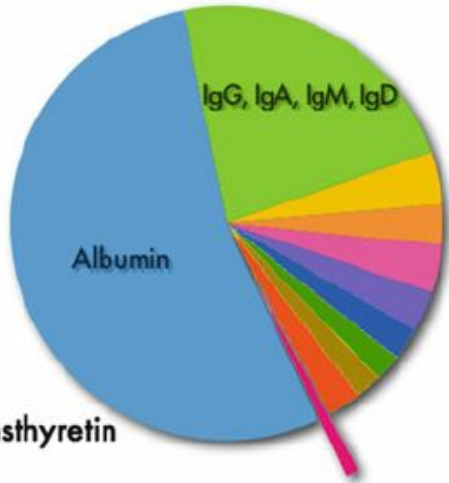
Agranulocytes

Neutrophils

Basophils

Lymphocytes

Monocytes



Low-abundant 1%

- Albumin
- IgG, IgA, IgM, IgD
- Transferrin
- Fibrinogen, clotting factors
- $\alpha$ 2-Macroglobulin
- $\alpha$ 1-Antitrypsin
- Haptoglobin
- $\alpha$ 1-acid Glycoprotein
- Complement factors
- Lipoproteins/Ceruloplasmin/Transthyretin
- Low-abundant 1%

# Determinazione del glucosio in siero/sangue

## Significato clinico

### IPERGLICEMIA

principalmente  
**DIABETE MELLITO**,  
ma anche  
ipertiroidismo,  
nefriti,  
pancreatiti...



### IPOGLICEMIA

sovradosaggio di insulina, iperinsulinemia,  
ipotiroidismo oltre a condizioni fisiologiche  
quali gravidanza, allattamento, inedia,  
eccessivo esercizio fisico





# IPERGLICEMIA: MARKERS PER IL DIABETE MELLITO

- VETERINARIA: Fruttosamine sieriche**

Anno 31, n° 2, Aprile 2017 VETERINARIA

## Il diabete mellito nel cane: terapia e monitoraggio



Il diabete mellito è una delle più frequenti endocrinopatie del cane. In seguito alla diagnosi, è necessario iniziare una terapia insulinica, nonché una dieta appropriata, al fine di controllare le concentrazioni di glucosio ematiche e conseguentemente la sintomatologia clinica. Il fabbisogno insulinico è influenzato da numerosi fattori. È consigliabile iniziare la terapia con dosaggi insulinici ridotti che devono essere gradualmente incrementati a seguito di frequenti monitoraggi. Nella presente revisione della letteratura si evidenziano i principali aspetti terapeutici e metodi di monitoraggio glicemico in cani affetti da diabete mellito.

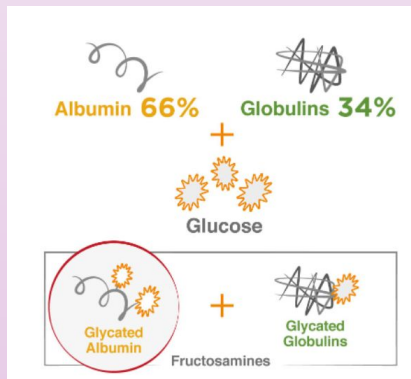
**INTRODUZIONE**  
Il diabete mellito (DM) è una delle endocrinopatie più comuni nel cane ed è dovuto a un deficit nella produzione e/o nell'azione di insulina<sup>1</sup>. Il conseguente sviluppo di iperglicemia e glicosuria è responsabile della comparsa dei segni clinici caratteristici quali poliuria, polidipsia, po-

dove uno stretto controllo glicemico è fondamentale per prevenire complicazioni a lungo termine<sup>2,3</sup>, nel cane non è stato dimostrato un eguale vantaggio nel mantenere la glicemia entro

Francesca Del Baldo\*, Med Vet

Federico Fracassi, Med Vet, PhD, Dipl. ECVIM-CA

**ALBUMINA GLICATA:**  
Saggio enzimatico colorimetrico misura sia l'albumina glicata che l'albumina totale in 2 reazioni separate



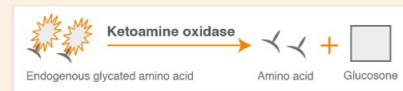
## Principalmente ALBUMINA

### FRUTTOSAMINE SIERICHE

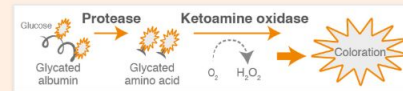
Le fruttosamine sieriche sono proteine glicate che si formano a seguito di un legame non enzimatico ed irreversibile tra glucosio ematico e gruppi amminici delle proteine del sangue<sup>39,40,41</sup>. La loro concentrazione dipende dall'entità della glicemia e dall'emivita delle proteine plasmatiche stesse, pertanto le fruttosamine rispecchiano la concentrazione media del glucosio ematico delle 2-3 settimane precedenti<sup>42</sup> e non sono influenzate da variazioni rapide della glicemia.

In generale la concentrazione di fruttosamine aumenta quando il controllo glicemico peggiora e diminuisce quando il controllo glicemico migliora<sup>1</sup>. È importante

### Elimination of glycated amino acid



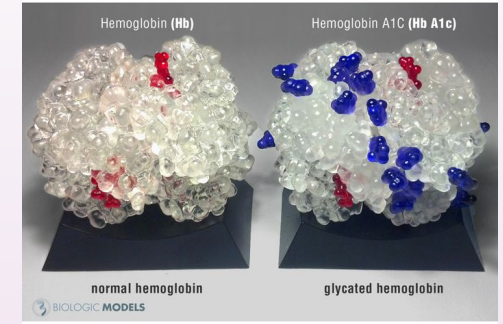
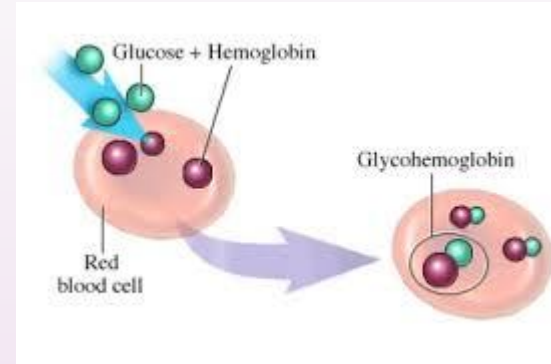
### Determination of glycated albumin



### Determination of albumin

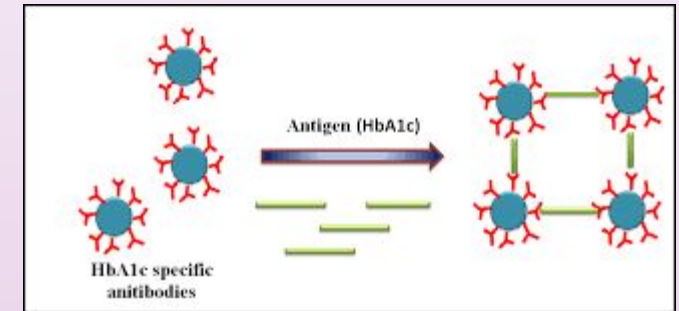


- UMANO Hb glicata (HbA1c)**



## N-glicosilazione

## Test immunologici



**GOLD STANDARD:**  
Cromatografia a scambio ionico (Hb glicata e non glicata hanno carica superficiale differente)

[https://www.ekfusa.com/chemistry\\_range/lucica-glycated-albumin-l-glycemic-control-marker/](https://www.ekfusa.com/chemistry_range/lucica-glycated-albumin-l-glycemic-control-marker/)



# Metodi di misura della glicemia

**GOLD STANDARD:**

Analisi di laboratorio: **PLASMA**

Metodo colorimetrico enzimatico

Esame

**S-GLICEMIA**

*met. Enzimatico Colorimetrico*

**S-CREATININEMIA**

*met. Fotometrico*

**S-COLESTEROLO TOTALE**

*met. Fotometrico*

**S-COLESTEROLO HDL**

*met. Fotometrico*

**S-TRIGLICERIDI**

*met. Fotometrico*

**S-TRANSAMINASI GOT (AST)**

*met. Fotometrico*

**S-TRANSAMINASI GPT (ALT)**

*met. Fotometrico*

**S-GAMMA GT**

*met. Fotometrico*

**S-BILIRUBINA TOTALE**

*met. Fotometrico*

Test Requested	Result	Case Specific	General Range	Units
Alk Phosphatase	22		5 - 131	IU/L
GGT	2		1 - 12	IU/L
Total Billirubin	0.1		0.1 - 0.3	mg/dL
BUN	↑ 38		6 - 31	mg/dL
Creatinine	1.6		0.5 - 1.6	mg/dL
BUN/Creatinine Ratio	24		4 - 27	
Phosphorus	3.6		2.5 - 6.0	mg/dL
Glucose	95		70 - 138	mg/dL
Calcium	11.1		8.9 - 11.4	mg/dL

**GLUCOMETRO:**

biosensore enzimatico  
(elettrochimico)

(veloce ma poco preciso):

**SANGUE**



**CGMS**  
Continuous  
glucose  
measuring  
system

# PLASMA EQUIVALENTE

I livelli di glucosio nel plasma sono maggiori del 10%-15% rispetto ai livelli nel sangue (anche oltre, dopo mangiato).

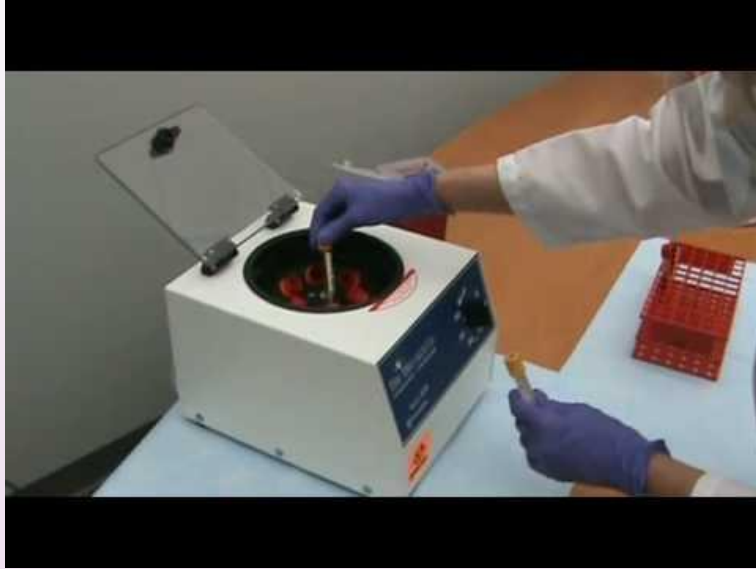
Bisogna tener conto di questa differenza quando si comparano i valori di un'analisi di laboratorio con quelli ottenuti dalla misurazione con glucometro

Per questo, il glucometro misura il livello nel sangue ma può indicare il **'plasma equivalente'**.

NB i valori di riferimento variano da specie a specie.



# Protocollo di Separazione di plasma/ siero: CENTRIFUGAZIONE

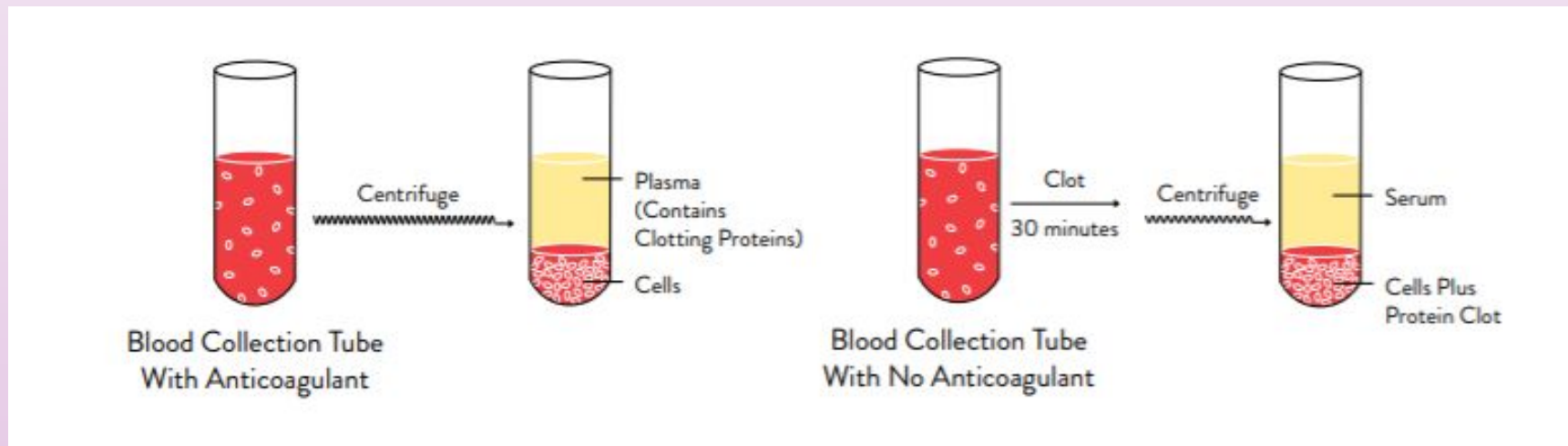


VIDEO

<https://youtu.be/XAhBzUosvsU>

Min 2.57: settings centrifughe

<https://youtu.be/afvSUZU3fPQ>



# Protocollo di Separazione di plasma/ siero: CENTRIFUGAZIONE

## PLASMA

- Raccogliere il sangue intero in tubi contenenti anticoagulante (EDTA o citrato).
  - Centrifugare in una centrifuga refrigerata per 10 minuti a 1000 – 2000 x g per separare le cellule.
- NB una centrifugazione per 15 min alla velocità di **2000 x g** permette la separazione anche delle piastrine.  
Il supernatante risultante è il PLASMA.

## SIERO

- Raccogliere il sangue intero in provette non contenenti anticoagulante
  - Lasciare il sangue coagulare a temperature ambiente per 15-30 min
  - Precipitare il coagulo dal siero mediante centrifugazione in centrifuga REFRIGERATA per 10 minuti alla velocità di **1000-2000 x g**
- Il supernatante risultante è il SIERO.

- Trasferire immediatamente il supernatante mediante **pipetta pasteur** in un tubo appropriato e mantenere i campioni a 2-8°C durante la manipolazione.

Aliquotare (per evitare cicli di congelamento/scongelo) e conservare a -20°C o meno.



## ESERCITAZIONE

- Cercare letteratura scientifica con determinazione di glucosio in varie specie
- Reperire online i valori di riferimento per la glicemia in

CANE

GATTO

CAVALLO

# Articoli scientifici e protocolli online: Le unità di misura della concentrazione

# Valori di riferimento

**Glicemia  
(mg/dL)**

**Cane  
Gatto  
Cavallo**

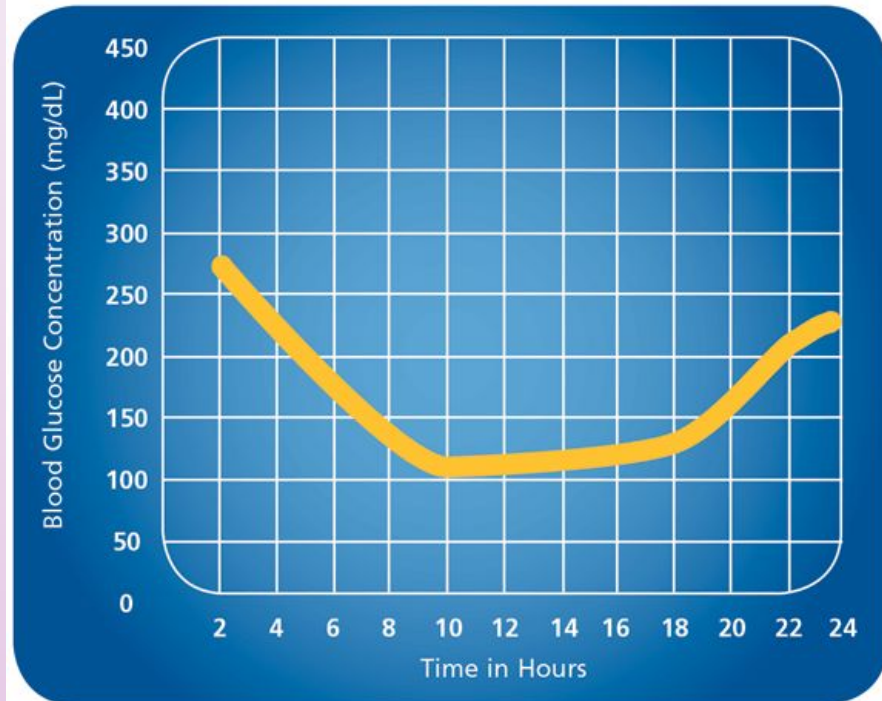
**60-110  
70-110  
77-132**

Esame microscopico del sedimento urinario	Nitriti				
	Entrociti	$10^6/\mu\text{L}$			
	Leucociti	$10^3/\mu\text{L}$			
	Cellule epiteliali		cane gatto		
	Cilindri				
	Cristalli				
Ferro (Sideremia)		microg/dL	cane gatto cavallo	100 - 220 68 - 215 74 - 209	
Fosfatasi alcalina		U/L	cane gatto cavallo	<=280 25 - 93 <=285	
Fosforo		mg/dL	cane gatto cavallo	2.5 - 4.7 4.0 - 5.2 2.0 - 4.3	
Fruttosammina		micromoli/L	cane	non diabetico diabetico	225 - 365 320 - 850
			gatto	non diabetico diabetico	190 - 365 350 - 740
Gamma-glutamnil-transferasi (GGT)		U/L	cane gatto cavallo	<=12 <=5 <=23	
Glicemia		mg/dL	cane gatto cavallo	60 - 110 70 - 110 77 - 132	
Potassio		mEq/L	cane gatto cavallo	4.0 - 5.2 3.0 - 4.8 2.8 - 4.5	
Lattico Deidrogenasi (LDH)		U/L	cane gatto cavallo	<=100 <=100 <=380	
Lipasi		U/L	cane gatto cavallo	<=250	
Magnesio		mg/dL	cane	1.0 - 2.2	
Proteine totali		g/dL	cane gatto cavallo	6.0 - 7.6 5.8 - 7.8 6.1 - 8.0	
Proteine urinarie		mg/dL	cane	5 - 80	
	Proteine totali	g/dL	cane	5.4 - 7.6	
			gatto	5.4 - 7.8	
			cavallo	6.1 - 8.0	
	Albumina	%	cane	50 - 60	
gatto			45 - 55		
		g/dL	cane	2.20 - 3.60	
			gatto	2.20 - 3.20	





## Ideal Blood Glucose Curve: Once-Daily Dosing (Insulin given at time=0)



www.vetsulin.com/vet/Monitoring\_About.aspx

Home iniziare Importati da Firefox cose presenze Practical guides : Stati Save to Mendeley TFinDit: Transcription 3D-footprint: a datab: Nuova scheda

and Administration

About Diabetes Mellitus

Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus

Monitoring and Controlling Diabetes Mellitus

Tools and Materials

FAQs

Other Companion Animal Products

PET owners

### Veterinarians

Go to site [For Pet Owners](#)

Home > Veterinary professionals > **Canine diabetes mellitus: About glucose curves**

## About glucose curves

The glucose curve is an ideal tool for differentiating the problem of short duration of insulin activity versus Somogyi effect. It helps to determine insulin effectiveness, and the maximum and minimum levels of glycemia, which should ideally be between 100–250 mg/dL (5.6–13.9 mmol/L) for the majority of the day. Try our [online glucose curve generator](#).

When creating a glucose curve, remember that stress can affect the reliability of results and the glucose curve is only one tool among others that can help diagnose and monitor canine diabetes mellitus.

### How to complete a glucose curve

Feed and inject the dog with Vetsulin® (porcine insulin zinc suspension) as it is done at home. This may be done by the owner and then verified by the veterinarian. If the dog exercises at home during the day, the same exercise routine should be adhered to while the dog is in the clinic.

Blood sampling:

- Just prior to insulin administration
- Then, in at least 60 to 120 minute intervals
- Over a period of 12 hours, ideally for 24 hours

### How to interpret a glucose curve

It helps to determine:

- Insulin effectiveness. Maximum and minimum glycemia, which should ideally be between 100 and 250 mg/dL (5.6–13.9 mmol/L).

Glucose nadir goal:

- 100–150 mg/dL (5.6–8.3 mmol/L)

Duration of insulin action:

- From the injection to a glycemia of 250 mg/dL (13.9 mmol/L)
- Goals: Once daily 20 hours; twice daily 10-12 hours



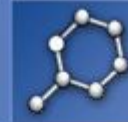
[http://www.vetsulin.com/vet/Monitoring\\_About.aspx](http://www.vetsulin.com/vet/Monitoring_About.aspx)

## Measuring blood glucose

### Two different options:

1. Collect a venous blood sample from a peripheral vein. Plasma glucose concentrations are measured in the laboratory ("gold standard").
2. Collect a drop of capillary blood from the ear (pinna), or sometimes the inner lip or elbow callus, and analyze this using a handheld blood glucose meter (glucometer).
  - Glucometers should be calibrated specifically for dogs and cats because of the difference in the ratios of glucose in plasma and red blood cells from humans.
  - Readings may vary by as much as 15% from samples submitted to the laboratory.
  - Handheld meters are reasonably accurate. If a reading seems unusual or does not match the clinical signs, a second reading should be taken or another method used to confirm the blood glucose measurement.





[J Diabetes Sci Technol](#). 2012 May; 6(3): 534–540.

PMCID: PMC3440056

Published online 2012 May 1. doi: [10.1177/193229681200600307](https://doi.org/10.1177/193229681200600307)

PMID: [22768883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22768883/)

*Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine*

## Diabetes, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome in Horses

[Philip J. Johnson](#), B.V.Sc., M.S., DiplACVIM-LAIM, DipIECEIM, MRCVS,<sup>1</sup> [Charles E. Wiedmeyer](#), D.V.M., Ph.D., DiplACVP,<sup>2</sup> [Alison LaCarrubba](#), D.V.M., DiplABVP,<sup>1</sup> [V. K. \(Seshu\) Ganjam](#), B.V.Sc., M.A., Ph.D.,<sup>3</sup> and [Nat T. Messer, IV](#), D.V.M., DiplABVP<sup>1</sup>

► [Author information](#) ► [Copyright and License information](#) [Disclaimer](#)

# SINDROME METABOLICA EQUINA

<http://liphookequinehospital.co.uk/wp-content/uploads/2012/03/EquineMetabolicSyndrome.pdf>

<http://liphookequinehospital.co.uk/wp-content/uploads/2012/03/OralGlucoseToleranceTesting.pdf>

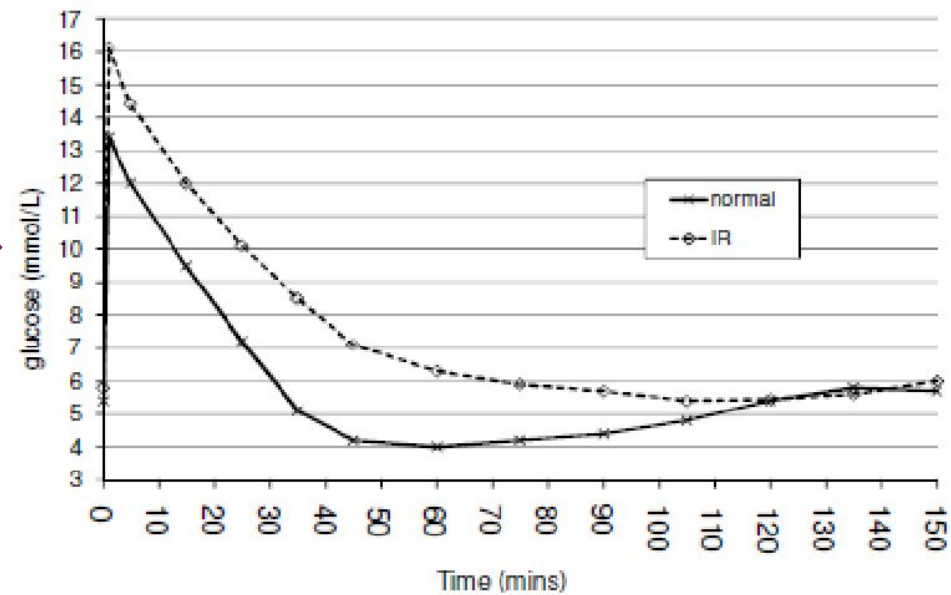


Figure 1. Examples of curves obtained from a normal horse and a horse with insulin resistance using the combined glucose insulin tolerance test



J Vet Intern Med. 2016 Sep-Oct; 30(5): 1726–1731.

PMCID: PMC5032872

Published online 2016 Aug 2. doi: 10.1111/jvim.14529

## The Effect of Fasting Duration on Baseline Blood Glucose Concentration, Blood Insulin Concentration, Glucose/Insulin Ratio, Oral Sugar Test, and Insulin Response Test Results in Horses

F.R. Bertin,<sup>1</sup> S.D. Taylor,<sup>1</sup> A.W. Bianco,<sup>1</sup> and J.E. Sojka-Kritchevsky<sup>1</sup>

Author information Article notes Copyright and License information

### Abstract

Go to:

#### Objectives

Published descriptions of the oral sugar test (OST) and insulin response test (IRT) have been inconsistent when specifying the protocol for fasting horses before testing. The purpose of our study was to examine the effect of fasting duration on blood glucose concentration, blood insulin concentration, glucose/insulin ratio, OST, and IRT results in horses.

#### Animals

Ten healthy adult horses.

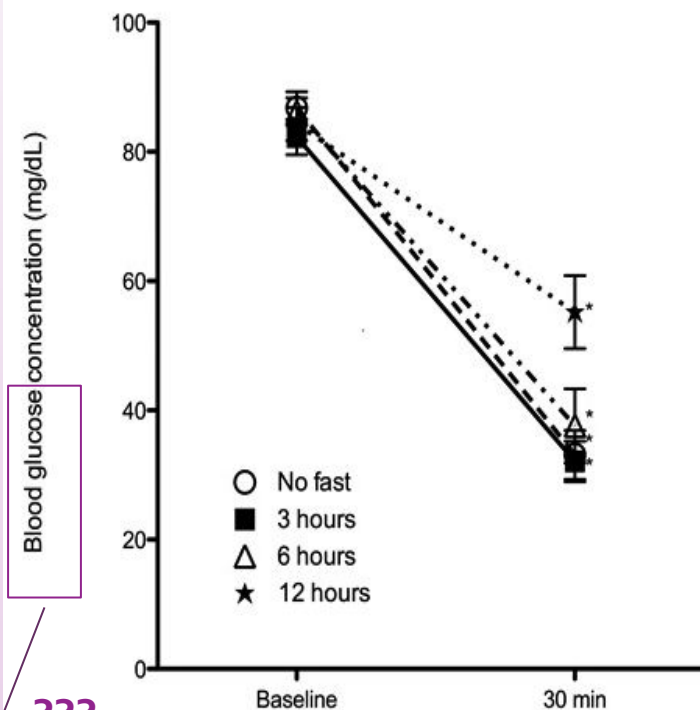
#### Procedures

Both OST and IRT were performed on horses without fasting and after fasting for 3, 6, and 12 hours. Thus, 8 tests were performed per horse in a randomized order. Blood collected at the initial time point of the OST was analysed for both blood glucose and serum insulin concentrations so that baseline concentrations and the glucose/insulin ratio could be determined. Unless fasted, horses had free-choice access to grass hay.

#### Results

There was no effect of fasting and fasting duration on blood glucose concentration, serum insulin concentration, glucose/insulin ratio, or the OST. Response to insulin in the IRT was decreased in fasted horses. The effect increased with fasting duration, with the least response to insulin administration after a 12-hour fast.

### Figure 2



???

Effect of fasting on values of serum glucose concentration (mean ± standard deviation, mg/dL) after intravenous administration of 0.1 IU/kg regular insulin in 10 horses after not fasting (open circles) and fasting for 3 (black squares), 6 (open triangles), and 12 (black stars) hours (\* $P < .05$  from baseline).





Portare in laboratorio il  
PC