

Effet de l'Azide de sodium sur la dégradation de la progestérone dans les échantillons de sang total chez les bovins

Ph. DELAHAUT * J.F. BECKERS ** et F. ECTORS **

* *Laboratoire d'Endocrinologie — Rue du Carmel 1, 5406 Marloie.*

** *Chaire d'Obstétrique et des troubles de la reproduction
Faculté de Médecine Vétérinaire, U.Lg.
Rue des Vétérinaires 45, 1070 Bruxelles.*

RESUME

Les auteurs ont mesuré la dégradation de la progestérone au cours du temps dans des échantillons de sang de bovins héparinés ou non, laissés à l'air libre. Le taux de progestérone est réduit de moitié après 4 à 6 heures et cette dégradation paraît liée à la présence des globules rouges. L'addition à chaque échantillon d'Azide de sodium à la concentration de 5 mg/ml assure une conservation de 90 % de la progestérone après 4 jours.

Le diagnostic précoce de gestation peut être établi chez l'animal en se basant sur le taux de progestérone présent dans le sang ou le lait 21 jours après la saillie supposée fécondante, soit exactement l'intervalle d'un cycle œstral après la fécondation.

Si l'animal est gestant, le taux de progestérone est élevé puisque le corps jaune est resté actif ; il est faible dans le cas contraire. Cette méthode permet d'éviter, en partie, la détection des chaleurs

qui est besogne fastidieuse et pénible. Le dosage est déjà appliqué sur les échantillons de lait, qui sont faciles à prélever et dans lesquels le taux de progestérone reste stable (2-3-4-5). Malheureusement, ce genre de prélèvement est impossible chez les vaches tarées et chez les génisses, si bien qu'il faut recourir à la prise de sang, dans lequel la progestérone se dégrade assez rapidement.

Le but de ce travail est de chiffrer l'importance de cette dégradation et d'essayer de la contrecarrer par addition d'Azide de sodium (NaN_3).

MATERIEL

Les échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes en polystyrène silicone (Stayne Products P15), l'Azide de sodium utilisé provient de la firme Merck (art. n° 6688). Le dosage de la progestérone est réalisé suivant la technique décrite par Beckers & col. (1) en utilisant un autre antisérum dont les réactions croisées sont les suivantes :

Deoxycorticostérone	2,3 %
11 Deoxy —	
17 OH Corticostérone	0,11 %
17 OH Corticostérone	0,09 %
Corticostérone	0,1 %
5 β Pregnan 3,20 dione	1,5 %
20 α Hydroxy Δ^4 Pregnan 3, one	1,2 %
Pregnénolone	0,7 %
17 α Hydroxyprogestérone	1,8 %
20 β Hydroxyprogestérone	1,1 %
Testostérone	0,076 %
Cortisol	} inf. à 0,006 %
17 β Oestradiol	
Cortisone	
Prednisolone	
Dexaméthasone	

METHODE

Dans un premier temps, nous avons étudié la dégradation de la progestérone dans le sang total, hépariné ou non, et conservé à la température du laboratoire.

La valeur de départ est constituée par un échantillon de sang hépariné et centrifugé endéans la minute du prélèvement. La dégradation a été testée par des dosages effectués après 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 20, 24 et 48 heures.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à inhiber cette dégradation par additon d'Azide de sodium. La concentration optimale de ce produit étant déterminée, nous nous sommes efforcés de quantifier la conservation de la progestérone en maintenant les échantillons à la température du laboratoire.

RESULTATS

En absence de tout agent conservateur, la progestérone se dégrade rapidement. Ce phénomène apparaît clairement dans le tableau 1.

En effet, après 4 à 6 heures de conservation à la température du laboratoire, le taux de progestérone de l'échantillon est pratiquement réduit de moitié. Cette dégradation paraît liée à la présence des globules rouges car elle est arrêtée par la centrifugation.

Malheureusement, en pratique, cette dernière n'est pas toujours réalisable extemporanément. Nous avons essayé de prélever l'échantillon de sang en présence d'agents conservateurs tel l'Azide de sodium dont la concentration optimale à utiliser paraît être de 5 mg/ml ainsi que le démontre la figure n° 1 et le tableau 2.

A cette concentration, l'Azide de sodium provoque une légère hémolyse qui ne gêne pas le dosage ultérieur.

L'utilisation d'une concentration plus élevée augmente l'hémolyse dans des proportions non négligeables.

Le sang a été prélevé dans un tube contenant de l'Azide de sodium suivant la concentration indiquée ci-dessus. Le dosage de la progestérone a été réalisé 48 heures après le prélèvement.

Ayant déterminé la dose optimale d'Azide de sodium à utiliser, nous avons testé la concentration de la progestérone dans différents échantillons de sang ainsi traités. Le dosage a été effectué immédiatement après la prise de sang puis après 2 et 4 jours de conservation à la température du laboratoire.

TABLEAU 1. — Intervalles de temps (en heures) séparant la prise d'échantillon de la centrifugation. (sang hépariné ou non).

Temps en heures :		0	2	4	6	8	10	12	18	20	24	48	T A U X de P R O G E S T E R O N E ng/ml	
VACHE N° 1	sang normal	10,5	8,5	7,6	5,6	5	3,8	3,3		2,2	1,8	1		
	sang hépariné		8,8	5,95	5,5	5,4	4,6	3,6		2,3	2,3	2,2		
VACHE N° 2	sang normal	8,5	7,09	5,3	4,7	3,8	2,8	2,3	1,6		1,1	0,8		
	sang hépariné		6,2	6	5,2	3,9	3,6	3,2	2,7		1,9	1,8		
VACHE N° 3	sang hépariné	13,2	9,9	7,2	5,9	4,3	3,7	1,9			1,9	1,8		
VACHE N° 4	sang hépariné	1,82	1,27	1,42	1,06	1,2	1,2	1,07			0,84	0,71		

TABLEAU 2.

Echantillon contenant au départ 2,75 ng/ml de progestérone

Taux de progestérone après avoir ajouté	0 mgr/ml Azide de Na	0,77 ng/ml
	1 mgr/ml Azide de Na	1,8 ng/ml
	3 mgr/ml Azide de Na	2,31 ng/ml
	5 mgr/ml Azide de Na	2,6 ng/ml
	7 mgr/ml Azide de Na	2,75 ng/ml
	10 mgr/ml Azide de Na	2,79 ng/ml

Echantillon contenant au départ 5,3 ng/ml de progestérone

Taux de progestérone après avoir ajouté	0 mgr/ml Azide de Na	2,46 ng/ml
	1 mgr/ml Azide de Na	3,49 ng/ml
	3 mgr/ml Azide de Na	4,74 ng/ml
	5 mgr/ml Azide de Na	5,2 ng/ml
	7 mgr/ml Azide de Na	5,18 ng/ml
	10 mgr/ml Azide de Na	5,1 ng/ml

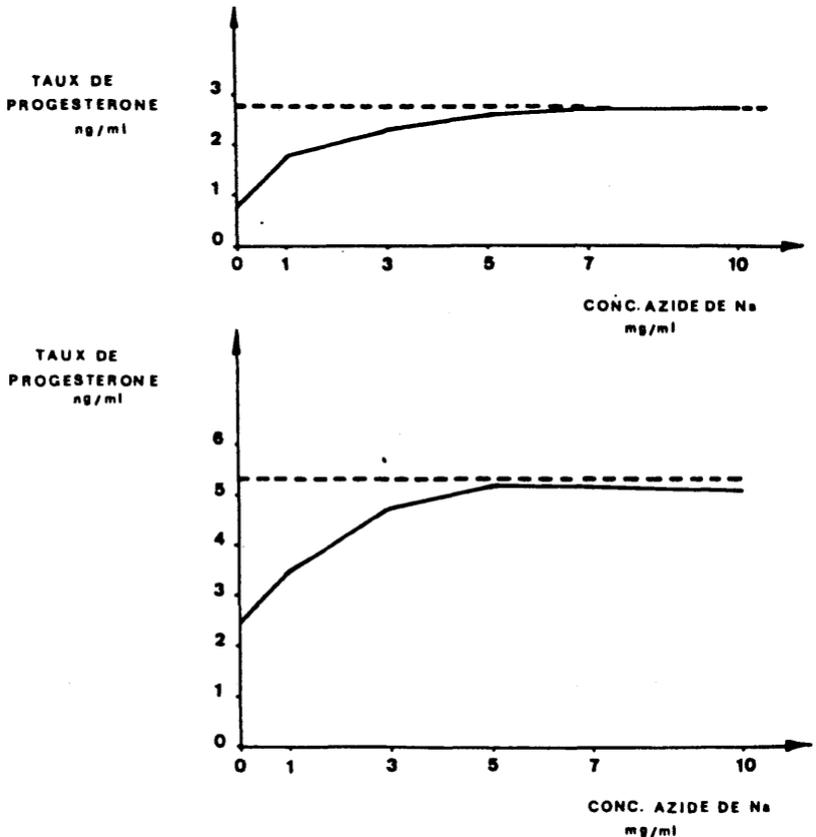


Fig. 1.

TABLEAU 3.

Vache n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dosage immédiat	11,8	11,6	7,9	7,2	6,1	3,8	3,4	2,5	1,5	1,1
Dosage après 2 jours à T° ordinaire	10,5	10,1	7,6	6,4	5,8	3,8	3,5	1,7	1,5	1,1
Dosage après 4 jours	10,8	10,7	6,9	7,5	6,1	4,2	3,2	1,7	1,5	1,3
% de progestérone conservée	91,5	92,2	87,9	104	100	110	94,1	68	100	114

T
A
U
X

de
P
R
O
G
E
S
T
E
R
O
N
E

ng/ml

Les résultats sont repris dans le tableau 3.

L'addition d'Azide de sodium assure la conservation d'environ 90 % de la progestérone après 4 jours de conservation à la température du laboratoire. Dans un des échantillons seulement (vache n° 8), la dégradation a été plus importante (32 %).

A titre indicatif, nous avons contrôlé si la dégradation de la progestérone se produisait également dans les échantillons de sang provenant d'autres espèces animales.

Dans le sérum de jument, la progestérone reste pratiquement stable durant 24 heures. Par contre, nous avons constaté une dégradation partielle dans les échantillons provenant de la brebis

(3,27 ng/ml au départ pour 2,34 ng/ml après 48 heures).

CONCLUSIONS

En présence des globules rouges la progestérone se dégrade très rapidement. Il faut donc absolument en tenir compte lors de l'analyse. La solution consiste à centrifuger immédiatement à 4 °C tous les prélèvements. Malheureusement, dans la pratique courante, cette méthode n'est pas toujours possible.

Nous préconisons de prélever l'échantillon dans un tube contenant de l'azide de sodium. Cet agent conservateur inhibe cette dégradation, dans une grande mesure et a permis l'introduction dans la pratique courante du dosage de la progestérone dans le sang comme méthode de diagnostic précoce de gestation.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) BECKERS J.F., BALLMAN P., ECTORS F., DERIVAUX J., Le dosage Radio-immunologique de la progestérone plasmatique chez la vache. *C.R. Acad. Sc.*, Paris, 1975, **280**, 335.
- (2) DELAHAUT Ph., BECKERS J.F., ECTORS F., Diagnostic précoce de gestation chez les différentes espèces animales. *Ann. Méd. Vét.*, 1978, **122**, 205.
- (3) HEAP R.B., HOLDSWORTH R.J., GADSBY J.E., LAING J.A., WALTERS D.E., Pregnancy diagnosis in the cow from Milk progesterone concentration. *Br. Vet. J.*, 1979, **132**, 445.
- (4) HOFFMAN B., GÜNZLER O., BURGER R., SCHMIDT W., Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle. Methodological aspects and present status of application in many. *Br. Vet. J.*, 1976, **132**, 469.
- (5) HOFFMAN B., HAMBURGER R., HAWICH W., Bestimmung von Progesteron direkt in Milchfett als verbessertes Verfahren zur Fertilitätskontrolle bei der Zuchttyg, 1977, **12**, 1.

SUMMARY

Effect of sodium azide on progesterone degradation in bovine blood samples.

Progesterone degradation was measured in bovine blood samples left on the bench in air at room temperature for a few days. Progesterone level is reduced by 50% after 4 to 6 h. and this degradation seems to be due to the presence of red blood cells. The addition of 5 mg/ml sodium azide to each sample of 5 mg/ml progesterone gives a 90% protection of progesterone after 4 days at room temperature.