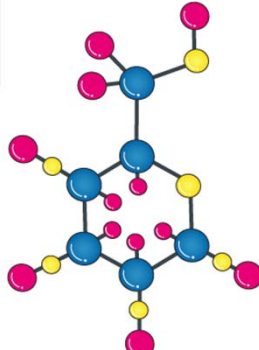
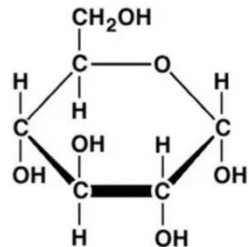


**ESERCITAZIONE:**  
**Dosaggio del glucosio in siero  
mediante saggio spettrofotometrico**

Annalaura Sabatucci

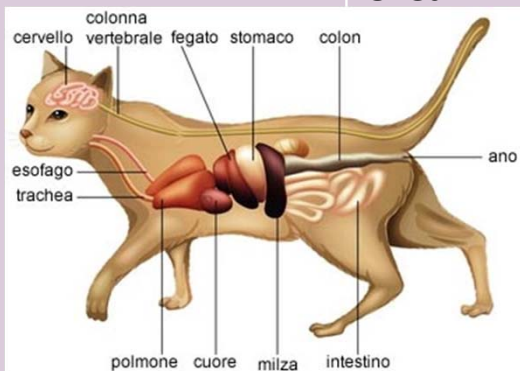
## Markers di tipo BIOCHIMICO utilizzati per la diagnosi clinica

IONI, SALI, MINERALI	PICCOLE MOLECOLE ORGANICHE	GRANDI MACROMOLECOLE BIOLOGICHE: PROTEINE
<p>Sodio Potassio Calcio Cloruro Magnesio Fosforo Piombo Ferro</p>	<p><b>METABOLITI</b></p> <p>Colesterolo Urea Acido Lattico Bilirubina Creatinina Trigliceridi <b>Glucosio</b></p>	<p><b>TRASPORTO</b></p> <p>Albumina Trasferrina Ferritina</p> <p><b>ENZIMI</b></p> <p>Lipasi Amilasi Trasferasi (Aspartato aminotrasferasi (AST), Alanina Aminotrasferasi (ALT)) Fosfatasi alcalina Lattato deidrogenasi Creatina chinasi</p>
<p><b>STRUCTURE OF CYCLIC GLUCOSE</b></p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="width: 30%;"> <p><b>C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><span style="color: blue;">●</span> Carbon</li> <li><span style="color: red;">●</span> Hydrogen</li> <li><span style="color: yellow;">●</span> Oxygen</li> </ul> </div> <div style="width: 65%; text-align: center;">   </div> <div style="width: 30%; text-align: right;"> <p><b>BYJU'S</b> The Learning App</p> </div> </div>		
<p><b>LIPOPROTEINE (LDL, HDL)</b></p> <p><b>MARKER SPECIFICI</b></p> <p>Immunoglobuline <b>HbA1c (Hb glicata) o fruttosamine glicate</b></p>		

## 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
<p>Sodio Potassio Cloro Diossido di carbonio</p>	<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>	<p>Sodio Cloruro Potassio CO<sub>2</sub> <b>Glucosio</b> Creatinina Urea</p>	<p>Colesterolo totale Trigliceridi LDL HDL</p>



questa provoca.

## Diabete mellito nel cane: la diagnosi

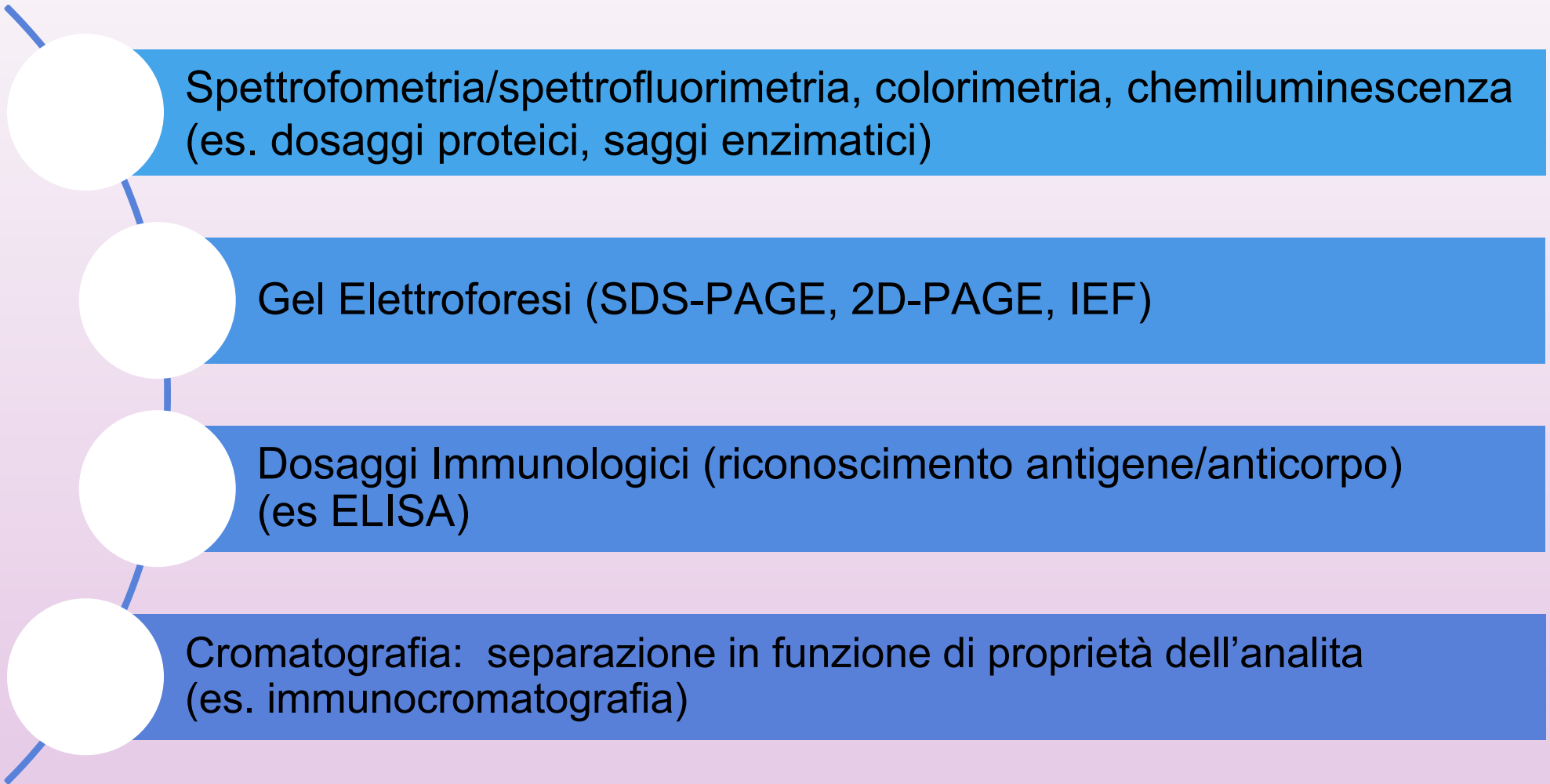
Per formulare una diagnosi di diabete è necessario effettuare, oltre alla solita osservazione dei sintomi e storia del cane, anche una serie di accertamenti ed **esami di laboratorio** che ne verifichino l'esattezza.

Inoltre è fondamentale effettuare **ecografie**, per scongiurare la presenza di malattie scatenanti (tumori, Cushing, pancreatiti, infezioni batteriche, neoplasie e altro).

La prima valutazione da fare è comunque un **esame del sangue** che metta in luce:

- **l'aumento della glicemia** che dovrà essere persistente anche a digiuno (valore dello zucchero nel sangue).
- Il valore delle **fruttosamine**: queste sono molecole che si formano ed aumentano quando la glicemia è sempre troppo alta. Il loro aumento quindi indica la concentrazione della glicemia media nelle ultime 2-3 settimane. Sarà importante poi nella valutazione dei progressi terapeutici.
- **Profilo biochimico ed emocromocitometrico**: tutti i valori che danno indicazione dello stato di salute generale del soggetto che potrebbero risultare normali se il cane non ha ancora subito gravi danni.  
Si potrebbe rilevare invece un aumento del **colesterolo**, dovuto all'eccessivo consumo di grassi che quindi passano nel circolo sanguigno (come abbiamo visto più sopra).

## Principali METODI DI RILEVAZIONE DEI Markers di tipo biochimico



Spettrofometria/spettrofluorimetria, colorimetria, chemiluminescenza  
(es. dosaggi proteici, saggi enzimatici)

Gel Elettroforesi (SDS-PAGE, 2D-PAGE, IEF)

Dosaggi Immunologici (riconoscimento antigene/anticorpo)  
(es ELISA)

Cromatografia: separazione in funzione di proprietà dell'analita  
(es. immunocromatografia)

# I FLUIDI SONO LE FONTI PRINCIPALI DEGLI ANALITI DI TIPO BIOCHIMICO

## FLUIDI CONTENENTI ANALITI BIOCHIMICI

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

Urine

Liquido amniotico

Saliva

Liquido sinoviale

....

*Tip.*

*Per diagnosticare un cane diabetico il controllo ematico deve essere valutato in tempi brevi: lo zucchero viene consumato dai globuli rossi e non lo si rileva, già dopo un'ora dal prelievo a meno che non si separi il plasma dal siero.*

*Quindi la struttura presso cui ti affidi deve avere l'attrezzatura adatta a fare esami di laboratorio, in sede.*

# COMPOSIZIONE DEL SANGUE

## SANGUE INTERO

### SIERO

Amino acids

Nutrients

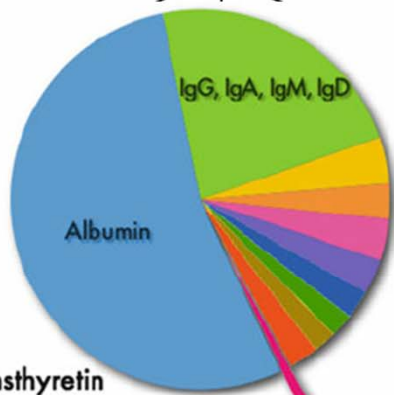
Proteins

Gases

Nitrogenous waste

Electrolytes

Glucosio,  
Colesterolo  
trigliceridi



Low-abundant 1%

### Elementi cellulari

Piastrine

Erythrocytes

Leukocytes

Granulocytes

Agranulocytes

Neutrophils

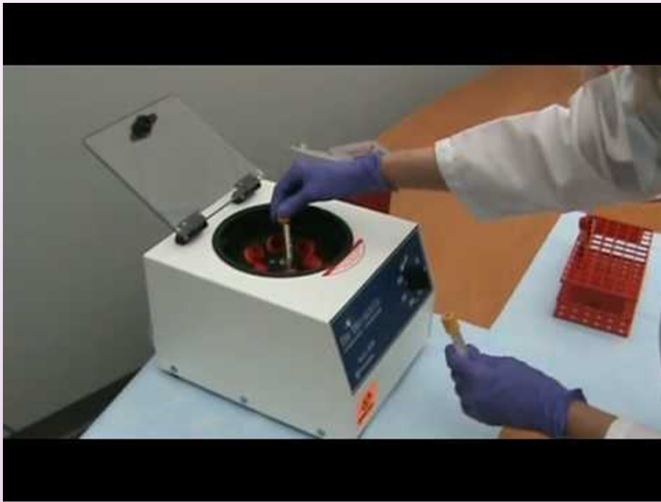
Basophils

Esinophils

Lymphocytes

Monocytes

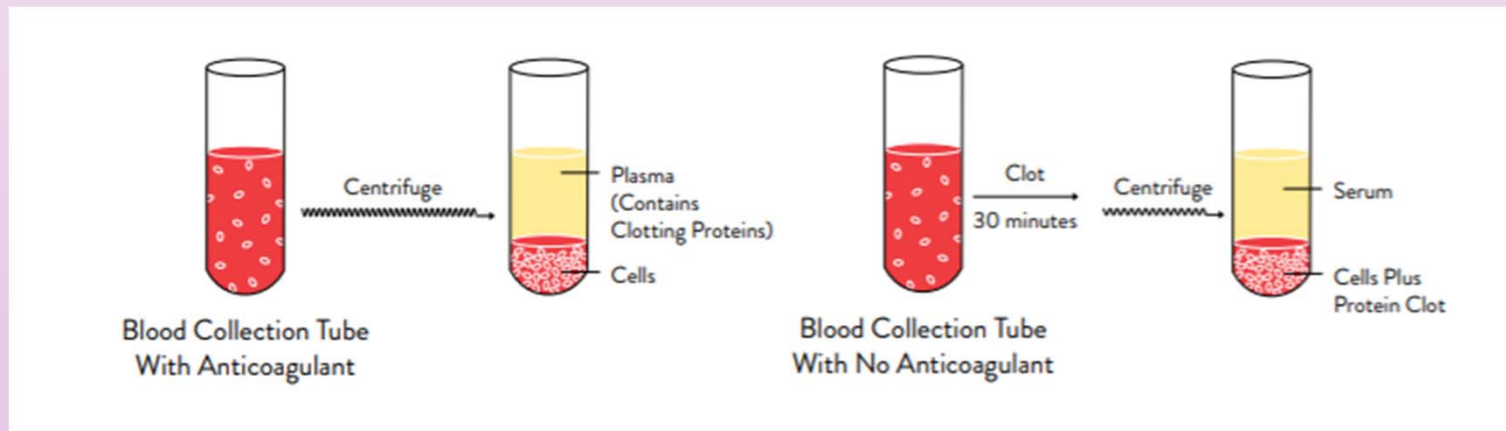
# Protocollo di Separazione di plasma/ siero: CENTRIFUGAZIONE



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 temperatura 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.





# 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, perdita di peso, disidratazione (Figura 1). La prevalenza del DM è in costante aumento in molte razze di cani, in particolare nei cani di razza Boxer, Golden Retriever, Labrador Retriever e Weimaraner.<sup>2,3</sup> Lo stretto controllo glicemico è fondamentale per prevenire complicazioni a lungo termine<sup>4,5</sup>, nel cane non è stato dimostrato un eguale vantaggio nel mantenere la glicemia entro di intervalli definiti.<sup>6,7</sup>

Francesca Del Baldo\*, Med Vet

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

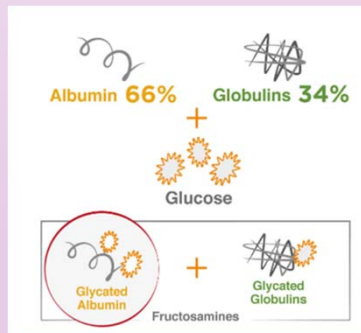
### Principalmente ALBUMINA

#### FRUTTOSAMINE SIERICHE

Le fruttosamine sieriche sono proteine gliccate 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

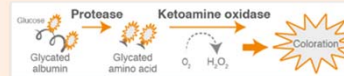
**ALBUMINA GLICATA:**  
Saggio enzimatico colorimetrico misura sia l'albumina glicata che l'albumina totale in 2 reazioni separate



#### Elimination of glycated amino acid



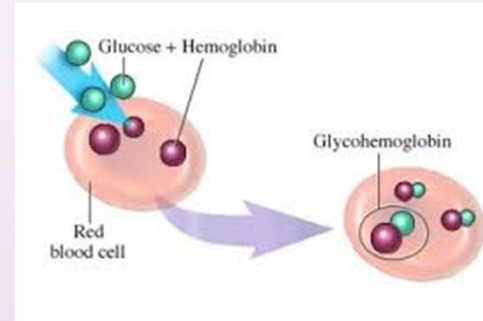
#### Determination of glycated albumin



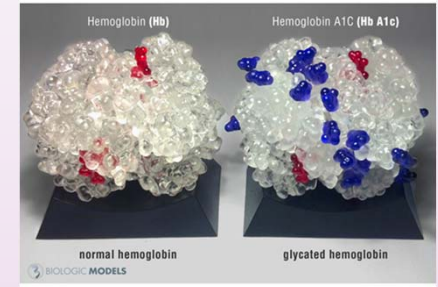
#### Determination of albumin



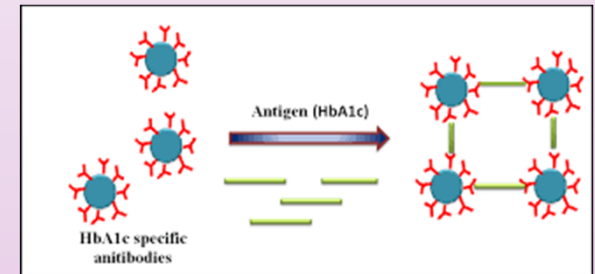
- UMANO Hb glicata (HbA1c)**



N-glicosilazione



### Test immunologici

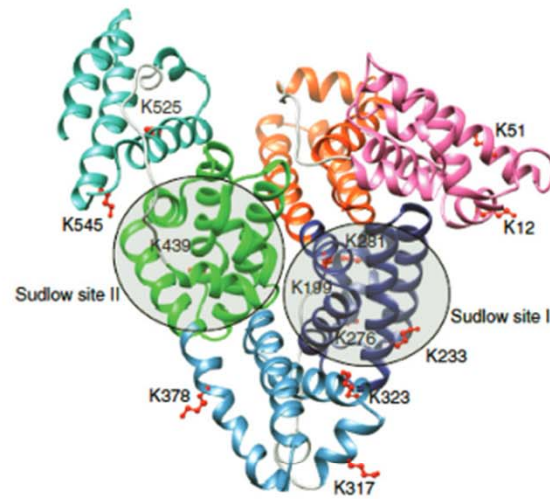


**GOLD STANDARD:**  
Cromatografia a scambio ionico (Hb glicata e non glicata hanno carica superficiale differente)

[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/)

## Evaluation of glycated albumin (GA) and GA/HbA1c ratio for diagnosis of diabetes and glycemic control: A comprehensive review

Sara Yazdanpanah<sup>a</sup>, Mohammad Rabiee<sup>a</sup>, Mohammadreza Tahiri<sup>a,b,c</sup>, Mojgan Abdolrahim<sup>a</sup>, Asadollah Rajab<sup>d</sup>, Hossein E. Jazayeri<sup>b</sup> and Lobat Tayebi<sup>b</sup>



**Figure 2.** The crystal structure of albumin. The locations of the main drug binding sites in this protein are shown [13].

mass hormones, fatty acids, and drugs (e.g. Sudlow sites I and II are good places to connect with drugs) [13].

The glycation process has many effects on the structure of albumin that can alter its biological function [31]. The process of forming GA is divided into two main stages:

**Stage I:** A reducing sugar, such as glucose, reacts with a primary amine group of a protein to form a reversible Schiff base. An Amadori product, which is more stable than a Schiff base, can subsequently be slowly formed.

**Stage II:** Amadori products can undergo a series of reactions (oxidation, dehydration, and cross-linking) to form an intermediate compound (i.e.  $\alpha$ -oxoaldehydes such as glyoxal). These intermediate compounds react, to a greater extent than a reducing sugar, with lysine and arginine to create AGEs [13].

Diabetes clinical care and assessment of its pathophysiology necessitates the measurement of HbA1c and circulating concentration of AGEs. However, evidence suggests that glucose levels and the associated diabetic complications can vary markedly within each individual [32].

GA has been reported as a powerful indicator of glycemic control as the lifespan of GA (<1 month) is shorter than the current gold standard of HbA1c [33] and, as such, GA levels better represent variations in blood glucose concentrations over the span of a month. Thus, GA provides supplementary and valuable information for glycemic control in comparison to measured HbA1c levels.

# 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 Bilirubin	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.

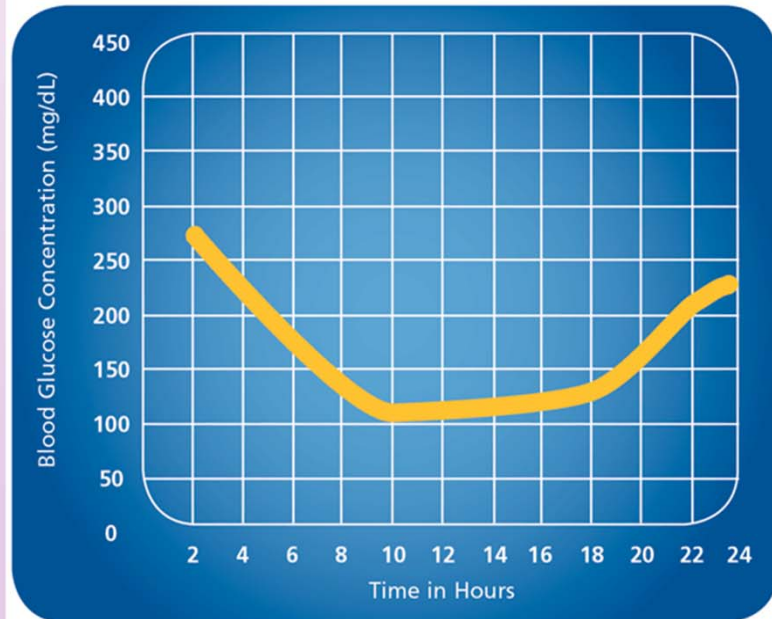


Articoli scientifici e protocolli online:  
Le unità di misura della  
concentrazione





## 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

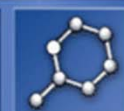
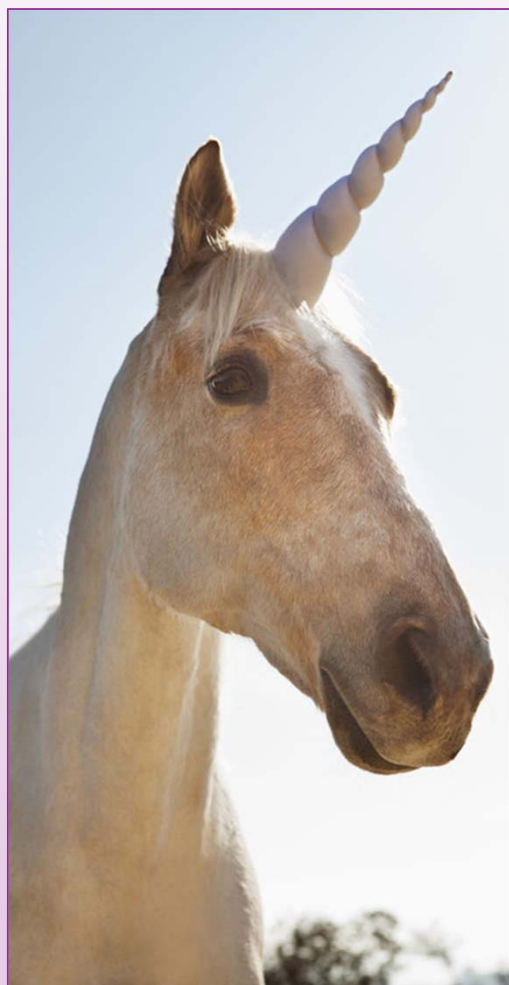


[http://www.vetsulin.com/vet/Monitoring\\_About.aspx](http://www.vetsulin.com/vet/Monitoring_About.aspx)

## 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.

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

*Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine*

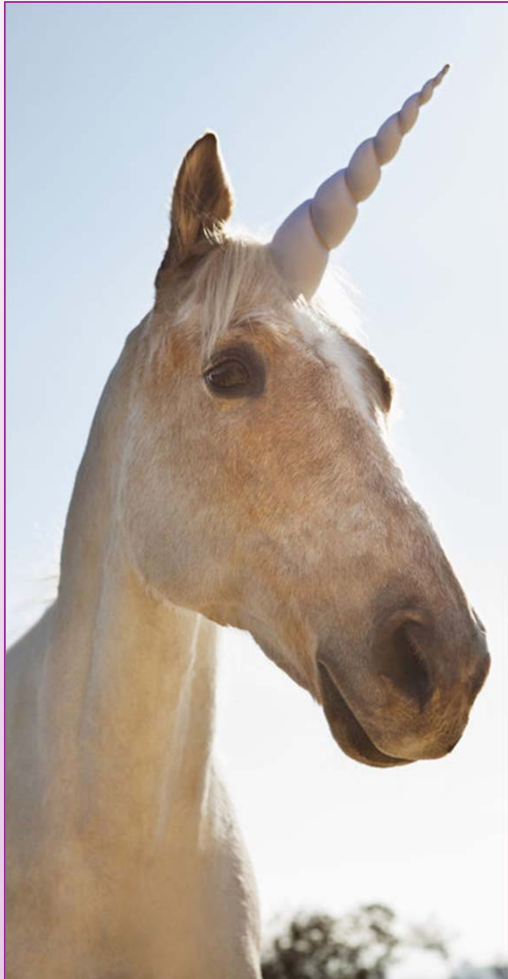
PMCID: PMC3440056

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

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

[Philip J. Johnson](#), B.V.Sc., M.S., DiplACVIM-LAIM, DiplECEIM, 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>

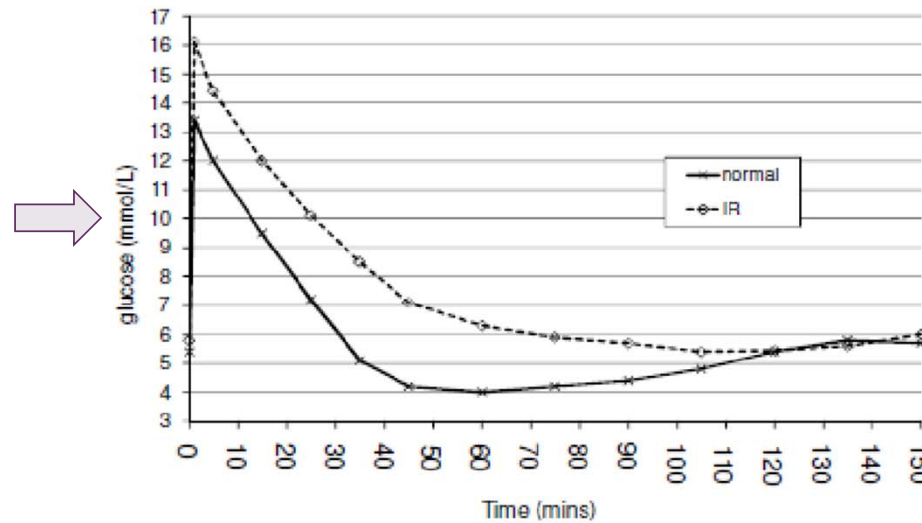


Figure 1. Examples of curves obtained from a normal horse and a horse with insulin resistance using the combined glucose insulin tolerance test



J Vet Intern Med. 2016 Sep-Oct; 30(5): 1726–1731.  
Published online 2016 Aug 2. doi: 10.1111/jvim.14529

PMCID: PMC5032872

## 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>1,2</sup> S.D. Taylor,<sup>1</sup> A.W. Bianco,<sup>1</sup> and J.E. Sojka-Kritchevsky<sup>2,1</sup>

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶

Go to:

### Abstract

#### 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.

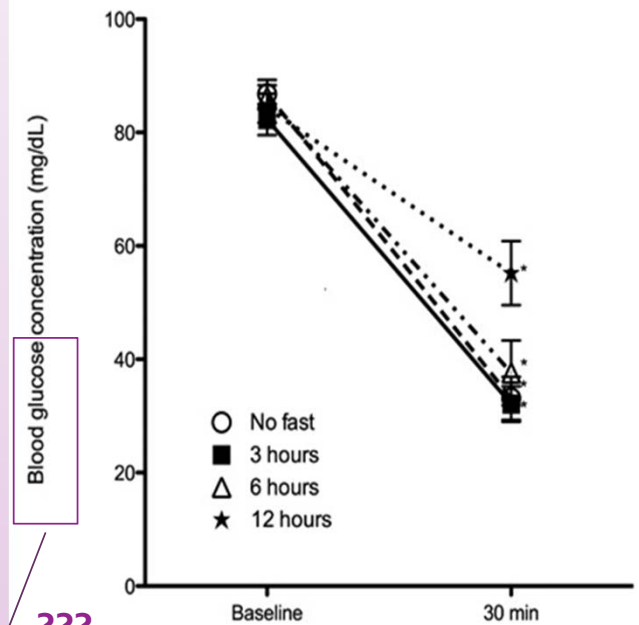
#### Procedures

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).