

Lettre à la rédaction : Dosage de l'éthylène glycol par une méthode enzymatique

Letter to the editor : A rapid enzymatic assay for ethylene glycol

Elodie SAUSSEREAU, Christian LACROIX, Jean-Pierre GOULLÉ

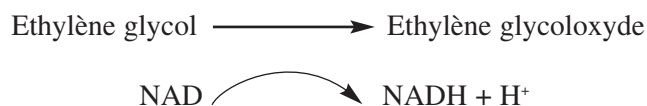
Laboratoire de Pharmacocinétique et de Toxicologie Cliniques Groupe Hospitalier du Havre
BP 24 – 76083 LE HAVRE CEDEX

(Reçu le 10 avril 2006 ; accepté après modifications le 13 juillet 2006)

Le diagnostic d'intoxication aiguë par l'éthylène glycol doit être systématiquement évoqué devant un syndrome ébrioux, un coma ou des convulsions sans étiologie évidente, lorsque le bilan biologique révèle une acidose métabolique avec une augmentation des indosés anioniques, les lactates n'expliquant pas le trou anionique. Les intoxications graves peuvent se compliquer d'insuffisance rénale aiguë, d'incapacité cardiaque et de défaillance multiviscérale. Ces complications sont liées à la précipitation de cristaux d'oxalate de calcium, terme ultime du métabolisme de l'éthylène glycol dans les tissus. Le traitement de cette intoxication consiste à inhiber le métabolisme de l'éthylène glycol par le 4-méthylpyrazole ou fomépipazole, inhibiteur compétitif de l'alcool déshydrogénase ; ce traitement antidotique est parfois associé à l'hémodialyse (1-5). Le laboratoire peut contribuer à une meilleure prise en charge de telles intoxications par une détermination rapide et fiable de l'éthylène glycol dans le sang mais également de l'acide glycolique [6]. Pour l'éthylène glycol, la chromatographie en phase gazeuse, largement décrite (7-10), ainsi que la chromatographie liquide (11, 12) sont des techniques qui restent difficiles à mettre en œuvre dans le cadre de l'urgence. Une méthode de dosage enzyma-

tique décrite par Standefer (13), dont le principe a été étudié initialement par Hansson (14), a été adaptée sur l'analyseur Cobas Mira (Roche) (15). Cette méthode fait appel à l'oxydation quantitative de l'éthylène glycol par la glycérol déshydrogénase, en présence de NAD suivant le schéma réactionnel suivant :

Glycérol déshydrogénase



Initialement cette méthode a été décrite et adaptée avec la glycérol déshydrogénase produite par *Enterobacter aerogenes* (Boehringer), la glycérol déshydrogénase produite par *Aspergillus niger* ne présentant pas les critères de spécificité suffisants pour être utilisée (15, 16). La société Boehringer ne commercialisant plus cette enzyme, nous avons adapté la méthode avec la glycérol déshydrogénase produite par *Cellulomonas sp* (Sigma) à la demande de nombreux utilisateurs. Contrairement à l'enzyme extraite d'*Enterobacter*, celle issue de

Cellulomonas convertit le propylène glycol sans interférence significative de l'éthylène glycol ou du glycérol dans des conditions opératoires bien choisies (17). Lorsque l'échantillon contient du propylène glycol ou du glycérol, un phénomène d'inhibition affectant les résultats d'éthylène glycol peut-être observé (17). Ce problème peut-être corrigé par l'addition de glycérokinase et par l'adjonction d'une étape de recirculation du NADH (17).

Les réactifs

- Solution de glycérol déshydrogénase de *Cellulomonas* sp à 250 unités (Sigma, réf. G 3512) obtenue après reconstitution avec 10 mL de sulfate d'ammonium à 300 mmol/L (pH = 10). La conservation se fait à + 4°C pendant 2 mois.

- Solution de nicotine amide dinucléotide (NAD) à 40 mmol/L (Boehringer, réf. 127973) : 0,52g dans 20 mL de sulfate d'ammonium à 300 mmol/L. La solution est stable un mois à + 4°C. Il est nécessaire d'ajuster extemporanément le pH du volume nécessaire de cette solution de NAD à 10 pour la réalisation du dosage.

- Ethylène glycol (Sigma, réf. E 9129). La gamme étalon est préparée dans un sérum exempt d'éthylène glycol (Sérum Technicon Miles, Bayer, réf. T 031220 ; AMM D86920), surchargé en éthylène glycol (concentrations finales : 0-2,2-4,5-9,0-18,0-36,0 mmol/L), puis congelé par fractions de 0,2mL.

La méthode

- Le réactif déclenchant est obtenu en mélangeant 0,85 mL de la solution de glycérol déshydrogénase et 1,2 mL de la solution de NAD. Les quantités sont doublées en cas de calibration.

- Le recalage de la calibration est réalisé à partir d'un point à 18,0 mmol/L.

- Le dosage est effectué sur du sérum après déprotéinisation, volume à volume, par l'acide trichloracétique (ATCA, réf. Merck 811) à 5%. Cette déprotéinisation permet d'éviter les interférences des prélèvements ictériques, lactescents et hémolysés.

- Les conditions de programmation sont les suivantes : l'échantillon (3 µL) est pré-dilué avec 40 µL d'eau. La mesure est effectuée à 340 nm après ajout du réactif enzymatique. Les mesures sont réalisées entre les cycles 4 (100 s) et 18 (450 s).

- Les résultats sont exprimés en mmol/L.

- Dans un cadre médico-légal, toute analyse positive

doit être confirmée par chromatographie en phase gazeuse.

Les interférences

Un mélange de sérums exempts d'éthylène glycol est additionné des molécules suivantes à la concentration de 100 mmol/L.

- Absence d'interférence : acétone, diéthylène glycol, éthanol, 2-butoxy-éthanol, glycérol, lactate, méthanol, 1-2 propanediol, 1-3 propanediol, propanol.

- Interférence significative : 2,3-butanediol.

L'interférence du propylène glycol en présence d'éthylène glycol a été étudiée avec le sérum d'un patient dont la concentration en propylène glycol, déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (18), était de 191 mg/L (2,5 mmol/L). L'analyse de ce sérum a révélé l'absence d'éthylène glycol par chromatographie en phase gazeuse ainsi qu'avec la technique enzymatique décrite. Nous avons réalisé le dosage de l'éthylène glycol après une surcharge de cet échantillon avec 9 mmol/L d'éthylène glycol ; la concentration obtenue avec la technique enzymatique présentée était de 8,7 mmol/L.

Tableau I : Validation de la méthode.

Limite de détection	0,21 mmol/L soit 13 mg/L
Limite de quantification	0,45 mmol/L soit 28 mg/L
Répétabilité	CV 0,5 à 7 %
Reproductibilité	CV 2,2 à 4,2 %

Références

1. Baud J.F. Conduites à tenir devant les intoxications aiguës les plus fréquentes. *Encycl. Méd. Chir., Urgences*. 1991 ; 24115, A⁶⁰, 1-27.
2. Jacobsen D., McMartin K.E. Antidotes for methanol and ethylene glycol poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1997 ; 35 : 127-43.
3. Brent J., Mc Martin K., Phillips S., Burkhart K.K., Donovan J.W., Wells M., Kulig K. Fomepizole for the treatment of ethylene glycol poisoning. *Methylpyrazole for Toxic Alcohols study group. N. Engl. J. Med.* 1999 ; 340 : 832-8.
4. Mégarbane B., Borron S.W., Bismuth C., Baud J.F. Efficacité et tolérance du 4-méthylpyrazole dans les intoxications à l'éthylène glycol. *Réan. Urg.* 1999 ; 8 : 180 (résumé).
5. Borron S.W., Mégarbane B., Baud J.F. Fomepizole

in the treatment of uncomplicated ethylene glycol poisoning. *Lancet*. 1999 ; 354 : 831.

6. Malandain H., Cano Y. Des méthodes enzymatiques simples, utilisables en garde, pour doser le méthanol, l'éthylène glycol et l'acide glycolique. *Toxicorama*. 1995 (vol.VII) 4 : 31-7
7. Porter W.H., Auansakul A. Gas chromatographic determination of ethylene glycol in serum. *Clin. Chem*. 1982 ; 28 : 75-8.
8. Jonsson J.A., Eklund A., Molin L. Determination of ethylene glycol in post-mortem blood by capillary gas chromatography. *J. Anal. Toxicol*. 1989 ; 13 : 25-6.
9. Aarstad K., Dale O., Aakervik O., Øvrebøs S., Zahlsten K. A rapid gas chromatographic method for determination of ethylene glycol in serum and urine. *J. Anal. Toxicol*. 1993 ; 17 : 218-21.
10. Jones A.W., Nilsson L., Gladh A., Karlsson K., Beck-Friis J. 2,3 butanediol in plasma from alcoholic mistakenly identified as ethylene glycol by gas-chromatographic analysis. *Clin. Chem*. 1991 ; 37 : 1453-5.
11. Gupta R.N., Eng F., Gupta M.L. Liquid-chromatographic determination of ethylene glycol in plasma. *Clin. Chem*. 1982 ; (1) : 32-3.
12. Vollmer P.A., Harty D.C., Erickson N.B., Balhon A.C., Dean R.A. Serum ethylene glycol by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl*. 1996 ; 685 (2) : 370-4.
13. Standefer J., Blackwell W. Enzymatic method for measuring ethylene glycol with a centrifugal analyzer. *Clin. Chem*. 1991 ; 37 : 1734-6.
14. Hansson P. Enzymatic assay for ethylene glycol applied to emergency situations. *Clin. Chem*. 1990 ; 189 : 243-4.
15. Goullé J.P., Allion M.J., Anagnostides J.G. Ethylène Glycol : intérêt d'une méthode enzymatique en toxicologie d'urgence. *Toxicorama*. 1995 ; Vol. VII (2) : 15-20.
16. Mahly M., Lardet G., Vallon J.J. Automated Cobas Mira kinetic enzymatic assay for ethylene glycol applied to emergency situations. *J. Anal. Toxicol*. 1994 ; 18 (5) : 269-71.
17. Malandain H., Cano Y. Place des techniques enzymatiques dans le diagnostic et le suivi des intoxications par un alcool ou un glycol. *Alcools et glycols. Ann. Toxicol. Anal*. 1999 (suppl.) : 36-53.
18. Gembus V., Goullé J.P., Lacroix C. Determination of glycols in biological specimens by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Anal. Toxicol*. 2002 ; 26 (5) : 280-5.