

EVALUATION DES PERFORMANCES ANALYTIQUES DU RÉACTIF BIURET.

ALLOUI AS^(1,2), AMOKRANE E⁽¹⁾, SETTAH A⁽¹⁾, ABADI N⁽¹⁾, BEN-LATRECHE C⁽¹⁾.

1) Laboratoire de Biochimie CHU Constantine.

2) Laboratoire MEDPREVAC.

RÉSUMÉ:

Le choix d'une technique et sa validation constitue une préoccupation majeure pour le biologiste dont le souci permanent est de garantir la fiabilité des résultats. Ce travail expérimental, est une évaluation des performances analytiques d'un réactif Biuret destiné au dosage manuel des protides totaux dans notre laboratoire. Nous avons utilisé une gamme de solutions croissantes d'albumine et des contrôles du commerce. Le Biuret éprouvé est proche de celui proposé par Gornall. Le protocole suivi est inspiré du protocole de Validation des Techniques Valtec. La limite haute de linéarité est à 100g/L et l'étalonnage montre une courbe linéaire. La limite de détection est à 1,28g/L et le seuil de quantification à 4,25g/L. Les coefficients de variation (CV) ou de reproductibilité sont inférieurs à ceux de la Société Française de Biologie Clinique (SFBC), de même pour la justesse et l'inexactitude dont les valeurs sont inférieures aux limites de la SFBC. Le réactif éprouvé présente d'excellentes performances analytiques en termes de détectabilité, de stabilité, de reproductibilité, de justesse et d'inexactitude sauf pour la limite de linéarité. Cette méthode est introduite dans notre laboratoire comme technique manuelle de dosage des protidémies aux concentrations basses et moyennes.

Mots clés: Biuret, Protides totaux, Validation, Performances analytiques, Dosage manuel.

ABSTRACT: ANALYTICAL EVALUATION OF THE REAGENT BIURET'S PERFORMANCES.

The overall determination of proteins' plasma concentration is an analysis of first intention. Only the variations of the most abundant proteins (albumin and immunoglobulins) have a significant effect on the total concentration. Currently, most labs use for the dosage of serum proteins (or plasma) a colorimetric technique based on the Biuret's color reaction according to the method developed by Gornall et al. in 1949. We conducted an experimental study in our lab in which we evaluated the analytical performance of Biuret reagent done manually for the determination of the total protein in accordance with the validation protocol recommended by the technical guidelines of VALTEC's SFBC. The experiment yielded positive results which allow us to argue that this reagent has excellent analytical performance in terms of detectability, the reaction stability, reproducibility, and accuracy and inaccuracy. We can also argue that a linearity limit of only 100g /L leads to the systematic implementation of dilutions at high concentrations. These technical characteristics have encouraged us to introduce this method in our lab's daily routine as a manual technique for the determination of the dosage total proteins at low and medium concentrations.

Key words: Biuret, Total protein, Validation, Analytical performance, Manual dosing.

INTRODUCTION

Le choix d'une technique et sa validation, a toujours constitué une préoccupation majeure pour le biologiste dont le souci permanent est de garantir la fiabilité des résultats, compte tenu des moyens mis à sa disposition [1,2].

Le respect des règles d'assurance qualité des laboratoires oblige à procéder à la validation des techniques en préalable à leur utilisation [1,2].

La détermination globale de la concentration plasmatique des protéines est une analyse de première intention. Seules les variations des protéines les plus abondantes (albumine, immunoglobulines) ont un effet significatif sur la concentration totale. Le dosage des protéines totales plasmatiques est utilisé pour apprécier les fonctions hépatique et rénale, le dysfonctionnement du système immunitaire et pour surveiller les maladies métaboliques et nutritionnelles [3]. Actuellement la majorité des laboratoires utilisent pour le dosage des protéines plasmatiques une technique colorimétrique reposant sur la réaction de coloration du biuret d'après la méthode développée par Gornall et al. en 1949 [4].

L'objectif de ce travail était l'étude des performances analytiques d'un réactif Biuret destiné au dosage manuel des protéines totales dans notre laboratoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

a. Spécimens biologiques

Nous avons eu recours à une gamme de 36 solutions d'albumine obtenue à partir d'une solution mère à 200g/L préparée à son tour à partir d'albumine bovine cristallisée (Fluka, lot n°Code S13448806) contre de l'eau distillée.

Ces solutions étaient de concentrations croissantes: 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12.5, 15, 17.5, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 145 et 150 g/L.

Nous avons utilisés des spécimens de contrôle du commerce, ExatrolR BIOLABO, à deux niveaux de concentration (niveaux 1 et 2), lots n° 061119E1 et 031115E1 respectivement.

b. Réactif et technique

Le réactif évalué est un réactif Biuret, prêt à l'emploi, d'un seul lot, proche de celui proposé par Gornall [4].

En milieu alcalin (hydroxyde de sodium) les liaisons peptidiques des protéines réagissent avec les ions cuivriques pour former le complexe du biuret caractéristique rose à violet, présentant un maximum d'absorbance à 540 nm. L'intensité de la coloration dépend du nombre de liaisons peptidiques impliquées.

Le protocole opératoire de la méthode éprouvée consiste en l'addition de 20µL de spécimen à 1mL de réactif, puis une incubation pendant dix minutes à température ambiante et enfin une lecture contre le blanc réactif.

c. Appareillage

Cette étude de performance a été réalisée sur un spectrophotomètre UV-Visible BIOLABO.

2. Méthodes

Le protocole suivi pour cette évaluation est inspiré du protocole de Validation des Techniques Valtec de la Société Française de Biologie Clinique SFBC [2,5].

Nous avons réalisé dans la période allant d'Avril à Mai 2013 au niveau du Laboratoire Central de Biochimie du CHU de Constantine une étude qui consiste en:

- Une évaluation du domaine de mesure qui comporte une étude

- de la linéarité et de l'étalonnage, de la limite de détection analytique, du seuil de quantification et de la sensibilité analytique.

- Une évaluation de la stabilité de la réaction.

- Une étude de la reproductibilité à partir de résultats obtenus sur les spécimens de contrôles pendant une période de 15 jours.

- Une appréciation de la justesse et de l'inexactitude par l'étude de solutions du contrôle interne de la qualité suffisamment caractérisées dans notre laboratoire.

3. Tests statistiques

L'exploitation statistique des résultats a été réalisée à l'aide du logiciel Statistica StatSoftR.

La droite de régression linéaire et le coefficient de corrélation r ont été utilisés pour l'étude de la corrélation.

La limite de 5% ($p < 0,05$) a été fixée comme limite de significativité.

RÉSULTATS

1. Domaine de mesure

a. Linéarité et étalonnage

Nous avons vérifié la limite supérieure annoncée du domaine de mesure (120g/L), puis nous avons étudié l'étalonnage.

Ainsi, nous avons dosé en triple les 36 solutions d'albumine dans une même série, puis nous avons calculé les coefficients d'exactitude CE. Ensuite, nous avons tracé la courbe d'étalonnage et réalisé une corrélation entre les valeurs observées et les valeurs théoriques.

Avec une limite de significativité fixée à 5%, nous situons la limite haute de linéarité à 100g/L. L'étalonnage a montré une courbe linéaire à la longueur d'onde de lecture (figure 1) selon l'équation suivante: $Protides\ totaux\ (g/L) = 193,65 A540 + 0,216$ ($r = 0,9975$; $p < 0,05$).

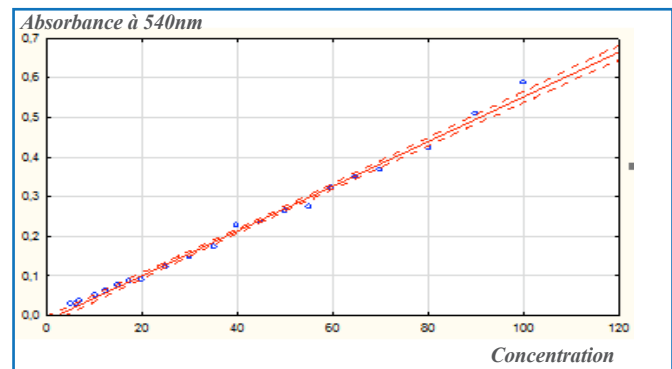


Figure 1. Courbe d'étalonnage des protéines totales à 540nm sur spectrophotomètre BIOLABO.

La corrélation entre les valeurs observées Y et les valeurs théoriques X (figure 2) obéit quant à elle à l'équation suivante:

$$Y = 0,9787 X - 0,2965 \quad (r = 0,9987; p < 0,05).$$

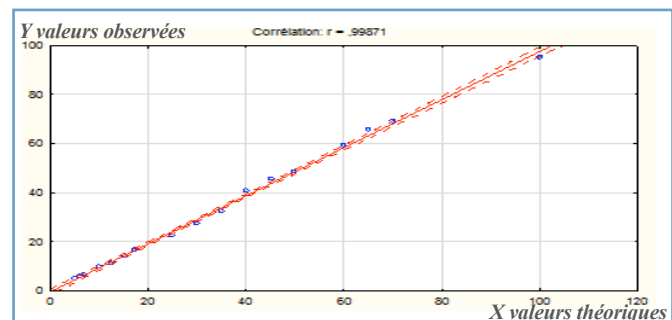


Figure 2. Corrélation entre les valeurs mesurées Y et les valeurs théoriques X .

b.Limite de détection analytique

Nous avons dosé trente fois dans une même série de l'eau distillée de qualité analytique, puis nous avons recueilli les résultats en unités d'absorbance [6]. Après calcul, la limite de détection obtenue était à 1,28g/L.

c.Seuil de quantification

Après calcul au cours du même précédent protocole [7], le seuil de quantification obtenu était de 4,25g/L.

d.Sensibilité analytique

Nous avons pris les deux concentrations situées aux 2 bornes du domaine de mesure (5 et 100g/L) [7]. Après calcul, la sensibilité obtenue était à 0,050 m Abs/10 g/L.

2.Stabilité de la réaction

Nous avons étudié la stabilité de la coloration du complexe en fonction du temps après dosage de plusieurs échantillons de concentration située entre 20 et 100g/l, en mesurant l'absorbance de la réaction à 540 nm toutes les quinze minutes. Nous avons fixé comme limite de stabilité le temps T_i ne dépassant pas une variation de 5% entre l'absorbance mesurée à T_0 et T_i . La coloration, après la fin de la réaction, était stable pendant une heure à température ambiante et à l'abri de la lumière avec une diminution de 2,7% de l'absorbance à 540 nm.

3.Reproductibilité

Nous avons analysé chaque échantillon pour chaque niveau de concentration dans quinze séries différentes, en début et en fin de série.

Les résultats de l'étude de reproductibilité sont regroupés dans le tableau I.

Tableau I. Résultats de l'étude de reproductibilité (n= 30).

	ET	CV	CVlimite SFBC
Niveau 1	1,27	1,74	2,4
Niveau 2	1,15	1,36	2,4

CV: coefficient de variation.

4.Appréciation de la justesse et de l'inexactitude

Nous avons analysé de façon répétée chaque échantillon pour chaque niveau de concentration dans quinze séries réalisées dans des conditions de répétabilité.

La moyenne calculée pour chaque niveau de concentration a été comparée à la valeur cible attribuée de l'échantillon de contrôle (assimilée à la valeur vraie) avec calcul de l'intervalle de confiance de la moyenne (Icm), du biais, de la justesse et de l'inexactitude [8].

Les résultats de l'étude de l'inexactitude sont présentés sur le tableau II.

Tableau II. Résultats de l'étude de la justesse et de l'inexactitude.

	Icm	Biais g/L	Biais%	Justesse	Justesse limite SFBC	Inexactitude	Inexactitude limite SFBC
Niveau 1	72,86±0,46	0,54	0,73	3,83	3,8	4,21	4,5
Niveau 2	84,36 ± 0,42	0,03	0,04	2,40	3,2	2,76	4

DISCUSSION

La limite supérieure du domaine de mesure trouvée, inférieure à celle annoncée par le fabricant, n'est pas satisfaisante. L'étalonnage est validé, en effet les critères d'acceptabilité pré-déterminés pour l'étalonnage d'une méthode linéaire sont amplement satisfaits avec une pente à 0.9787, un intercepte cliniquement négligeable à -0,2965 et un coefficient de corrélation r à 0,9987.

L'étude de la limite de détection et du seuil de quantification nous permet d'affirmer que les résultats des dosages de spécimens de patients peuvent être rendus avec une précision et une justesse satisfaisantes à partir de 4,25g/L, tandis que l'étude de la sensibilité analytique démontre le défaut de sensibilité du réactif Biuret qui n'est donc pas adapté au dosage des protéines de l'urine et du LCR.

La stabilité de la réaction est excellente à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les CV obtenus aux deux niveaux de concentration sont excellents et sont inférieurs aux CV limites définies dans le protocole Valtec [1].

L'étude de solutions du contrôle interne de la qualité retrouve un biais satisfaisant au niveau 1 et très satisfaisant au niveau 2, cela en tenant compte de l'intervalle de confiance de la moyenne.

Par ailleurs la justesse et l'inexactitude observées sont satisfaisantes aux deux niveaux de concentration surtout au niveau élevé avec des valeurs largement inférieures aux valeurs limites définies dans le protocole Valtec.

CONCLUSION

A la suite des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons affirmer que ce réactif, pour le dosage des protides totaux, présente d'excellentes performances analytiques en termes de détectabilité, de stabilité de la réaction, de reproductibilité, de justesse et d'inexactitude. Cependant une limite de linéarité à 100g/L seulement impose des dilutions aux concentrations élevées.

Ces caractéristiques techniques ont fait que cette méthode ait été introduite en routine quotidienne dans notre laboratoire comme technique manuelle de dosage des protides totaux plasmatiques aux concentrations basses (15-63 g/L) et moyennes (64-83 g/L).

RÉFÉRENCES

- Vassault A, Grafmeyer D, De Graeve J, Cohen R, Beaudonnet A, Bienvenu J.** Analyse de biologie médicale. Spécifications et normes d'acceptabilité à l'usage de la validation de techniques. Ann Biol Clin 1999; 57: 685-95.
- Alloui AS.** Mise en place d'un système Assurance Qualité au Laboratoire Central de Biochimie Clinique, Thèse de Doctorat de Spécialité de Sciences Médicales, Faculté de médecine de Constantine, Avril 2014.
- Estepa L.** Protéines totales, EMC-Biologie Médicale. 2006 [Article 90-10-0790].
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MN.** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J Biol Chem. 1949 Feb; 177(2): 751-66.
- Vassault A, Grafmeyer D, Naudin C et al.** Protocole de validation des techniques. Ann Biol Clin. 1986: 686-745.
- Baud M, Cohen R, Dumont G, Mercier M, Naudin C, Vassault A.** Protocole d'évaluation de la limite de détection d'une méthode analytique, Immunoanal Biol Spéc. 1986; 14: 17-27.
- Ducauze C, Baillet-Guffroy A, Bui T.X.** Choix et validation d'une méthode d'analyse. AgroParis Tech.
- Hainque B, Baudin B, Lefèvre P.** Bonnes pratiques de laboratoires, Appareils et méthodes en Biochimie et Biologie Moléculaire. Edition Médecine Sciences Publications. 2008: 52-56.