

## Utilisation prévue

Pour la détermination quantitative des protéines totales dans les échantillons d'urine.

## Intérêt clinique

La présence de protéines dans les urines est un indicateur hautement sensible des troubles rénaux. Une élévation de la concentration en protéines peut se produire selon quatre mécanismes : augmentation de la perméabilité glomérulaire, réabsorption tubulaire défectueuse, élévation de la concentration plasmatique d'une protéine anormale à faible poids moléculaire ou sécrétion anormale de protéines dans le tractus urinaire<sup>1</sup>. L'albuminurie, c'est-à-dire l'élévation de la concentration en albumine dans les urines, est considérée comme un indicateur précoce des lésions rénales dans le diabète pouvant être réversible en cas de détection et de traitement précoce<sup>2</sup>.

## Historique de la méthode

Plusieurs méthodes ont été décrites permettant la détermination des concentrations en protéines des liquides biologiques. Ces méthodes sont fondées sur des procédures colorimétriques, turbidimétriques, électrophorétiques ou immunologiques<sup>3,4</sup>. Les méthodes de liaison de colorants se caractérisent par leur bonne précision et sensibilité. La méthode du bleu de Coomassie<sup>5</sup> est très sensible, mais les réactifs souillent la verrerie et les plastiques.

La présente méthode est fondée sur la procédure développée par Fujita<sup>6</sup> et Watanabe.<sup>7</sup> Il s'agit d'une méthode colorimétrique sensible de liaison de colorant utilisant le rouge de Pyrogallol. Cette méthode ne souille que rarement les cuvettes ou tubulures en plastique et peut être automatisée.

## Principe

Le rouge de pyrogallol est combiné à l'acide molybdique à bas pH. Lorsque ce complexe est combiné aux protéines, une coloration bleue-violette est obtenue. L'augmentation de l'absorbance à 600 nm est directement proportionnelle à la concentration en protéines de l'échantillon.

## Réactifs

1. MICROPROTEIN REAGENT (Réactif microprotéine) : Contient du tampon, rouge pyrogallol 0,067 mmol/L, molybdate de sodium (stabilisant) 0,153 mmol/L, surfactants et agent de conservation.
2. PROTEIN STANDARD SOLUTION (SOLUTION ÉTALON DE PROTÉINE) : Contient de l'albumine à 50 mg/dl dans une solution saline avec azoture de sodium à 0,05 % comme agent de conservation.

## Préparation des réactifs

Le réactif microprotéine et la solution étalon de protéine sont fournis prêts à l'emploi.

## Stockage des réactifs

Stocker le réactif microprotéine et la solution étalon de protéine sous réfrigération (entre 2 et 8 °C). Le réactif et l'étalon sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes.

## Précautions

1. Le réactif microprotéine est prévu pour diagnostic *in vitro* uniquement.
2. Les précautions habituelles de manipulation des réactifs de laboratoire doivent être observées.
3. L'étalon de protéine contient de l'azoture de sodium. Ne pas ingérer. Susceptible de réagir avec les canalisations en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques hautement explosifs. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter l'accumulation d'azoture.

## Détérioration du réactif ou de l'étalon

Le réactif et l'étalon doivent être limpides. Ne pas utiliser s'ils sont troubles. Si les résultats obtenus avec les contrôles ne sont pas conformes aux valeurs attendues, une détérioration du réactif et/ou de l'étalon peut s'être produite. Ne pas utiliser si l'absorbance du réactif à 600 nm est inférieure à 0,100.

## Prélèvement et stockage des échantillons

Nous vous recommandons de prélever les échantillons selon les consignes du document M29-T2 du NCCLS. Les échantillons contenant des particules visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant d'effectuer le test.

URINE : les tests sont effectués sur échantillons d'urines de 24 heures. Les urines ne doivent pas être collectées au cours de périodes d'exercice, car celui-ci change la concentration en albumine. Les dosages de protéines doivent être effectués sur des échantillons fraîchement collectés. Si le test ne peut pas être effectué sur des urines fraîchement collectées, les échantillons peuvent être stockés à -20 °C jusqu'à un an<sup>8</sup>.

REMARQUE : l'hémoglobine pouvant augmenter les concentrations en protéines totales, NE PAS UTILISER d'échantillons contenant du sang.

## Interférences

Il est recommandé de ne pas utiliser des échantillons d'urine auxquels des agents de conservation ont été ajoutés, car certains de ceux-ci (notamment HCl et acide benzoïque) peuvent interférer avec le test pour protéines, produisant des résultats bas erronés<sup>7</sup>. Il a été observé que la bilirubine jusqu'à une concentration de 20 mg/dl et l'acide ascorbique jusqu'à une concentration de 3,0 mg/dl n'interfèrent pas avec le test. (moins de 3,0 % d'écart pour les échantillons dans une plage de 130,0-132,0 mg/dl et moins de 17 % pour les échantillons dans une plage de 9,2-12,5 mg/dl). L'hémoglobine étant une protéine, elle augmentera les valeurs en protéines totales obtenues. Les variations de pH n'ont pas d'effet mesurable sur le dosage des protéines totales. Les effets des variations de densité n'ont pas été évalués. Certains médicaments et certaines drogues peuvent produire une interférence (voir Fujita<sup>9</sup>).

## Matériels fournis

1. Réactif microprotéine
2. Solution étalon de protéine

## Matériels nécessaires mais non fournis

1. Dispositifs de pipetage précis
2. Tubes à essais et portoirs
3. Bain-marie ou bloc chauffant (37 °C)
4. Minuterie
5. Spectrophotomètre permettant de faire des lectures à 600 nm

## Procédure (automatisée)

Des procédures d'applications sont disponibles pour divers appareils automatisés. Contacter le service technique.

## Procédure (manuelle)

1. Marquez des tubes « Blanc », « Étalon », « Contrôle », « Échantillon », etc.
2. Pipetez 1,0 ml de réactif microprotéine dans chaque tube.
3. Préchauffez les tubes à 37 °C.
4. Pipetez 0,02 ml (20 µl) d'eau désionisée, d'étalons, de contrôles et d'échantillons dans les tubes marqués correspondants.
5. Incubez tous les tubes à 37 °C pendant 5 minutes.
6. Après 5 minutes, réglez le zéro du spectrophotomètre à 600 nm à l'aide du tube BLANC.
7. Mesurez et notez l'absorbance (Abs) de l'étalon, des contrôles et des échantillons.
8. Pour déterminer la concentration en microprotéines des échantillons, reportez-vous à la section « Calcul ».

## Étalonnage

Utilisez une solution étalon aqueuse de protéine (traçable NIST SRM 927c).

## Contrôle de qualité

Des pratiques standard de contrôle de qualité doivent être appliquées à cette procédure. Pour évaluer les variations quotidiennes acceptables, il est judicieux d'utiliser des contrôles d'urine (à 2 concentrations) disponibles dans le commerce. Une performance adéquate est atteinte lorsque les valeurs obtenues pour l'analyte tombent dans la plage acceptable établie par le laboratoire.

# Trousse de réactifs Microprotéine

## Calculs

Les concentrations en protéines sont exprimées en mg/dl.

$$\text{Protéine (mg/dl)} = \frac{\text{Abs inconnu}}{\text{Abs étalon}} \times \text{Conc. étalon}$$

Où :

Abs inconnu = l'absorbance d'un échantillon inconnu

Abs étalon = l'absorbance de l'étalon

Conc. étalon = Concentration de l'étalon (50 mg/dl)

Par exemple :

Abs inconnu = 0,085

Abs étalon = 0,195

Conc. étalon = 50 mg/dl

$$\text{Protéine (mg/dl)} = \frac{0,085}{0,195} \times 50 = 21,8 \text{ mg/dl}$$

Pour déterminer la quantité de protéines dans les urines de 24 heures, mesurez le volume total d'urine (VT) en ml et mesurez la concentration des protéines (en mg/ml) dans l'urine. Utilisez la formule suivante pour calculer la quantité de protéines dans les urines de 24 heures :

$$\text{Protéine (mg/jour)} = \text{Protéine (mg/dl)} \times \frac{\text{VT}}{100}$$

Où : VT = volume total des urines de 24 heures, en ml

100 = facteur de conversion de ml/jour à dl/jour

## Unités S.I.

Pour convertir les résultats en unités S.I., multipliez la concentration en microprotéines (mg/dl) par 0,0100. Par exemple, concentration en microprotéines = 21,8 mg/dl x 0,0100 = 0,218 g/L.

## Valeurs attendues <sup>6,7</sup>

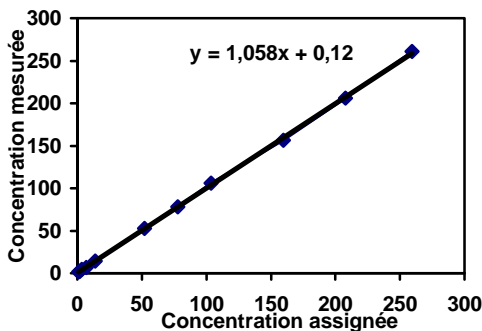
Quantité de protéines dans les urines de 24 heures 28–141 mg/jour  
Échantillon aléatoire d'urine Moins de 10 mg/dl

REMARQUE : Chaque laboratoire est tenu de confirmer la validité des plages de quantités indiquées pour la population desservie.

## Performances

- Gamme de concentrations du test : la procédure microprotéine présente une gamme de 2,0 à 250 mg/dl. Les échantillons dont le résultat est supérieur à 250 mg/dl doivent être dilués avec un volume égal de la solution saline isotonique et mesurés à nouveau. Multipliez le résultat par un facteur 2 pour tenir compte de la dilution.
- Un test de linéarité a été effectué à l'aide de onze échantillons de concentrations connues entre 1,23 et 259,43 mg/dl. Cette étude a été exécutée sur un analyseur Roche Hitachi 917. Le graphique des concentrations obtenues est présenté.

Graphique de linéarité

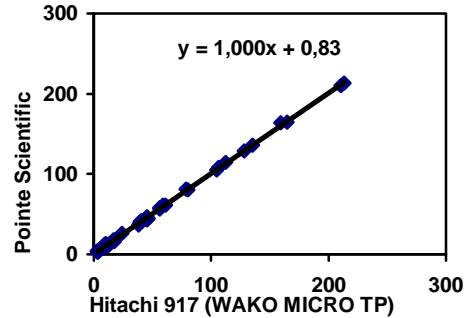


- Sensibilité : Pour un appareil ayant une résolution de 0,001 unités d'absorbance, la sensibilité de cette procédure est de 0,250 mg/dl. La limite de détection obtenue lors de la mesure bichromatique de l'absorbance à 600 / 700 nm était de 2,0 mg/dl (analyseur chimique Hitachi 917).

- Comparaison : des études comparant la présente méthode avec une méthode semblable (Wako Autokit Micro TP effectuée avec l'analyseur Hitachi 917) a donné un coefficient de corrélation de 0,9997 et une équation de régression de  $y = 1,000x + 0,83$ .

55 échantillons compris dans une plage de 2,5 à 213,3 mg/dl ont été utilisés dans cette étude. Le graphique des concentrations obtenues est présenté.

Graphique de corrélation



- Précision : cette étude a été exécutée sur un analyseur Roche Hitachi 917. La précision du test a été évaluée suivant une méthode modifiée du protocole EPT-T2 de NCCLS. Les données de précision à l'intérieur de la série (Intra-série) ont été obtenues en analysant trois échantillons en 20 réplicats au cours d'une seule journée. Les données de précision d'une série à l'autre (inter-série) ont été obtenues en analysant trois échantillons en cinq réplicats pendant une période de trois jours.

### Intra-série, urine (N=20)

Moyenne	É.T.	% C.V.
8,7	0,7	8,6
121,8	2,1	1,7
240,3	1,7	0,7

### Inter-série, urine (N=20)

Moyenne	É.T.	% C.V.
10,2	0,9	8,6
127,0	1,6	1,2
242,5	2,4	1,0

## References

- Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders, Philadelphia p. 608, 1986.
- Viberti, G.C., Pickup, J.C., Jarrett, R.J., Keon, H., N Engl J Med. 300:638-41 1979.
- Grant, G.H., Kachmer, J.F.: Fundamentals of Clinical Chemistry. N.W. Tietz, Editor, W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 358-374, 1976.
- Cannon, D.C., Olitzky, I., Inkpen, J.A.: Clinical Chemistry – Principles and Technics, 2nd Ed., R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W., Winkelman, Editors, Harper & Row, New York, pp. 442-431, 1974.
- Pesce, M.A., Strande, C.S., Clin Chem 19:1265-1267, 1973.
- Fujita, Y., Mori, I., Kitano, S. Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (VI) complex and protein. Bunseki Kagaku 32: E379-E386, 1983.
- Watanabe, N., Kamel, S., Ohkubo, A., Yamakna, M., Clin Chem 32:1551-1554, 1986.
- Tietz, N.W.; Clinical Guide to Laboratory Tests, W.B. Saunders, Phil. P.470, 1990.

**REF** P7582



**IVD**



Fabriqué par  
Pointe Scientifique, Inc.

Fabriqué par Pointe Scientifique, Inc  
5449 Research Drive, Canton,  
MI 48188, États-Unis



Représentant européen agréé :  
Obelis s.a.  
Boulevard Général Wahis 53  
1030 Bruxelles, BELGIQUE  
Tel: (32) 2.732.59.54 Fax:(32) 2.732.60.03  
E-mail: mail@obelis.net