



BIOLABO
www.biolabo.fr

FABRICANT :
BIOLABO SAS,
Les Hautes Rives
02160, Maizy, France

PROTEINES U.S.

Méthode Rouge de Pyrogallol

Réactif pour le dosage quantitatif des protéines totales dans les urines et le L.C.R. humains.

REF 97016 R1 2 x 113 mL R2 2 x 12 mL R3 1 x 10 mL

CODE CNQ : AX

SUPPORT TECHNIQUE ET COMMANDES

Tel : (33) 03 23 25 15 50

Fax : (33) 03 23 256 256



IVD USAGE IN VITRO

INTERET CLINIQUE (1)

La détermination des protéines totales dans les urines et le liquide céphalorachidien (LCR) est utilisée respectivement pour le diagnostic de maladies rénales ou du système nerveux central. Une élévation de la concentration des protéines urinaires peut être rencontrée lors d'un effort vigoureux, de fièvre ou d'hypothermie, de gammopathies monoclonales, néphrite, néphropathie diabétique ou infection des voies urinaires.

La détermination des protéines totales dans le LCR est une aide au diagnostic de méningites, encéphalites, poliomyélites, neurosyphilis, tumeurs du système nerveux central ou hémorragies cérébrales.

PRINCIPE (4) (7)

La méthode décrite est celle de Fujita modifiée par Watanabe et al. Le rouge de Pyrogallol combiné au molybdate de sodium forme un complexe coloré rouge qui absorbe à 460 nm. En milieu acide, la fixation de ce complexe sur les groupements aminés des protéines déplace le pic d'absorption à 600 nm. L'intensité de la coloration bleue mesurée à 600 nm (578-612) est proportionnelle à la concentration en protéines dans le spécimen.

REACTIFS

flacon R1 **TAMPON** Concentration dans le test
Molybdate de sodium 0,04 mmol/L

flacon R2 **ROUGE DE PYROGALLOL**
Méthanol 10 %
Rouge de Pyrogallol 0,06 mmol/L

T+, F: Très toxique, Inflammable.
R11 Facilement inflammable
R39 Danger d'effets irréversibles très graves
R23/24/25 Toxique par inhalation, contact avec la peau et ingestion
S7 Conserver le récipient
S16 Conserver à l'écart de toute flamme
S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés
S45 En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (lui montrer l'étiquette du flacon)

flacon R3 **ETALON**
Albumine bovine 1,0 g/L

PRECAUTIONS

Les réactifs BIOLABO sont destinés à du personnel qualifié, pour un usage in vitro.

- Vérifier l'intégrité des réactifs avant leur utilisation.
- Utiliser des équipements de protection (blouse, gants, lunettes).
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- En cas de contact avec la peau ou les yeux, rincer abondamment à l'eau et consulter un médecin.
- La fiche de données de sécurité peut être obtenue sur simple demande.
- Elimination des déchets : respecter la législation en vigueur.

Par mesure de sécurité, traiter tout spécimen comme potentiellement infectieux. Respecter la législation en vigueur.



PREPARATION DES REACTIFS

Réactif de travail : Verser le contenu du flacon R2 dans le flacon R1. Mélanger par retournement pour homogénéiser la solution.

STABILITE ET CONSERVATION

A réception, stocker l'étalon (flacon R3) à 2-8°C.
Stocker les réactifs (flacon R1 et R2) à 18-25°C et à l'abri de la lumière.

- Etalon (flacon R3) : Transvaser la quantité nécessaire, bien reboucher et stocker à 2-8°C.
- Dans le flacon d'origine bien bouché, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret, s'ils sont utilisés et conservés dans les conditions préconisées.
- Le réactif de travail (flacon R1 + R2) est stable 1 an en l'absence de contamination.
- Ne pas utiliser le réactif de travail s'il est trouble ou si l'absorbance mesurée à 600 nm est > 0,600 ou < 0,050.
- Ne pas utiliser le réactif de travail après la date de péremption indiquée sur l'étiquette du coffret.

PRELEVEMENT ET PREPARATION DU SPECIMEN (2)

Urines (miction ou recueil fractionné).
Urines de 24 h : Urines fraîchement collectées, conservées à 2-8°C, sans conservateur, centrifugées 10 minutes à 3000 tr/min et dont le pH est ajusté à 7,0.

LCR : Fraîchement collecté, et centrifugé avant analyse.

Les spécimens ne doivent pas contenir de sang.

Stabilité dans les urines :

- plus d'un an à - 20°C.

Stabilité dans le LCR :

- jusqu'à 72 h à 2-8°C.
- 6 mois à - 20°C.
- indéfiniment à - 70°C.

INTERFERENCES (3) (5)

Hémoglobine : surestimation de 4 à 6 %.

Le Plasmion™ : interfère et donne des valeurs très surestimées.

Le rouge de pyrogallol reconnaît, en partie, les solutés de remplissage vasculaire à base de gélatine, conduisant à une interférence positive fréquente chez les patients en réanimation.

Le rouge de pyrogallol reconnaît difficilement les chaînes légères de gamma-globulines.

A ce jour, aucune interférence médicamenteuse n'a été décrite avec le rouge de Pyrogallol.

Young D.S. a publié une liste des substances interférant avec le dosage.

REACTIFS ET MATERIEL COMPLEMENTAIRES

1. Equipement de base du laboratoire d'analyses médicales.
1. Contrôles urinaires et/ou LCR normaux et pathologiques.

CALIBRATION

- Etalon du coffret (flacon R3) traçable sur SRM 927d
- Ou tout calibrant raccordé sur une méthode ou un matériau de référence.

La fréquence de calibration dépend des performances de l'analyseur et des conditions de conservation du réactif.

Il est recommandé de calibrer à nouveau dans les cas suivants :

1. Changement du lot de réactif.
2. Après opérations de maintenance sur l'analyseur.
3. Les valeurs de contrôle obtenues sortent des limites de confiance, même après utilisation d'un deuxième flacon de contrôle fraîchement reconstitué.

CONTRÔLE DE QUALITE

CODE CNQ : AX

- Utiliser Contrôle Urinaire Taux 1 et Taux 2 **REF** 95012.
- Ou tout autre contrôle titré avec cette méthode
- Programme externe de contrôle de la qualité.

Il est recommandé de contrôler dans les cas suivants :

- Au moins un contrôle par série.
- Au moins un contrôle par 24 heures.
- Changement de flacon de réactif.
- Après opérations de maintenance sur l'analyseur.

Lorsqu'une valeur de contrôle se trouve en dehors des limites de confiance, appliquer les actions correctives suivantes :

1. Répéter le test en utilisant le même contrôle.
2. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre flacon de contrôle et répéter le test.
3. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, utiliser un autre calibrant ou un calibrant fraîchement reconstitué et répéter le test.
4. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, calibrer à nouveau en utilisant un autre flacon de réactif et répéter le test.
5. Si la valeur obtenue reste en dehors des limites, contacter le service technique BIOLABO ou le revendeur local.

INTERVALLES DE REFERENCE (2)

Dans les urines (miction) < 0,14 g/L

Dans les urines de 24 h

au repos < 0,080 g/24 h

après un exercice physique intense < 0,250 g/24 h

Dans le LCR

g/L

Prématuré 0,15 - 1,3

Nouveau-né 0,40 - 1,2

< 1mois 0,20 - 0,80

> 1 mois 0,15 - 0,40

Il est recommandé au laboratoire de définir ses propres valeurs usuelles pour la population concernée.

PERFORMANCES

Selon Procédure n°1 :

Intra-série N = 20	Taux faible	Taux élevé	Inter-série N = 20	Taux faible	Taux élevé
Moyenne g/L	0,131	0,576	Moyenne g/L	0,20	0,66
S.D.g/L	0,0039	0,0081	S.D.g/L	0,01	0,021
C.V. %	2,98	1,41	C.V. %	5,00	3,18

Limite de détection : environ 0,05 g/L

Comparaison avec réactif du commerce : $y = 0,7581 x + 0,1045$

$r = 0,9777$

LIMITE DE LINEARITE (6)

Procédure n°1 (haute sensibilité) : Linéaire jusqu'à 1,5 g/L

Procédure n°2 (faible sensibilité) : Linéaire jusqu'à 6,0 g/L.

Au-delà, diluer le spécimen avec NaCl à 9 g/L et refaire le dosage en tenant compte du facteur de dilution dans le calcul du résultat. La limite de linéarité dépend du rapport de dilution spécimen/réactif.

MODE OPERATOIRE (TECHNIQUE MANUELLE)

Ramener les réactifs et spécimens à température ambiante.

Procédure n°1 :

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif de travail	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	20 µL		
Etalon		20 µL	
Spécimen (Remarque 2)			20 µL

Bien mélanger. Laisser reposer au moins 10 minutes à température ambiante.

Lire les absorbances à 600 nm (578 - 612) contre le blanc réactif.

Procédure n°2 :

Mesurer dans des tubes à essais bien identifiés :	Blanc	Etalon	Dosage
Réactif de travail	1 mL	1 mL	1 mL
Eau déminéralisée	5 µL		
Etalon		5 µL	
Spécimen (Remarque 2)			5 µL

Bien mélanger. Laisser reposer au moins 10 minutes à température ambiante.

Lire les absorbances à 600 nm (578 - 612) contre le blanc réactif..

Remarques :

- 1- Au-delà de 30 minutes d'incubation à température ambiante, les protéines en concentration élevée peuvent précipiter et fausser les résultats.
- 2- Spécimen : Urines ou LCR.
- 3- Des procédures spécifiques sont disponibles pour les analyseurs automatiques. Contacter le service technique BIOLABO.

CALCUL

Le résultat est déterminé d'après la formule suivante :

$$\text{Résultat} = \frac{\text{Abs (Dosage)}}{\text{Abs (Etalon)}} \times \text{concentration de l'Etalon}$$

REFERENCES

- (1) TIETZ N.W. *Text book of clinical chemistry*, 3rd Ed. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders (1999) p. 512-530.
- (2) *Clinical Guide to Laboratory Test*, 4th Ed., N.W. TIETZ (2006) p.916-919.
- (3) YOUNG D.S., *Effect of Drugs on Clinical laboratory Tests*, 4th Ed. (1995) p 3-498 à 3-500 et 3-506 à 3-511
- (4) Watanabe N. et al, *Clin. chem.* 32/8 (1986), 1551-1554.
- (5) Le Bricon T., *Ann. Biol. Clin.* (2001),59, p.701-715
- (6) Andries J. Bakker, Baukje Jellema, *Ann. Clin Biochem.*, 36 (1999), p.163-167
- (7) Fujita Y. et Al., *Color reaction between pyrogallol red molybdenum complex and Protein.* *Bunseki Kagaku*, 1983, 32, E379-E386
- (8) SRM: Standard Reference Material®