

Méthode colorimétrique 5-Br-PAPS-Zinc complexe avec déprotéinisation

Pour la *in vitro* détermination quantitative de Zinc dans le Sérum, Plasma, LCR et l'Urine

HP 439-14906
0318D3

Utilisation

Le Zinc Test de Wako est un *in vitro* essai de diagnostic en colorimétrie pour la détermination quantitative de zinc dans le sérum, plasma (pas EDTA), liquor (LCR) et l'urine.

Résumé et explication du test

Le Zinc Test de Wako est un essai photométrique montrant la précision et l'exactitude de la spectroscopie d'absorption atomique. Le Zinc Test de Wako est un coffret incluant le sel de sodium de 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[N-propyl-N-(3-sulfopropyl)amino]phénol (5-Br-PAPS) qui est le composant chromogénique, est utilisé dans un test sensible, colorimétrique pour le zinc. Le Zinc Test de Wako peut déterminer précisément la quantité de zinc dans l'échantillon qui peut être du sérum, du plasma, du LCR et de l'urine.

Principes chimiques du test

Une solution d'acide trichloracétique est ajoutée à l'échantillon pour précipiter les protéines laissant le zinc en solution. Après que les protéines soient éliminées, les Réactifs de Coloration A et B sont ajoutés à une quantité de liquide surnageant. Le zinc réagit pour donner 5-Br-PAPS, formant un chélate rouge-violet. L'absorption du chélate rouge-violet est mesurée à 560 nm, et est directement proportionnelle à la quantité de zinc dans l'échantillon. Bien que les réactifs de coloration employés peuvent être utilisés pour la détermination de fer, cuivre, cobalt, et nickel, la réaction avec ces autres métaux peut être supprimée en masquant les agents qui sont contenus dans le kit. 5-Br-PAPS chélate stochiométriquement (2 : 1) le zinc.

Réactifs

Composition et conditions de conservation

R1 :	Réactif de Coloration A	Conserver entre 2–25 °C*
R2 :	Réactif de Coloration B	Conserver entre 2–25 °C*
R3 :	Réactif de Déprotéinisation	Conserver entre 2–25 °C
CAL :	Solution Standard	Conserver entre 2–25 °C

* Conserver les Réactifs de Coloration A et B à l'abri de la lumière !

Ingrédients

R1 : 2 Bouteilles	Réactif de Coloration A	60 ml
	Solution de tampon carbonate bicarbonate (pH 9,8)	0,2 mol/l
	5-Br-PAPS	0,07 mmol/l
	Citrate de Sodium	170 mmol/l
	Diméthylglyoxime	4 mmol/l
R2 : 1 Bouteille	Réactif de Coloration B	30 ml
	Salicylaldoxime	29 mmol/l
R3 : 1 Bouteille	Réactif de Déprotéinisation	30 ml
	Acide Trichloracétique	7 %
CAL : 1 Bouteille	Solution Standard	10 ml
	Zinc	200 µg/dl

Préparation et conservation de réactifs

Solution Finale:

Reconstituer 15 ml de Réactif de Coloration B (R2) avec un flacon (60 ml) de Réactif de Coloration A (R1) et mélanger complètement. Autre option : Mélanger les Réactifs de Coloration A et B dans un rapport 4 + 1 (par exemple, 20 ml de Réactif de Coloration A est mélangé avec 5 ml de Réactif de Coloration B). Après avoir mélangé, la solution finale peut être utilisée pendant 2 jours à température ambiante (à moins de 35 °C), ou pendant une semaine à 2–10 °C. Après la production, la valeur d'essai à blanc augmente légèrement avec le temps, ceci n'a pas d'incidence sur les valeurs mesurées. Tout le matériel de travail doit être exempt de toute contamination de zinc. Les récipients contenant des réactifs doivent être maintenus fermés pour éviter toute contamination par des particules en suspension. Il est possible d'utiliser aussi les Réactifs de Coloration A et B séparément, dans ce cas le Réactif de Coloration A doit être utilisé en premier lieu.

Recueil et préparation des échantillons

Sérum, plasma (pas EDTA), liquor, urine peut être utilisé comme échantillon.

- Prendre soin d'éviter la contamination avec des agents chélateurs, comme l'EDTA qui causent artificiellement des valeurs basses de concentrations. L'héparine, le citrate et l'oxalate utilisés comme coagulants n'influencent pas la mesure.
- Dans le sang humain, 75–85 % de zinc existe dans les érythrocytes, 12–22 % dans le plasma et 3 % dans les leucocytes. Si de l'hémolyse apparaît, la quantité de zinc qui est mesurée dans le sérum va être artificiellement élevée. Dans ce cas, un autre échantillon de sang doit être prélevé. La concentration de zinc peut être déterminée non seulement dans le sérum, mais aussi dans le plasma, LCR, et l'urine utilisant une procédure similaire.
- Le caoutchouc qui est utilisé dans le bouchon pour les bouteilles de sérum de contrôle contient du zinc. Dissoudre le contenu en utilisant de la « Parafilm » (ou d'autres choses semblables) au lieu d'utiliser le caoutchouc comme bouchon.
- Lorsqu'un échantillon de sang est prélevé, prendre soin de ne pas utiliser d'instruments** ayant du caoutchouc contenant du zinc.

** par exemple, tube de prélèvement de sang, seringue.

Méthode de lavage

L'eau du robinet peut contenir de grandes quantités de fer et de cuivre, mais également de petites quantités de zinc. L'utilisation d'eau du robinet peut causer des erreurs positives dans la détermination de zinc dans l'échantillon. Tous les ustensiles en verre doivent être trempés dans de l'acide chlorhydrique et l'acide nitrique dilués (1 volume HCl et HNO₃ dilués avec 9 volumes d'eau déionisée) et de l'eau distillée. Les ustensiles doivent bien sécher avant utilisation. Si la valeur des blancs de réactif excède 3 % il y a sûrement contamination des ustensiles.

Mode opératoire standard (manuelle)

Tout l'équipement (Pipettes, l'eau distillée, Acide Trichloroacétique) doit être décontaminé de zinc. Laver les bouteilles de l'échantillon et du réactif avec 1 : 10 Triton X-100 et de l'eau, immergé dans du HCl ou HNO₃ dilué pendant 1 à 2 heures et rincer avec de l'eau distillée ou déionisée. Renverser et laisser goutter à sec.

Longueur d'onde :	560 nm (Hg 546 nm)
Cuvettes :	1 cm trajet optique
Température d'incubation :	+15 ~ 35 °C

Mesurer l'absorbance de l'échantillon et du standard envers le blanc du réactif (RB). Pour chaque batch utiliser un blanc de réactif et un ou deux standards.

Détails de la procédure

Pipetter dans des fioles	Macro			Semi-Micro		
	Échantillon	Std.	RB	Échantillon	Std.	RB
Échantillon ou contrôle	0,5 ml			0,2 ml		
Standard		0,5 ml			0,2 ml	
Eau distillée ou déionisée			0,5 ml			0,2 ml
Réactif de déprotéinisation	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Après avoir bien mélangé (par Vortex) centrifuger pendant 10 minutes à 3000 r.p.m.						
Fluide surnageant	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
Solution finale	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Après bien avoir mélangé, laisser le mélange pendant 10 min. Mesurer l'absorbance de l'échantillon et du standard envers le blanc du réactif. La couleur finale est stable pour 1 heure

Limite de détermination

Lorsque la valeur de zinc excède 500 µg/dl, diluer l'échantillon 1 + 1 avec du soluté NaCl ou de l'eau distillée, répéter la mesure et multiplier le résultat par 2.

Résultats

Calculs de la courbe de calibration

La concentration de zinc correspondant à une absorbance mesurée de l'échantillon (AS) peut être déterminée par interpolation de la courbe de calibration.

Par calcul :

$$\text{La concentration de zinc d'un échantillon (µg/dl)} = \frac{A_s}{A_{Std}} \times 200$$

Détermination de zinc dans des échantillons d'urine de 24 heures

Préparation de l'échantillon

Ajouter une ou deux gouttes d'acide chlorhydrique concentré à l'urine qui a été rassemblée pendant 24 heures. Bien mélanger pour réduire le pH à 3–4. Après dissolution du sédiment (sur lequel le zinc vraiment absorbe), l'échantillon est prêt pour l'analyse.

Calcul pour l'urine

$$\text{Le zinc dans un échantillon d'urine (µg/jour)} = \frac{A_s}{A_{Std}} \times 200 \times 10 \times \text{volume d'urine (l)}$$

Valeurs attendues⁴

Sérum et plasma

Hommes :	72,6–127,0 µg/dl (11,1–19,5 µmol/l)
Femmes :	70,0–114,0 µg/dl (10,7–17,5 µmol/l)

Des taux bas sont connus pour des femmes enceintes ou pendant la menstruation.

Enfants :	63,8–110,0 µg/dl (9,8–16,8 µmol/l)
Nouveau-nés :	49,5–99,7 µg/dl (7,6–15,3 µmol/l)
Urine :	300–800 µg/24 h

Du fait que les valeurs sont modifiées par l'âge, le sexe, le régime alimentaire, la location géographique et autres facteurs, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales.

Données techniques

(1) Exactitude

La précision de la méthode Zinc de Wako a été déterminée par des études de recouvrement pour lesquelles une quantité donnée de zinc a été ajoutée au sérum. Recouvrement : 96–101 %.

(2) Sensibilité

En utilisant un spectrophotomètre Hitachi® 200 à 560 nm, la sensibilité théorique de cette méthode exprimée en absorbativité est de 1110 l/gm · cm pour un réactif fraîchement préparé.

(3) Précision

La précision du test Zinc de Wako était établie en mesurant une série d'échantillons de sérum mesurés en double mesure. CV % < 2 %.

(4) Spécificité

La spécificité de la méthode de Zinc de Wako était examinée par l'analyse d'échantillons de sérum contenant une quantité connue de substances pouvant interférer. Ils sont résumés dans les tableaux 1 et 2.

Indications physique et chimique d'instabilité

La présence de précipité dans les réactifs, ou valeurs de sérum de contrôle en dehors du domaine acceptable du producteur peuvent être une indication concernant l'instabilité du réactif.

Corrélation^{2,3}

Spécimen	Sérum
Coefficient de corrélation	$r = 0,9228$ (n = 82)
Regression equation	$y = 0,975x + 4,35$
y	Wako Zinc 5 Br-PAPS Méthod (µg/dl)
x	Spectroscopie d'absorption atomique (µg/dl)

Interférences

L'héparine, le citrate et l'oxalate, utilisés comme anticoagulants et la bilirubine n'ont pas des effets significatifs sur l'analyse.

Tableau 1 : Etude d'addition de zinc dans le sérum

Nom	Additif		Sérum avec additifs
	Concentration finale	Quantité ordinaire	Concentration de Zinc (µg/dl)
Bilirubine	Sans	-	71,3
	5 (mg/dl)	-	72,5
	10	-	70,5
	15	-	71,9
	20	-	72,5
	25	-	-
Hémoglobine	Sans	-	71,3
	200 (mg/dl)	-	77,6
	400	-	85,8
	600	-	92,1
	800	-	97,2
	1000	-	104,1
Anti-coagulants	Sans	-	71,3
	Citrate 2,0 %	0,5 %	72,5
	Héparine 0,1 %	0,01 %	71,3
	Oxalate 2,0 %	0,2 %	72,6
	EDTA 0,5 %	0,1 %	1,9
	NaF 3,0 %	1,0 %	73,8

Tableau 2 : Etude d'addition d'ion métallique au zinc dans le sérum

Nom	Additif		Sérum avec additifs
	Concentration finale	Quantité normale dans le sérum	Concentration de Zinc (µg/dl)
Sans	-	-	72,9
Cu ²⁺	100 (µg/dl)	100 (µg/dl)	72,9
	300	-	74,1
	500	-	75,3
	1000	-	77,6
Fe ²⁺	100 (µg/dl)	120 (µg/dl)	73,5
	300	-	74,1
	500	-	76,4
	1000	-	80,0
Fe ³⁺	100 (µg/dl)	120 (µg/dl)	73,1
	300	-	76,0
	500	-	77,6
	1000	-	81,7
Co ²⁺	500 (µg/dl)	trace	76,4
Ni ²⁺	500 (µg/dl)	trace	82,3
Ca ²⁺	50 (mg/dl)	10 (mg/dl)	72,9
Mg ²⁺	50 (mg/dl)	2 (mg/dl)	72,9
NH ₄ ⁺	2 (mg/dl)	60 (µg/dl)	71,7
PO ₄ ²⁻	25 (mg/dl, de P)	4 (mg/dl)	73,5

Avertissements et précautions d'emploi

- Utilisation exclusive pour diagnostic *in vitro*.
- L'utilisation et l'adaptation de ce dosage sont réservées aux professionnels. Se référer à la législation en vigueur et aux réglementations locales ou nationales.
- Ne doit pas être utilisé *in vivo* chez l'homme ou l'animal.
- Ne pas utiliser les réactifs pour d'autres applications que celles décrites dans la notice. La performance ne peut être assurée si les réactifs sont utilisés selon d'autres procédés.
- Ne pas mélanger les réactifs de lots différents !
- Le réactif peut être utilisé manuellement ou sur des analyseurs automatiques. Pour une description de l'instrument et de ses fonctions, se référer au manuel de l'instrument !
- Un diagnostic clinique ne doit être posé par un médecin que sur base de la symptomatologie clinique en relation avec d'autres résultats de tests.
- Conserver les réactifs selon les conditions indiquées. Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date de péremption mentionnée sur l'étiquette de chaque emballage.
- Après ouverture, il est recommandé d'utiliser les réactifs immédiatement. Pour conserver les réactifs après ouverture, boucher les flacons et garder les selon les conditions indiquées.

- Les échantillons d'origine humaine doivent être considérés comme potentiellement infectieux et être traités en conséquence. La manipulation de tels échantillons doit se faire en concordance avec les directives des bonnes pratiques de laboratoire pour la prévention des transmissions d'agents infectieux et en respectant les dispositions réglementaires nationales et internationales en vigueur.
- En cas de contact avec la bouche, les yeux ou la peau, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.
- Pour éliminer les réactifs, les traiter selon les réglementations locales ou nationales en vigueur.
- Réactif de Déprotéinisation (R3) contient parmi ses constituants une substance classée comme suit selon le règlement (CE) n° 1272/2008 : acide trichloroacétique.

Pictogrammes de danger



Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage : acide trichloroacétique

Mentions de danger

- Peut être corrosif pour les métaux.
- Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves.
- Peut irriter les voies respiratoires.
- Toxique pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence

- Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols
- Éviter le rejet dans l'environnement.
- EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux) : enlever immédiatement les vêtements contaminés. Rincer la peau à l'eau/se doucher.
- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
- Appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
- EN CAS D'INHALATION : transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
- Absorber toute substance répandue pour éviter qu'elle attaque les matériaux environnants.

Réactif de Coloration A (R1) contient parmi ses constituants une substance classée comme suit selon le règlement (CE) n° 1272/2008 : Dodecyl alcohol, ethoxylated

Pictogrammes de danger



Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage : Dodecyl alcohol, ethoxylated

Mentions de danger

- Provoque des lésions oculaires graves
- Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Conseils de prudence

- Éviter tout contact avec les yeux, la peau ou les vêtements
- Éviter le rejet dans l'environnement.
- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX : rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
- Appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.

Références

- Makino, T., Saito, D., Horiguchi, K. Kina: Clin. Chim. Acta 120 : 127 (1982). A highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water-soluble pyridylazo dye.
- Oster, O., Huesgen, G., und Prellwitz, W. Präanalytische und analytische Probleme einer teilmechanisierten photometrischen Serumzinkbestimmung. Ärztl. Lab. 33, 177 - 185 (1987).
- Johnsen, Ø. und Eliasson, R. Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. Int. J. Androl. 10, 435 - 440 (1987).
- Kruse-Jarres, J.D.: Zinc (Zn) S. 347 - 349 in Thomas, L., Hsg., Clinical Laboratory Diagnostics. Use and Assessment of Clinical Laboratory Results. Frankfurt/ Main, 1998.

Présentation

Référence	Produit	Conditionnement
439-14906	Zinc	R1 : 2 x 60 ml
		R2 : 1 x 30 ml
		R3 : 1 x 30 ml
		CAL : 1 x 10 ml
410-00104	Wako Control Serum I	CONTROL I : 4 x pour 5 ml
416-00204	Wako Control Serum II	CONTROL II : 4 x pour 5 ml