



ANNEE 2006 THESE : 2006 – TOU 3 - 4116

COMPARAISON DES TESTS DE DEPISTAGE RAPIDE ET DE LA MESURE DE LA PROTEINURIE CHEZ LE CHIEN

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

DIPLOME D'ÉTAT

*présentée et soutenue publiquement en 2006
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

Juliane, Fabienne LEROY

Née le 18 octobre 1981 à FONTENAY AUX ROSES (Hauts de Seine)

Directeur de thèse : **M. le Professeur Jean-Pierre BRAUN**

JURY

PRESIDENT :
M. Francis LE GAILLARD

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEUR :
M. Jean-Pierre BRAUN
Mme. Catherine TRUMEL

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE



A notre président de thèse

Monsieur le Professeur Francis LE GAILLARD
Professeur des Universités
Praticien hospitalier
Biochimie – Biologie moléculaire

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse

Monsieur le Professeur Jean-Pierre BRAUN
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Physique et Chimie biologiques et médicales

Qui nous a proposé ce sujet de thèse et a accepté la direction de notre travail.

Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Madame le Professeur Catherine TRUMEL
Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
Pathologie médicale des Equidés et Carnivores

Qui a aimablement accepté de faire partie de notre jury de thèse.

Sincères remerciements.

A mes parents, mon frère Damien et ma sœur Raphaëlle,

Pour leur présence et leur soutien permanent dans la joie comme dans l'adversité. Tout mon amour.

A Benjamin,

Pour sa patience et son soutien quotidien.

Au Dr Layssol, au Dr Geffré, à Mme Palanché et aux internes 2005-2006 de l'ENVT,

Pour leur aide précieuse tout au long de ce projet.

A mes amis de l'ENVT, du club cynophile TVA et d'ailleurs,

Tous mes remerciements. Mon amitié vous est acquise.

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|----|
| INTRODUCTION..... | 15 |
| I/ LA PROTEINURIE EN MEDECINE CANINE..... | 17 |
| 1) Physiopathogénie des protéinuries du chien | 17 |
| a. Mécanismes de l'excrétion physiologique des protéines urinaires | 17 |
| i. Structure du filtre glomérulaire : | 17 |
| ii. Mécanismes de filtration sélective au niveau du glomérule | 19 |
| iii. Formation de l'urine définitive | 19 |
| b. Mécanismes de l'excrétion pathologique des protéines urinaires..... | 20 |
| c. Protéines constitutives de l'urine | 20 |
| 2) Etiologies des protéinuries pathologiques du chien | 21 |
| a. Protéinuries pré-rénales..... | 21 |
| b. Protéinuries rénales | 21 |
| i. Fonctionnelles | 21 |
| ii. Glomérulaires..... | 22 |
| iii. Tubulaires | 23 |
| iv. Inflammation du parenchyme rénal | 24 |
| c. Protéinuries post-rénales | 24 |
| 3) Présentation des méthodes d'évaluation et de quantification de la protéinurie | 24 |
| a. Méthodes semi-quantitatives..... | 25 |
| i. Bandelettes urinaires | 25 |
| ii. Tests par opacimétrie | 26 |
| b. Méthodes quantitatives..... | 27 |
| i. Méthodes colorimétriques..... | 27 |
| ii. Méthodes opacimétriques | 27 |
| iii. Comparaison des méthodes de dosage de la protéinurie | 28 |
| 4) Facteurs pré analytiques et analytiques..... | 28 |
| a. Facteurs liés à l'échantillon..... | 28 |
| i. Mode de prélèvement..... | 28 |
| ii. Animal..... | 29 |
| iii. Stockage et conservation de urines | 29 |

| | |
|--|----|
| iv. Protéines constituant l'urine..... | 29 |
| v. Densité urinaire | 30 |
| vi. pH urinaire | 31 |
| vii. Turbidité de l'urine | 31 |
| viii. Hématurie et inflammation du tractus urinaire | 31 |
| ix. Autres métabolites urinaires..... | 32 |
| x. Constituants iatrogènes | 33 |
| b. Facteurs liés à la technique employée pour le dosage..... | 33 |
| i. Opérateur..... | 33 |
| ii. Température | 34 |
| iii. Choix des réactifs..... | 34 |
| iv. Stockage des réactifs | 34 |
| v. Temps d'incubation..... | 34 |
| II/ MATERIEL ET METHODE | 36 |
| 1) Recueil des échantillons | 36 |
| a. Animaux inclus dans l'étude | 36 |
| b. Méthodes de recueil des urines | 36 |
| c. Traitement et conservation des échantillons | 37 |
| 2) Analyses préliminaires des échantillons | 37 |
| a. Evaluation des critères macroscopiques..... | 37 |
| b. Mesure de la densité urinaire | 37 |
| 3) Dosage des protéines urinaires..... | 37 |
| a. Composition des réactifs | 38 |
| b. Conservation des réactifs | 38 |
| c. Réalisation du dosage..... | 38 |
| d. Contrôle de la qualité | 39 |
| 4) Evaluation semi-quantitative de la protéinurie..... | 39 |
| a. Bandelette urinaire | 39 |
| b. Test de précipitation à l'acide sulfosalicylique | 40 |
| c. Test modifié de Heller à l'acide nitrique..... | 40 |
| III/ RESULTATS | 42 |
| 1) Dosage au rouge de pyrogallol..... | 42 |

| | | |
|-----|---|----|
| a. | Contrôle de qualité | 42 |
| b. | Résultats du dosage des protéines urinaires | 43 |
| 2) | Comparaison du test semi-quantitatif de la bandelette urinaire et du dosage quantitatif au rouge de pyrogallol..... | 44 |
| a. | Comparaison des lectures visuelle et automatique sur la bandelette urinaire | 44 |
| b. | Comparaison des lectures visuelle et automatique de la bandelette et du dosage quantitatif par la technique au rouge de pyrogallol..... | 45 |
| 3) | Evaluation par le test de précipitation à l'acide sulfosalicylique | 48 |
| 4) | Evaluation par le test modifié de Heller à l'acide nitrique..... | 49 |
| a. | Comparaison des tests de Heller N1 et N2..... | 49 |
| b. | Comparaison des tests de Heller N1 et N2 et du dosage quantitatif par la technique au rouge de pyrogallol..... | 50 |
| 5) | Dépistage du seuil 0.50 g/L avec les techniques rapides | 52 |
| 6) | Effets du pH, de l'hématurie, de la prise de traitement antibiotique et de la densité... | 54 |
| a. | Effet du pH | 54 |
| b. | Effet de l'hématurie..... | 55 |
| c. | Effet de la prise d'antibiotiques | 56 |
| d. | Effet de la densité | 57 |
| IV/ | DISCUSSION..... | 59 |
| 1) | Validité de l'étude | 59 |
| 2) | Dépistage à l'aide de la bandelette urinaire | 60 |
| a. | Discussion sur les faux positifs | 60 |
| b. | Discussion sur les faux négatifs | 61 |
| c. | Discussion sur le seuil de décision..... | 61 |
| 3) | Dépistage par le test à l'acide sulfosalicylique | 62 |
| a. | Discussion sur les faux positifs | 62 |
| b. | Discussion sur les faux négatifs | 63 |
| c. | Discussion sur le seuil de décision..... | 63 |
| 4) | Dépistage par les méthodes de Heller | 64 |
| | CONCLUSION | 67 |
| | BIBLIOGRAPHIE..... | 69 |

TABLE DES ILLUSTRATIONS

| | |
|--|----|
| <u>Figure 1</u> : Schéma et photographie en microscopie électronique du filtre glomérulaire | 18 |
| <u>Figure 2</u> : Diagramme de Levey-Jennings du contrôle de qualité de la mesure de la concentration de protéines dans l'urine..... | 42 |
| <u>Figure 3</u> : Répartition des écarts absolus (en g/L) entre les duplicates en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol. | 43 |
| <u>Figure 4</u> : Répartition des écarts relatifs (%) entre les duplicates en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol..... | 43 |
| <u>Figure 5</u> : Répartition des 151 échantillons testés en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol | 44 |
| <u>Figure 6</u> : Comparaison des résultats d'évaluation de la protéinurie à la bandelette en lecture visuelle et automatique..... | 45 |
| <u>Figure 7</u> : Comparaison des résultats de la lecture visuelle de la bandelette urinaire et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 151 cas | 46 |
| <u>Figure 8</u> : Comparaison des résultats de la lecture automatique de la bandelette urinaire et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 151 cas | 46 |
| <u>Figure 9</u> : Comparaison des résultats du test à l'acide sulfosalicylique et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 147 cas..... | 48 |
| <u>Figure 10</u> : Comparaison des résultats d'évaluation de la protéinurie à la réaction de Heller selon si l'acide ou l'urine est déposé en premier | 50 |
| <u>Figure 11</u> : Comparaison des résultats du test de Heller N1 (acide en premier) et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 123 cas..... | 51 |
| <u>Figure 12</u> : Comparaison des résultats du test de Heller N2 (urine en premier) et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 142 cas..... | 51 |
| | |
| <u>Tableau 1</u> : Maladies associées aux glomérulonéphrites chez le chien..... | 22 |
| <u>Tableau 2</u> : Répartition et classement des valeurs mesurées par la technique au rouge de pyrogallol en fonction de l'évaluation semi-quantitative à l'aide de la bandelette urinaire. | 47 |
| <u>Tableau 3</u> : Répartition et classement des valeurs mesurées par la technique au rouge de pyrogallol en fonction de l'évaluation semi-quantitative au test à l'acide sulfosalicylique..... | 49 |

| | |
|---|----|
| <u>Tableau 4</u> : Efficacité des tests rapides au seuil de 0.50 g/L..... | 53 |
| <u>Tableau 5</u> : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction du pH..... | 55 |
| <u>Tableau 6</u> : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de la réaction de la plage « Sang » de la bandelette urinaire | 56 |
| <u>Tableau 7</u> : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de la prise de traitement antibiotique | 57 |
| <u>Tableau 8</u> : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de leur densité | 58 |

INTRODUCTION

La protéinurie est définie par la présence dans les urines d'une quantité de protéines supérieure aux valeurs usuelles. Pour le chien, cette limite physiologique varie selon les auteurs et les protocoles de dosages utilisés : 0.430 g/L (Asheim, 1964), 0.56 g/L (Hendriks et al., 1976), 0.640 g/L (Barsanti and Finco, 1979) ou encore 0.950 g/L (Barsanti and Finco, 1979). Cette variabilité du seuil de décision résulte notamment des techniques de dosages qui n'ont pas la même sensibilité par rapport aux différentes protéines présentes dans les urines, et de la variabilité intra-individuelle qui a été peu étudiée jusqu'à présent.

Depuis longtemps chez le chien, la mise en évidence et la caractérisation de la protéinurie sont considérées comme des étapes clés des démarches diagnostique et thérapeutique lors de maladie rénale (Grauer, 2005). De plus, les lésions rénales étant fréquemment la conséquence de maladies localisées dans d'autres organes, la découverte d'une protéinurie lors de bilans de routine peut permettre de détecter des maladies insoupçonnées.

La précocité du diagnostic de la protéinurie est un facteur pronostique important de l'évolution de la maladie rénale. En effet, lorsque l'excrétion protéique urinaire est importante lors du diagnostic de l'insuffisance rénale chronique, les risques de développer des crises urémiques, ainsi que les risques de mortalité sont plus élevés (Jacob et al., 2005). Il est alors facile de comprendre l'intérêt d'un dépistage précoce de la protéinurie. De nos jours, il est recommandé d'effectuer des tests de dépistage :

- Lorsqu'un chien est atteint d'une maladie amenant le vétérinaire à effectuer des examens hématologiques ou biochimiques,
- Tous les 6 mois chez un animal atteint d'une maladie chronique connue pour être fréquemment compliquée de protéinurie,
- Lors des bilans de santé d'animaux en apparente bonne santé, en association avec des examens hématologiques et biochimiques (Lees et al., 2005).

Cependant, la protéinurie est plus qu'un simple marqueur de lésions rénales : elle peut être la cause de lésions glomérulaires et tubulo-interstitielles, et conduire à une perte progressive de néphrons. En effet, les protéines accumulées dans le glomérule sont susceptibles de stimuler la production de la matrice mésangiale par la prolifération des cellules du même nom. Cette accumulation peut, de plus, conduire à une inflammation

interstitielle voire à la fibrose du tubule, par le biais de plusieurs mécanismes dont l'obstruction tubulaire, la rupture des lysosomes et l'intervention du complément, de cytokines et de facteurs de croissance (Grauer, 2005).

De ce fait, la diminution de la protéinurie est un objectif thérapeutique en soi. Chez le chien atteint d'insuffisance rénale chronique, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine permettent une diminution de la protéinurie accompagnée d'un ralentissement de la progression de la maladie et d'un allongement de la durée la vie (Grauer et al., 2000). Ces traitements, en ralentissant les fuites protéiques urinaires, permettent de plus de lutter contre les complications classiquement associées à des protéinuries sévères : hypoalbuminémie, œdème, ascite, hypercholestérolémie, hypertension et hypercoagulabilité.

Le suivi de la protéinurie permet de différencier les protéinuries temporaires des protéinuries persistantes, distinction importante pour la démarche diagnostique. On peut noter que chez le chien, une protéinurie rénale persistante est définie par un rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire supérieur ou égal à 0.5, obtenu sur au moins 3 échantillons espacés d'au moins 2 semaines (Lees et al., 2005). La surveillance de l'excrétion des protéines urinaires donne, en outre, des informations sur la réponse de l'animal à un éventuel traitement. Cependant, une amélioration ou une stabilisation de la protéinurie doit s'interpréter avec prudence, car en fin d'évolution de maladie rénale, il est classique d'observer une diminution de la protéinurie du fait de la réduction néphronique (3).

Plusieurs tests de dépistage des protéines urinaires sont accessibles au vétérinaire praticien dans le cadre de sa clinique. Tous présentent des points forts et des limites que le praticien se doit de connaître pour interpréter au plus juste les résultats obtenus. Le but de cette étude est de comparer ces méthodes de dépistage à une technique de référence permettant le dosage quantitatif des protéines urinaires.

I/ LA PROTEINURIE EN MEDECINE CANINE

1) Physiopathogénie des protéinuries du chien

Les protéines sont un constituant « normal » des urines des carnivores domestiques. Les valeurs usuelles de concentration urinaire en protéines varient notablement selon les études, et selon les protocoles employés. Chez le chien sain, les valeurs moyennes de pertes protéiques urinaires sur 24 heures rapportées sont de 13.9 mg/kg/24h (DiBartola et al., 1980), inférieures à 10 mg/kg/24h (Biewenga et al., 1982) ou encore 38 mg/24h (Barsanti and Finco, 1979).

Les structures anatomiques qui composent le filtre rénal permettent une filtration sélective des protéines chez l'animal sain. Toute altération de ce filtre est susceptible d'engendrer une excrétion protéique pathologique du fait de sa quantité anormalement élevée, ou bien de la composition qualitative de ces protéines urinaires.

Les bases biologiques de l'excrétion des protéines sont décrites par plusieurs auteurs et reconnues internationalement (DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985; Pages and Trouillet, 1990).

a. Mécanismes de l'excrétion physiologique des protéines urinaires

i. Structure du filtre glomérulaire :

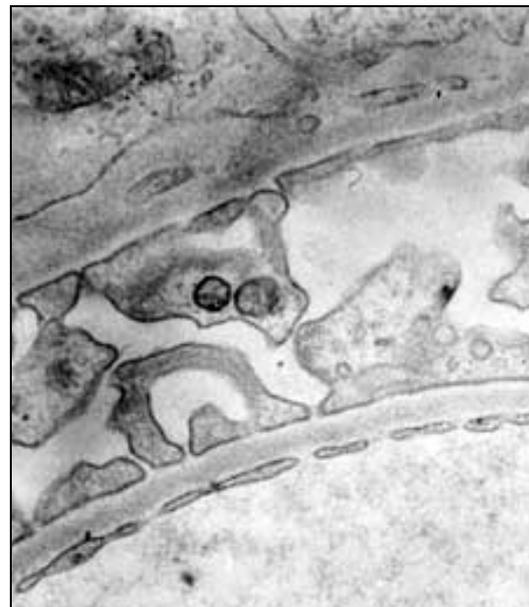
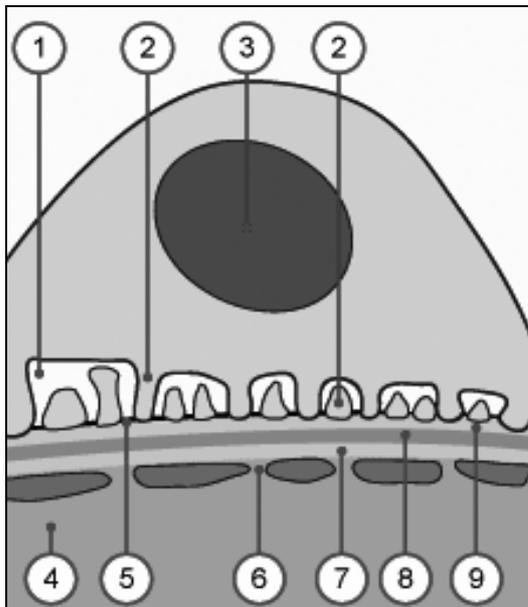
Le filtre glomérulaire est composé de trois grandes structures dotées de caractéristiques différentes, que les molécules plasmatiques doivent traverser pour atteindre la lumière du glomérule (Figure 1).

La première barrière est constituée par les cellules endothéliales des capillaires du glomérule. Les fenestrations de ces capillaires mesurent environ 100 nm de diamètre et n'interdisent pas le passage des protéines sériques.

La seconde barrière est plus sélective. Elle comprend trois couches d'agencement différent dont l'ensemble forme la membrane basale : la lamina rara interna, la lamina densa et la lamina rara externa. La matrice de la membrane basale comprend des glycoprotéines

constituées entre autres d'acides aminés dicarboxyliques (acide glutamique et aspartique) et d'acide sialique. Ces résidus étant ionisés au pH sanguin et urinaire, la charge électrique globale de la membrane basale est négative. La lamina rara retient les molécules de plus de 5 nm de rayon effectif ou de masse moléculaire supérieur à 100 000.

Les podocytes et leurs digitations composent la dernière barrière séparant les molécules plasmatiques de l'urine primitive. Leur surface est recouverte d'acide sialique chargé négativement, et qui intervient dans la sélectivité de la perméabilité glomérulaire. Entre les processus interdigités, il existe des pores traversés par une membrane composée en particulier de certaines protéines synthétisées uniquement par les podocytes, principalement la néphrine, et dont la mutation est responsable de protéinuries massives chez l'homme. Ceci amène à suggérer que le diaphragme des fentes de filtration situées entre les podocytes soit la structure responsable de la sélectivité du filtre glomérulaire chez le sujet en bonne santé (13), et qui, en définitive, ne permet pas le passage des grosses protéines plasmatiques de masse moléculaire supérieure à 67 000 68 000.



1 : chambre urinaire, 2 : pédicelle, 3 : noyau du podocyte, 4 : lumière du capillaire, 5 : fente de filtration, 6 : pore de l'endothélium, 7 : lamina rara interna , 8 : lamina densa, 9 : lamina rara externa.

Fig. 1 : Schéma et photographie en microscopie électronique du filtre glomérulaire.

Source : <http://www.unifr.ch/histologie/elearningfree/francais/rein/niere08.html#barriere>

ii. Mécanismes de filtration sélective au niveau du glomérule

Trois facteurs déterminent le passage des molécules à travers le filtre glomérulaire : leur concentration plasmatique, leurs caractéristiques physicochimiques et les constantes hémodynamiques du sujet (Le Bricon, 2001).

Le plus important des paramètres physicochimiques est la masse moléculaire des protéines : en général, les molécules de plus de 70 000 ne traversent pas le filtre. L'albumine dont la masse moléculaire est d'environ 66 000 à 67 000 selon les espèces est classiquement considérée comme la protéine-seuil. Elle n'est que peu filtrée et est fortement réabsorbée, et par conséquent, ne devrait pas se retrouver en grande quantité dans les urines d'un animal sain. Certaines molécules de masse moléculaire inférieure à 70 000 ne passent pas le filtre glomérulaire du fait de leurs interactions avec des protéines porteuses de masse supérieure : c'est par exemple le cas de l'hémoglobine qui s'associe avec l'haptoglobine. La conformation des protéines intervient également dans le passage des protéines vers la lumière glomérulaire : les protéines linéaires passent plus facilement que les protéines globulaires.

Le filtre glomérulaire étant essentiellement composé de molécules anioniques, telles les glycosialoprotéines de la lamina rara ou les acides sialiques de la surface des digitations des podocytes, certaines molécules polyanioniques se trouvent repoussées, alors que les molécules polycationiques voient leur passage facilité.

iii. Formation de l'urine définitive

Les protéines filtrées par le glomérule ne se retrouvent pas toutes dans l'urine définitive. Il existe des processus saturables de réabsorption tubulaire mettant en jeu notamment un récepteur protéique appelé mégaline, de la famille des lipoprotéines de faible densité. L'endocytose et le catabolisme des protéines a lieu dans les cellules épithéliales des tubules, puis les produits de dégradation sont transférés dans la circulation générale. Il en résulte que l'urine ne contient que peu de protéines plasmatiques filtrées, même de petite taille.

Par ailleurs, certaines protéines sont sécrétées par la branche ascendante de l'anse de Henlé, le tubule contourné distal ou le tube collecteur. C'est entre autres le cas de la mucoprotéine de Tamm Horsfall, de l'urokinase, et des Ig A sécrétoires (Le Bricon, 2001).

b. Mécanismes de l'excrétion pathologique des protéines urinaires

L'excrétion des protéines urinaires devient pathologique dès lors que leur concentration est supérieure à un seuil dont l'estimation varie selon les auteurs. En 1976, Hendriks (Hendriks et al., 1976) a proposé 0.56 g/L comme valeur limite de concentration protéique urinaire physiologique chez le chien.

Trois mécanismes principaux peuvent expliquer une augmentation pathologique de l'excrétion protéique urinaire : l'augmentation de la filtration glomérulaire, la diminution de la réabsorption tubulaire, et une élévation de la sécrétion par l'ensemble du tractus urinaire. Ces trois mécanismes peuvent s'associer.

c. Protéines constitutives de l'urine

Le composant protéique principal des urines de chien sain est l'albumine. Sa proportion varie de 40% à 100% selon les auteurs (DiBartola et al., 1980; Porter, 1964).

Les cellules épithéliales des tubules et du bas appareil urinaire et génital sécrètent des enzymes, des mucoprotéines et des immunoglobulines qui peuvent constituer jusqu'à 50% des protéines physiologiquement présentes dans les urines (Grauer, 2003). La mucoprotéine de Tamm Horsfall, une α -glycoprotéine, est physiologiquement présente dans les urines de chien sain à des concentration variant de 0.005 à 0.1 g/L (DiBartola et al., 1980). D'autres globulines peuvent être présentes, telles que la transferrine, la 7 S γ -globuline, et de nombreuses α -glycoprotéines (Porter, 1964). Une étude qualitative (électrophorèse SDS-PAGE et immunoblotting) menée chez le chien a montré que la transferrine, l' α 1-microglobuline et la Retinol Binding Protein (RBP) ont été plus souvent détectées chez les chiens malades que chez les chiens sains, et que la RBP semble être spécifique d'une atteinte tubulaire (Yalcin and Cetin, 2004).

D'autres protéines de faible masse moléculaire, présentes normalement ou anormalement dans le plasma, peuvent être présentes lors de processus pathologique en l'absence de lésion rénale. Il s'agit en particulier de l'hémoglobine, de la myoglobine, des chaînes légères d'immunoglobuline encore appelées protéines de Bence Jones.

2) Etiologies des protéinuries pathologiques du chien

Un consensus nord américain de l'ACVIM (Lees et al., 2005) classe les protéinuries en trois catégories : pré-rénales, rénales et post-rénales.

a. Protéinuries pré-rénales

Les protéinuries pré-rénales sont dues à la présence anormale dans le plasma de protéines qui traversent un filtre glomérulaire dont la perméabilité sélective est normale. La nature de ces protéines varie selon le processus pathologique mis en cause. Ainsi, on détecte des protéines de Bence Jones lors de myélome multiple, du lysozyme lors de leucémie lymphoplasmocytaire, de protéines de l'inflammation lors des grands syndromes inflammatoires (septicémie, abcès multiples, etc...), de l'hémoglobine lors d'hémolyse intravasculaire, ou encore de la myoglobine lors de rhabdomyolyse.

D'autre part, lors de protidémie supérieure à 90 g/L, les glomérules sont altérés et de grandes quantités d'albumine ou autres protéines de masse moléculaire élevée apparaissent dans les urines. Cette protéinurie est réversible par rétablissement de la protidémie dans les valeurs usuelles (Pages and Trouillet, 1990).

b. Protéinuries rénales

Les protéinuries rénales sont le plus généralement persistantes. Elles peuvent être classées en quatre catégories selon la nature du trouble : fonctionnelles, glomérulaires, tubulaires ou liées à une inflammation du parenchyme rénal.

i. Fonctionnelles

Les protéinuries dites fonctionnelles seraient en partie dues à une augmentation de la pression de filtration dans glomérule. Chez le chien, ces protéinuries d'origine hémodynamique sont temporaires (Pages and Trouillet, 1990).

Parmi les étiologies possibles des protéinuries fonctionnelles, on trouve la congestion passive chronique du rein lors d'insuffisance cardiaque congestive droite, de thrombose de la veine rénale et de péricardites constrictives. Il semblerait que la vasoconstriction rénale lors de stress, de fièvre, d'exercice intense, de convulsions ou d'exposition à des températures

extrêmes, joue un rôle dans l'apparition de ce type de protéinurie. La sténose de l'artère rénale, en activant le système rénine-angiotensine, et le phaeochromocytome, par l'action des catécholamines, sont aussi susceptibles de provoquer des désordres hémodynamiques de nature à engendrer des protéinuries fonctionnelles (Pages and Trouillet, 1990).

ii. Glomérulaires

Il existe deux types de maladies glomérulaires chez le chien. La première, la glomérulonéphrite à médiation immune, est due à une accumulation d'immuns complexes dirigés directement contre les structures glomérulaires, ou au dépôt d'immuns complexes circulants lors de maladies systémiques telles que des infections chroniques, la dirofilariose, le lupus érythémateux systémique, l'hyperadrénocorticisme ou encore les cancers ou les affections inflammatoires systémiques (Relford and Lees, 1996).

Tabl. 1 : Maladies associées aux glomérulonéphrites chez le chien

| | |
|---|--|
| <u>Origine infectieuse :</u> | |
| <i>Adenovirus canin de type I</i> | <i>Borelliose</i> |
| <i>Endocardiose bactérienne</i> | <i>Infection bactérienne chronique (gingivite, pyodermite)</i> |
| <i>Brucellose</i> | <i>Trypanosomose</i> |
| <i>Dirofilariose</i> | <i>Fièvre pourprée des montagnes Rocheuses</i> |
| <i>Ehrlichiose</i> | <i>Helicobacter ?</i> |
| <i>Leishmaniose</i> | |
| <i>Pyomètre</i> | |
| <u>Néoplasme</u> | |
| <u>Affections inflammatoires :</u> | |
| <i>Pancréatite</i> | <i>Prostatite</i> |
| <i>Lupus érythémateux systémique</i> | <i>Hépatite</i> |
| <i>Autres maladies à médiation immune</i> | <i>Maladie inflammatoire du colon</i> |
| <u>Autres :</u> | |
| <i>Hyperadrénocorticisme</i> | <i>Diabète</i> |
| <i>Idiopathique</i> | <i>Hyperfiltration non immunologique</i> |
| <i>Familiale</i> | |

D'après NELSON RW et COUTO CG.
Small animal internal medicine. 3rd edition. Saint Louis : Mosby, 2003. 1362 p.

L'amyloïdose rénale est la seconde maladie glomérulaire chez le chien. Les lésions observées sont dues à un dépôt de substance amyloïde réactive. Elles s'observent lors de diabètes ou d'hypothyroïdisme (Relford and Lees, 1996), lors de syndromes inflammatoires chroniques (abcès, ostéomyélite, pyomètre, lupus érythémateux systémique, pyélonéphrite, etc...) ou encore de processus néoplasique (myélome multiple, lymphome). Il existe aussi des cas d'amyloïdose familiale sans cause identifiée (Relford and Lees, 1996).

Les glomérulonéphrites et les amyloïdoses rénales altèrent la perméabilité sélective du glomérule et provoquent fréquemment des protéinuries supérieures à 50 mg/kg/24h et des rapports créatinine urinaire sur protéines urinaires supérieurs à 3 (Grauer, 2003). Les pertes protéiques sont plus élevées chez les chiens atteints de glomérulonéphrite (0.380 g/kg/24h), que chez les chiens atteints d'amyloïdose rénale (0.257 g/kg/24h) (Biewenga et al., 1982).

La gravité des lésions augmente significativement avec le rapport (Protéines de masse moléculaire élevée) / albumine : chez le chien atteint de lésions glomérulaires modérées, l'albumine prédomine, alors que lorsque les lésions sont majeures, on observe une augmentation marquée de l'excrétion urinaire de protéines de masse moléculaire élevée (Biewenga et al., 1982).

iii. Tubulaires

Les protéinuries tubulaires, moins fréquentes que les protéinuries glomérulaires, s'expliquent par un défaut de réabsorption des protéines filtrées, ou bien par la libération de protéines dans la lumière tubulaire. Ces lésions tubulaires sont présentes lors d'intoxications (métaux lourds, éthylène glycol, antifongiques tels que l'amphotéricine B, antibiotiques tels que les aminosides, les tétracyclines), de cystinurie et de lysinurie, de calcinose hypercalcémique, de tubulite infectieuse (leptospirose, cytomégalovirose) ou encore lors de syndrome de Fanconi (Pages and Trouillet, 1990).

L'analyse qualitative des protéines urinaires excrétées permet une certaine localisation des lésions. Ainsi, il a été montré que, chez le chien comme chez l'homme, la Retinol Binding Protein (RBP) et la protéine de Tamm Horsfall pouvaient être utilisés respectivement comme marqueurs de lésions tubulaires proximales ou distales. En effet, la RBP est normalement totalement réabsorbée par le tubule contourné proximal : sa présence dans les urines révèle une lésion de cette structure. La protéine de Tamm Horsfall est synthétisée uniquement par les

cellules tubulaires de la portion distale du néphron et sa sécrétion est donc diminuée lors d'atteinte du tubule contourné distal (Forterre et al., 2004).

iv. Inflammation du parenchyme rénal

Le parenchyme rénal peut être le siège d'une inflammation provoquant une protéinurie lors de tumeur rénale, de trauma ou de pyélonéphrite (Grauer, 1985).

c. **Protéinuries post-rénales**

Parmi les étiologies des protéinuries post-rénales on trouve les urolithiases, les inflammations du tractus urogénital (métrite, prostatite, cystite bactérienne ou médicamenteuse avec les cyclophosphamides), les traumas et les néoplasmes. Ces protéinuries sont généralement associées à un sédiment urinaire actif qui reflète la cause spécifique (Grauer, 1985, Grauer 2003).

Le dépistage et la caractérisation de la protéinurie s'avèrent donc indispensables lors du diagnostic, du pronostic et du choix du traitement à mettre en place. Le vétérinaire doit donc disposer d'outils efficaces pour la détection de cette anomalie, mais aussi connaître leurs limites afin d'interpréter correctement les résultats obtenus.

3) **Présentation des méthodes d'évaluation et de quantification de la protéinurie**

Les tests de dépistage ou de quantification de la protéinurie s'effectuent de préférence sur des urines fraîches et centrifugées (Grauer, 1985). Il est classiquement admis que la meilleure méthode pour quantifier les pertes urinaires est la mesure de l'excrétion protéique sur 24 heures, ce qui est difficilement réalisable en pratique car cela nécessite l'hospitalisation des animaux. De plus, la durée de collecte d'au moins 24 heures retarde d'autant le diagnostic de la protéinurie, ainsi que le traitement à mettre en œuvre.

Il a été montré chez le chien sain ou atteint de maladie rénale, que le rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire était une bonne estimation de la perte protéique urinaire sur 24 heures (Center et al., 1985; White et al., 1984). Cette méthode est applicable sur un échantillon unique et le prélèvement peut s'effectuer au cours de la consultation. Chez

l'homme, le rapport protéines urinaires sur créatinine urinaire peut être avantageusement remplacé par le rapport protéines urinaires sur osmolalité (Wilson and Anderson, 1993).

Cependant, ces dosages requièrent des moyens analytiques notables et les résultats ne sont pas disponibles immédiatement d'où l'intérêt des tests de dépistage de routine. Il existe différents types de tests présentant chacun des avantages et des inconvénients mais tous sont simples, rapides et peu onéreux. Dans le cas d'un dépistage positif, d'autres investigations peuvent alors être demandées à un laboratoire de biologie, en premier lieu la quantification de la protéinurie, et éventuellement une analyse qualitative.

a. Méthodes semi-quantitatives

i. Bandelettes urinaires

La réaction colorée de plage protéine des bandelettes urinaire répond au principe de l'erreur protéique du papier pH. En milieu tamponné à pH = 3, toute variation de couleur de l'indicateur coloré, le plus souvent le bleu de tétrabromophénol citraté, est due à la présence de protéines dans le liquide testé. Les fonctions aminées des protéines sont protonées et se lient au tétrabromophénol. Il en résulte l'apparition d'une couleur verte dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de protéines présentes dans l'urine testée. Le résultat du test est semi quantitatif, le plus souvent classé en : négatif, traces, 1+, 2+, 3+, 4+.

Ce test est plus sensible à l'albumine, cette dernière ayant un nombre de fonctions aminées protonées à pH 3 plus important que les globulines, les protéines de Bence Jones ou les mucoprotéines (Grauer, 1985; Maurey, 2005). Cependant, étant donnée l'absence de corrélation entre l'albuminurie et la protéinurie totale, des concentrations élevées de protéines urinaires pourraient ne pas être détectées par la bandelette si la concentration en albumine est inférieure à 0.1 g/L (James, 1978). La méthode manque donc d'exactitude.

Le seuil de détection des bandelettes urinaires varie selon les auteurs et les protocoles utilisés, mais se trouve aux alentours de 0.2 g/L pour l'albumine chez l'homme ainsi que chez les carnivores domestiques (DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985; Pages and Trouillet, 1990). Des protéinuries importantes, jusqu'à 10g/L peuvent être estimées par cette technique (Grauer, 1985). Cependant, les capacités du technicien, et en particulier son appréciation des

couleurs, sont des paramètres non négligeables de la qualité du résultat obtenu. Pour pallier ces limites, la lecture des bandelettes peut être automatisée avec des réflectomètres spécifiques.

ii. Tests par opacimétrie

Ces tests reposent sur la réaction de dénaturation des protéines urinaires par les acides tels que l'acide sulfosalicylique, l'acide nitrique ou l'acide trichloroacétique. Lors du mélange des réactifs, le pH baisse et la solubilité des protéines diminue. Il se forme des agrégats de protéines précipitées qui sont visualisées sous la forme de trouble. Les molécules ayant le point isoélectrique le plus élevé adsorbent le plus d'anions sur leurs charges positives et produisent ainsi un trouble supérieur à celui produit par une protéine de plus faible point isoélectrique (Ebina, 1979).

Lors des tests à l'acide sulfosalicylique (à 3 ou 5% selon les protocoles) ou à l'acide trichloroacétique (à 3%), les réactifs sont mélangés, et le trouble résultant est évalué par rapport à des courbes étalon, ou à d'autres critères tels que la possibilité de lire à travers le mélange (Gyure, 1977).

Lors des tests à l'acide nitrique, inspirés de la réaction de Heller, les réactifs ne sont pas mélangés, mais superposés. Quand la réaction est positive, il se forme à l'interface un disque blanchâtre floconneux d'épaisseur proportionnelle à la quantité de protéines précipitées. Il est probable que l'épaisseur du disque de protéines précipitées dépende aussi de la surface de contact entre l'acide et l'urine. Il est donc conseillé d'incliner le tube le plus horizontalement possible afin de limiter les risques de mélange et d'augmenter la surface de contact entre urines et acide.

Les seuils de détection de ces méthodes opacimétriques sont respectivement de 0.05 à 0.1g/L chez le chien et de 0.2 à 0.3 g/L chez l'homme pour le test à l'acide sulfosalicylique et celui à l'acide nitrique (DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985(Thysell, 1969). Des concentrations très fortes de protéines peuvent être évaluées, jusqu'à 50 g/L (Grauer, 1985) chez le chien. Ces méthodes semi quantitatives, en particulier le test à l'acide sulfosalicylique, sont des méthodes de dépistage adéquates (Fettman, 1989) en médecine humaine, et sont largement utilisées en médecine vétérinaire sans avoir fait l'objet d'une validation à notre connaissance.

b. Méthodes quantitatives

Les méthodes de quantification de la protéinurie mettent en jeu des réactions colorimétriques ou opacimétriques. Elles présentent le désavantage de nécessiter un spectrophotomètre, ce qui les rend inutilisables dans la plupart des cliniques vétérinaires

i. Méthodes colorimétriques

Différents réactifs, dont le rouge de pyrogallol (PR), le bleu brillant de Coomassie (CBB) et le rouge Ponceau, permettent le dosage des protéines urinaires. Le principe de base repose sur le déplacement du maximum d'absorption lors de la réaction entre les groupements aminés des protéines urinaires et le colorant.

En milieu acide, la réaction entre le rouge de pyrogallol combiné avec le molybdate et les protéines urinaire déplace le maximum d'absorption de 460nm à 598nm. L'ajout d'oxalate permet d'éliminer les faux négatifs éventuellement causés par la présence de substances chélatrices du molybdate. La réaction se développe lentement en quelques minutes et est stable durant 30 minutes (Le Bricon, 2001). L'absorbance, mesurée à 598 nm après la réaction, est proportionnelle à la concentration en protéines.

Lors de la réaction du Bleu Brillant de Coomassie avec les groupements aminés des protéines, le maximum d'absorption est déplacé de 465 à 595 nm (Rosenberg and Hostetter, 1992).

La méthode au bleu brillant de Coomassie permet la détection de protéinuries à partir de 0.025 g/L en biologie humaine (Rosenberg and Hostetter, 1992). La méthode au rouge pyrogallol présente un seuil de détection chez l'homme supérieur de 0.06 g/L. Actuellement, le rouge pyrogallol a majoritairement remplacé le bleu brillant de Coomassie dans les laboratoires de médecine humaine (Le Bricon, 2001).

ii. Méthodes opacimétriques

Ces méthodes largement abandonnées s'appuient sur la précipitation des protéines en milieu acide (cf I/ 3) a. ii). Les acides sulfosalicylique et trichloroacétique sont susceptibles d'être utilisés. Pour le dosage quantitatif, le trouble occasionné est quantifié par turbidimétrie.

iii. Comparaison des méthodes de dosage de la protéinurie

De nombreuses études menées chez l'homme ont comparé les différentes techniques de dosage des protéines urinaires.

Il a été montré que pour des concentrations protéiques faibles, la méthode par précipitation de l'acide trichloroacétique est légèrement moins sensible que la méthode au bleu brillant de Coomassie ou au rouge Ponceau (Dilena, 1988). Lorsque les concentrations urinaires sont élevées, la méthode au bleu brillant de Coomassie donne des résultats supérieurs à celle utilisant l'acide trichloroacétique et le rouge Ponceau (Barsanti and Finco, 1979). Ceci pourrait s'expliquer par l'absence de précipitation de certaines protéines avec l'acide trichloroacétique. Cependant, ces deux dernières méthodes sont recommandées comme test de routine pour la quantification de la protéinurie (McElderry et al., 1982), bien que la méthode au bleu brillant de Coomassie soit préférable (Barsanti and Finco, 1979).

Actuellement, le dosage au rouge pyrogallol est le plus utilisé dans les laboratoires de médecine humaine. Pourtant, cette technique présente de nombreuses limites : composition variable du réactif selon le fabricant, sensibilité limitée, choix difficile du calibrant, sous-estimation des chaînes légères et interférences avec les solutés colloïdaux (Le Bricon, 2001).

4) Facteurs pré analytiques et analytiques

a. Facteurs liés à l'échantillon

i. Mode de prélèvement

Les urines peuvent être prélevées par cystocentèse, par miction ou par cathétérisation de l'urètre. Le prélèvement par miction présente le désavantage de mettre en contact l'urine avec l'appareil génital externe et la peau. Il en résulte la présence de débris cellulaires et de bactéries dans l'urine récoltée. Malgré cet inconvénient, l'analyse physicochimique de ces urines est couramment admise. L'utilisation d'urine de milieu de miction est préférable. Les prélèvements par cystocentèse sont fréquemment contaminés par du sang induisant une hématurie microscopique (Maurey, 2005).

Chez le chien sain, aucune différence significative dans la concentration protéique urinaire selon le mode de prélèvement n'a été mise en évidence (Barsanti and Finco, 1979).

ii. Animal

Chez le chien, il n'existe pas de différence significative dans la concentration protéique urinaire en fonction du sexe si le prélèvement est effectué par sondage ou par cystocentèse. Cependant, l'excrétion protéique urinaire est supérieure chez le mâle si le prélèvement est effectué par miction (Barsanti and Finco, 1979). L'âge n'est pas un facteur de variation significatif (Biewenga et al., 1982).

L'existence d'une corrélation entre la concentration protéique urinaire et le poids corporel n'est pas admise par tous les auteurs (Barsanti and Finco, 1979; DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985).

iii. Stockage et conservation de urines

Une étude a montré que, chez l'homme, la congélation (7 jours à -20°C) de l'urine fausse le dosage des protéines urinaires : la protéinurie est sous-estimée d'environ 20%, parfois plus, par rapport à des urines fraîches ou réfrigérées. La réfrigération (7 jours à 4°C) n'a pas d'effet sur la valeur de protéinurie lors du dosage. Cette étude suggère un changement de conformation des protéines urinaires lors de la congélation, entraînant une précipitation partielle des protéines (Erman et al., 1988).

Une alcalinisation et une cristallisation sont fréquemment observées sur des urines dont le délai de conservation a été trop long. Cela peut interférer avec les méthodes de dépistage et de quantification des protéinuries (Maurey, 2005) mais n'a pas d'importance pratique puisque les analyses sont en général effectuées immédiatement après la collecte de l'échantillon.

iv. Protéines constituant l'urine

Tous les tests de dépistages ou de quantification de la protéinurie ne détectent pas les différentes protéines constitutives de l'urine de la même façon.

L'albumine est en général mieux détectée que les globulines. C'est le cas pour les bandelettes urinaires et la réaction à l'acide sulfosalicylique, ainsi que pour les dosages au rouge de pyrogallol ou au bleu brillant de Coomassie (DiBartola et al., 1980; Gyure, 1977). Cette dernière technique surestime même l'albumine (Rosenberg and Hostetter, 1992). D'autre part, il a été montré chez le chien, sur des échantillons de liquide céphalo-rachidien, que le rouge de pyrogallol sous-estimait légèrement mais significativement les globulines et l'albumine canine purifiées (Behr et al., 2003).

La détection des protéines de Bence Jones est très variable selon les techniques utilisées. Les bandelettes urinaires ne réagissent pas avec ces protéines (Grauer, 1985; Gyure, 1977), alors que les méthodes à l'acide sulfosalicylique (Grauer, 1985; Gyure, 1977), au bleu brillant de Coomassie, au rouge de pyrogallol ou à l'acide trichloroacétique – rouge Ponceau peuvent plus ou moins bien les doser. Chez l'homme, la protéinurie de Bence Jones est sous-estimée d'environ 30% par le dosage au rouge de pyrogallol. La méthode à l'acide trichloroacétique – rouge Ponceau est plus sensible à ces protéines, bien qu'une sous-estimation de 10% subsiste (Grauer, 1985; (Le Bricon et al., 1998).

Une étude menée chez l'homme a mis en évidence l'existence de protéines solubles dans l'acide sulfosalicylique, plus abondantes chez les patients atteints de tumeurs malignes. Ces protéines sont mesurées par le bleu brillant de Coomassie. L'analyse qualitative par électrophorèse a permis de constater que 2 de ces protéines sont l' α 1 glycoprotéine acide et la protéine de Tamm Horsfall (Shiba et al., 1985).

v. Densité urinaire

La densité urinaire dépend du nombre de molécules présentes dans l'urine, de leur taille et de leur masse (Reine and Langston, 2005). Elle est mesurée à l'aide d'un réfractomètre, et l'intervalle des valeurs usuelles est compris entre 1.015 et 1.045 chez le chien (Maurey, 2005).

Il est possible qu'une protéinurie pathologique ne soit pas détectée par les méthodes de dépistage de routine dans une urine de très faible densité en raison de la forte dilution des protéines (Grauer, 1985). Inversement, dans des urines fortement concentrées, l'interprétation d'une concentration protéique urinaire dans les valeurs usuelle doit se faire avec précaution : si elle est inférieure à 0.65 g/L, le chien est considéré comme « normal » quelle que soit la densité urinaire mais si la densité urinaire est supérieure à 1.030, une concentration en

protéine comprise entre 0.65 et 2 g/L doit être considérée comme douteuse car pouvant être due soit à une protéinurie pathologique, soit à la très forte concentration des urines (Barsanti and Finco, 1979).

vi. pH urinaire

Chez les carnivores domestiques, le pH urinaire est physiologiquement compris entre 5.5 et 7 (Maurey, 2005). Un pH élevé peut être du à une mauvaise conservation des échantillons.

Il est reconnu que les bandelettes sont sensibles au pH de l'urine : une urine alcaline peut occasionner des faux positifs et une urine acide des faux négatifs (Grauer, 1985). Cependant, une étude récente menée chez le chien n'a mis en évidence aucun faux positif dans des urines très alcalines (Welles et al., 2006). Ceci pourrait s'expliquer par l'amélioration de la technique depuis les premières études menées à ce sujet.

De la même manière, des urines très alcalines peuvent causer des faux négatifs lors de méthodes mettant en jeu des acides, telle que le test à l'acide sulfosalicylique (DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985).

vii. Turbidité de l'urine

Les urines des carnivores domestiques sont physiologiquement limpides. Un trouble peut être occasionné par la présence de cristaux, de mucus, de pus, de bactéries ou de débris cellulaires. Cela est susceptible d'interférer avec le dosage des protéines, en particulier par les méthodes opacimétriques (Grauer, 1985) mais non avec la bandelette (Grauer, 1985; Thysell, 1969).

viii. Hématurie et inflammation du tractus urinaire

Lors d'hématurie ou de signes d'inflammation du tractus urinaire, l'interprétation de la protéinurie devient délicate. Il faut rester prudent avant d'attribuer une réaction positive à l'un ou l'autre de ces processus pathologiques.

L'hémoglobine ne donne une couleur rouge aux urines que lorsque sa concentration est supérieure à 0.1 à 0.5 g/L dans une urine limpide de faible densité (Jansen and Lumsden, 1985; Le Bricon, 2001).

Les bandelettes détectent l'hémoglobine sur la plage « protéine » à partir d'une concentration de 0.05 g/L (alors que la plage « sang » détecte l'hémoglobine à partir de 0.001 g/L). Le test à l'acide sulfosalicylique est moins sensible et détecte l'hémoglobine libre ou dans les hématies lorsque sa concentration est supérieure à 0.4 g/L, c'est-à-dire lors d'hématurie macroscopique (Jansen and Lumsden, 1985). Le bleu brillant de Coomassie et le rouge de pyrogallol reconnaissent bien l'hémoglobine libre mais une majoration significative de la protéinurie totale n'est observée qu'au-delà d'environ 0.03 g/L d'hémoglobine libre (Le Bricon, 2001).

Bien qu'il ait été montré qu'une hématurie importante pouvait engendrer des faux positifs par addition de protéines plasmatiques dans les urines (Bagley et al., 1991), cette contamination protéique n'est significative qu'en cas de saignement macroscopique massif avec les éléments biologiques suivants : 3+ de « sang » à la bandelette, important culot d'hématies, et plus de 5.10^6 hématies /mL à la cytologie (Le Bricon, 2001). De ce fait, une augmentation de la quantité de protéines dans les urines supérieure à 1g/l dans une urine non pigmentée ou associée à une hémoglobinurie inférieure à 3+ indique une protéinurie vraie ne pouvant être attribuée à une hémorragie des voies urinaires (Vaden et al., 2004).

Bien qu'en cas de signes cytologiques d'inflammation ou d'infection urinaire, une augmentation de la protéinurie ne puisse être utilisée pour diagnostiquer une protéinurie rénale (Bagley et al., 1991), il faut prendre des précautions avant d'attribuer cette augmentation à l'inflammation ou à l'infection urinaire : les causes glomérulaires et préglomérulaires ne doivent pas être exclues d'emblée (Vaden et al., 2004; Welles et al., 2006). En effet, une étude a montré qu'il n'y a pas de différence significative entre l'excrétion protéique urinaire sur 24h d'un chien sain présentant un sédiment urinaire actif et celle d'un chien sain sans sédiment actif (DiBartola et al., 1980).

ix. Autres métabolites urinaires

A la réaction de Heller, des faux positifs peuvent être observés lorsque les urines sont riches en urée. Il se forme alors à l'interface un précipité cristallin adhérent aux parois du tube. Ceci s'observe lors d'états cataboliques intenses (Pages and Trouillet, 1990; Thysell,

1969). La présence de mucoprotéines, d'acide urique en grande concentration par exemple peut aussi provoquer des réactions faussement positives à la réaction de Heller et au test à l'acide sulfosalicylique (Thysell, 1969).

x. Constituants iatrogènes

Certaines molécules entrant dans la composition de médicaments peuvent interférer avec le dépistage ou la mesure de la protéinurie, provoquant majoritairement des faux positifs. Certains antibiotiques (pénicillines, céphalosporines, aminoglycosides, sulfonamides...), le tolbutamide, les salicylates, les produits de contrastes iodés, les solutés colloïdaux ou encore le chlorure de benzylkonium ont été incriminés ((DiBartola et al., 1980; Rosenberg and Hostetter, 1992; Russo, 1986; Thysell, 1969). D'autres molécules ajoutées accidentellement ou non à l'échantillon semblent aussi jouer un rôle : le thymol (conservateur urinaire), les ammoniums quaternaires ou la chlorhexidine... (Grauer, 1985; Gyure, 1977; Rosenberg and Hostetter, 1992).

Cependant, une étude menée chez l'homme, sur les effets de différentes molécules (pénicilline G, ampicilline, méthicilline, cefoxitine, cefazoline, gentamicine, co-trimoxazole, phentiazines, glibenclamide et acetazolamide) sur les estimation de la concentration urinaire en protéine (bandelette, coagulation à la chaleur et à l'acide acétique, dosage à l'acide sulfosalicylique, à l'acide trichloroacétique, et au rouge Ponceau), n'a mis en évidence qu'une seule interférence significative : la gentamycine lors du dosage au rouge Ponceau (Yosselson-Superstine and Sinai, 1986).

b. Facteurs liés à la technique employée pour le dosage

i. Opérateur

Les capacités techniques et visuelles du technicien en charge du test sont déterminantes pour la qualité des résultats. Le manipulateur doit maîtriser la technique employée. Son appréciation des couleurs peut interférer avec la lecture des bandelettes (Thysell, 1969). L'automatisation de la lecture permet de pallier cette variabilité. Il en est vraisemblablement de même pour l'interprétation de la turbidité avec l'acide sulfosalicylique, mais cela n'a pas été démontré à notre connaissance.

ii. Température

La température du laboratoire est susceptible d'avoir un effet sur les réactions chimiques mises en jeu lors des dépistages de protéinuries. En particulier, il a été montré pour les méthodes opacimétriques que la turbidité résultante variait avec la température pour des concentrations en protéines et en acide données (Ebina, 1979). Il est donc conseillé de maintenir une température constante dans le laboratoire.

iii. Choix des réactifs

L'intensité de la réaction peut dépendre de la concentration des réactifs. Il a, par exemple, été montré que pour la méthode turbidimétrique à l'acide sulfosalicylique, à une concentration protéique donnée, la turbidité variait avec la concentration en acide. Jusqu'à une concentration en acide sulfosalicylique variant avec la nature de la protéine dosée (0.8 mol/L pour la lactoglobuline et la pepsine, 0.1 mol/L pour la plupart des autres protéines dont l'albumine), la turbidité augmente avec la concentration du réactif. Ensuite, la turbidité décroît avec l'augmentation de la concentration de l'acide, jusqu'à disparaître (Ebina, 1979).

iv. Stockage des réactifs

Les bandelettes urinaires doivent être stockées au sec : le résultat obtenu peut être faussement négatif lors de l'exposition de la bandelette à l'humidité (Russo, 1986).

v. Temps d'incubation

Le temps de contact entre les réactifs peut influencer le résultat obtenu. Ainsi, la turbidité lors de test à l'acide sulfosalicylique varie avec le temps d'incubation (Ebina, 1979). Le résultat de la bandelette urinaire peut être faussement négatif lors de contact prolongé avec l'urine. Ceci s'explique par le lessivage des réactifs imprégnant le papier filtre de la plage concernée (Russo, 1986; Thysell, 1969).

Les méthodes de dépistage, ou tests semi-quantitatifs, étant les principaux moyens mis à la disposition du vétérinaire praticien pour mettre en évidence des protéinuries chez leurs patients, il est nécessaire de déterminer leur valeur diagnostique, d'autant que ces tests n'ont

pas fait l'objet de validation chez les carnivores domestiques, à notre connaissance. Le but de cette étude est de comparer ces différents tests à un dosage quantitatif de la concentration protéique urinaire, afin de valider ou non l'utilisation de ces tests de dépistages chez le chien.

II/ MATERIEL ET METHODE

Il s'agit d'une étude prospective qui s'est déroulée à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) entre avril et juillet 2006.

1) Recueil des échantillons

a. Animaux inclus dans l'étude

Les animaux inclus dans cette étude étaient des chiens présents sur le site de l'ENVT entre avril 2006 et juillet 2006. Le seul critère de sélection retenu a été le volume d'urine disponible lorsque toutes les analyses demandées par ailleurs avaient été effectuées. Ces animaux, en bonne santé ou non, étaient présentés aux cliniques de l'ENVT pour une consultation ou une hospitalisation, ou appartenaient au service de physiologie de l'ENVT ou bien au club cynophile attaché à l'ENVT.

Lors du recueil des urines, les commémoratifs et l'anamnèse de l'animal ont été notés : race, sexe, âge, traitement en cours (en fonction des renseignements fournis par le propriétaire) et motif de consultation.

b. Méthodes de recueil des urines

Les urines ont été recueillies par différentes méthodes selon les patients. Des cystocentèses échoguidées ou non ont été réalisées chez les animaux dont la démarche diagnostique nécessitait un tel mode de prélèvement. Chez les autres animaux, les urines ont été recueillies par miction spontanée, dans des barquettes en plastique.

Le volume d'urine recueilli a varié de 1 à 6mL en fonction de la diurèse du patient. Chaque animal a été prélevé au maximum deux fois : les deux prélèvements étaient alors espacés d'au moins 4 heures. Les prélèvements ont été identifiés, le mode, la date et l'heure de prélèvement ont été notés. Le volume de spécimen étant parfois trop faible, toutes les analyses n'ont pas pu être faites dans tous les cas.

c. Traitement et conservation des échantillons

Les échantillons d'urine ont été conditionnés dans des tubes à hémolyse en plastique de 6mL et centrifugés (Universal 16A, Hettich, VWR, Fontenay-sous-Bois) à 1500 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant a été recueilli dans des tubes en plastique de 6mL et conservé au réfrigérateur à +4°C jusqu'à la réalisation des analyses. La durée de stockage a été limitée à 72h au maximum. Avant toute analyse, les échantillons ont été ramenés à la température du laboratoire.

2) Analyses préliminaires des échantillons

a. Evaluation des critères macroscopiques

Les critères macroscopiques suivants ont été notés : le volume d'urine constituant l'échantillon analysé, la couleur et la turbidité de l'urine centrifugée.

b. Mesure de la densité urinaire

Une goutte d'urine centrifugée a été déposée sur le prisme d'un réfractomètre (SPR T2, Atago CO., Centravet, Pluduno) préalablement étalonné avec de l'eau distillée, et la densité a été relevée sur la plage de lecture correspondante.

3) Dosage des protéines urinaires

La quantification des protéines urinaires a été effectuée par un dosage manuel spectrophotométrique au moyen d'un kit commercial de rouge de pyrogallol. Chaque dosage a été réalisé deux fois.

a. Composition des réactifs

Le dosage des protéines au rouge de pyrogallol a été effectué au moyen d'un coffret de réactifs disponible dans le commerce (Coffret Protéines Urinaires, SOBIODA, Montbonnot, Référence 1200.020). Ce coffret comprend :

- 200 mL de réactif au rouge de pyrogallol tamponné à pH 2.5 contenant 15 mmol de rouge de pyrogallol et 10 mmol de molybdate de sodium,
- 5 mL d'urine de contrôle (URITROL) contenant de l'albumine et des globulines humaines dans de l'urine lyophilisée humaine,
- 3 mL de calibrant (URICAL) constitué d'urine liquide humaine stabilisée (issue d'un pool de donneurs malades ayant une concentration endogène en protéines de 1 g/L) et d'un conservateur : l'azide de sodium.

b. Conservation des réactifs

Le réactif contenant le rouge de pyrogallol a été conservé à température ambiante jusqu'à la date de péremption indiquée par le fabricant.

Après reconstitution avec 5 mL d'eau distillée, l'urine de contrôle a été répartie en aliquotes de 100 µL congelées à -20°C au maximum deux mois selon les recommandations du fabricant. Le calibrant (URICAL Coffret Protéines Urinaires, SOBIODA, France, Référence 1200.020) a été conservé à 4°C au maximum un mois selon les recommandations du fabricant.

c. Réalisation du dosage

Dans des cuves jetables contenant 750 µL de réactif ont été ajoutés, après mise à la température ambiante et homogénéisation:

- 10 µL d'eau distillée pour constituer le « blanc »
- ou 10 µL de calibrant pour constituer l' « étalon »
- ou 10 µL d'urine de contrôle pour constituer le « contrôle positif »
- ou 10 µL de l'urine à tester.

Après homogénéisation par retournement et incubation de 10 minutes à température ambiante, l'absorbance A à 598 nm a été mesurée au moyen d'un spectrophotomètre (S 500, Secomam, Sarcelles). La concentration en protéines de l'échantillon a été déterminée par la formule suivante :

$$\text{Protéinurie (g/L)} = (A \text{ échantillon} - A \text{ blanc}) / (A \text{ étalon} - A \text{ blanc}).$$

Le seuil de détection annoncé par le fabricant est de 0.060 g/L et la limite de linéarité de 1.5 g/L. Pour des concentrations urinaires en protéines supérieures à 1.5 g/L, une dilution de l'urine dans du NaCl à 0.9 % a été effectuée. Le facteur de dilution a été pris en compte dans le résultat final.

Les caractéristiques métrologiques n'ont pas été étudiées pour l'urine de chien, mais une étude réalisée sur du liquide céphalorachidien (Behr et al., 2003) a montré que l'imprécision sur les mesures d'un dosage au rouge pyrogallol était de 4.4%.

d. Contrôle de la qualité

Lors de chaque série de dosage, l'urine de contrôle préalablement décongelée a été dosée deux fois. La concentration de l'urine de contrôle annoncée par le fabricant est de 0.37 ± 0.05 g/L.

4) Evaluation semi-quantitative de la protéinurie

a. Bandelette urinaire

L'évaluation semi-quantitative de la protéinurie ainsi que d'autres tests semi-quantitatifs (glycosurie, bilirubinurie, présence de corps cétoniques, activité peroxydasique, pH, urobilinogénurie, présence de nitrites et de leucocytes) ont été réalisés par dépôt d'une goutte d'urine sur chaque plage de la bandelette urinaire (URS-10, Teco Diagnostics, Anaheim CA 92807, USA). La lecture de la bandelette a également été effectuée avec un automate (Clinitek 50, Bayer), puis, pour la plage protéine, visuellement grâce à l'échelle de couleur fournie par le fabricant. Le réflectomètre n'a pas été mis au point pour les bandelettes utilisées, mais le fabricant a indiqué qu'il pouvait être utilisé.

b. Test de précipitation à l'acide sulfosalicylique

La méthode utilisée pour le test turbidimétrique de précipitation à l'acide sulfosalicylique est inspirée de celle décrite chez l'homme par WL Gyure (Gyure, 1977).

Dans un tube à hémolyse en plastique transparent, 3 mL d'acide sulfosalicylique à 3% ont été ajoutés à 1 mL d'urine. Le tube a ensuite été fermé par un bouchon en plastique, puis homogénéisé par retournement dix fois de suite. Le tube a été laissé à incuber pendant cinq minutes à température ambiante.

L'évaluation de la protéinurie s'est effectuée grâce à la grille suivante :

Négatif : Aucun trouble visible.

Trace : Trouble uniquement si l'échantillon est placé sur le trajet d'un rayon lumineux.

1+ : Trouble visible et lecture aisée d'un texte en lettres noires sur fond blanc.

2+ : Trouble visible et lecture difficile d'un texte en lettres noires sur fond blanc.

3+ : Trouble visible et lecture impossible d'un texte en lettres noires sur fond blanc.

4+ : Rien de visible à travers le tube.

Les graduations 0 et « Trace » ont été regroupées en une seule graduation 0, du fait de la difficulté à les distinguer de manière reproductible.

c. Test modifié de Heller à l'acide nitrique

Dans un tube à hémolyse en plastique transparent contenant 1.5 mL d'urine, et incliné de façon à être le plus horizontal possible, 1.5 mL d'acide nitrique à 68% ont été ajoutés. L'addition d'acide devait se faire délicatement afin d'éviter le mélange des phases. L'acide nitrique, étant de densité plus élevée que l'urine, longeait la paroi du tube au contact de l'urine, et se retrouvait au fond du tube. Le tube a alors été redressé à la verticale, et l'épaisseur du disque floconneux blanchâtre correspondant aux protéines urinaires précipitées par l'acide a été mesurée à la règle graduée, devant un fond noir.

Une autre variante de cette méthode a aussi été testée. Le tube à hémolyse contenant alors initialement 1.5 mL d'acide nitrique à 68% a été incliné le plus horizontalement possible, et 1.5 mL d'urine a alors été ajouté délicatement. L'urine se répartissait alors en

surface de l'acide nitrique, et l'anneau de précipité ainsi formé a alors été mesuré devant un fond noir.

III/ RESULTATS

1) Dosage au rouge de pyrogallol

a. Contrôle de qualité

Un échantillon de contrôle a été dosé en double à 17 reprises au cours de l'étude. Les concentrations moyennes en protéines de ces contrôles étaient comprises entre 0.34 et 0.40 g/L, avec une moyenne de 0.37 g/L. La valeur cible annoncée étant de 0.37 ± 0.05 g/L, toutes les mesures effectuées sur les échantillons d'urine de contrôle étaient donc situées dans l'intervalle d'acceptabilité indiqué par le fabricant (Figure 2).

Les écarts entre les deux dosages d'une même série de cet échantillon de contrôle sont restés faibles, avec un maximum de 0.02 g/L. L'imprécision inter-séries ($CV = SD/m$) des moyennes des duplicatas a ainsi été de 3,0 %.

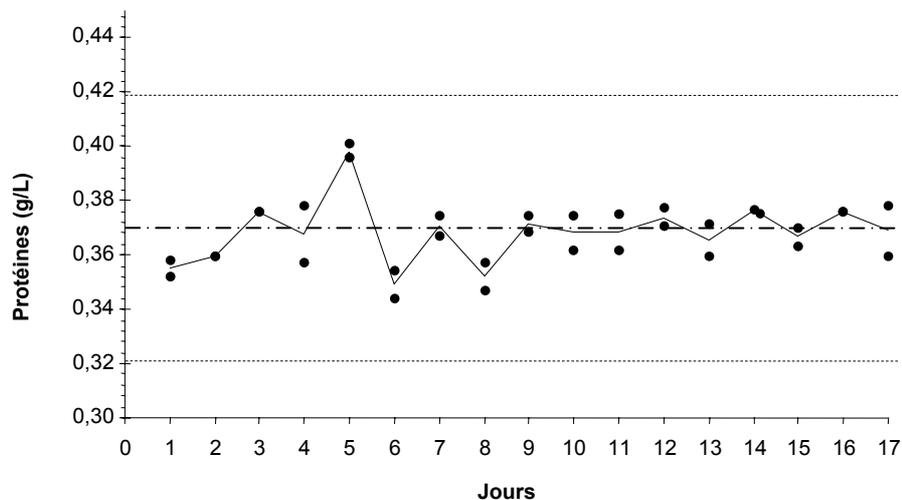


Fig. 2 : Diagramme de Levey-Jennings du contrôle de qualité de la mesure de la concentration de protéines dans l'urine. Toutes les analyses ont été effectuées deux fois ; la courbe est celle de la moyenne des résultats. Les lignes pointillées représentent la cible donnée par le fabricant et les limites d'acceptabilité des résultats.

Sur les 151 urines de chien analysées, l'examen des écarts entre duplicatas a montré que ceux-ci augmentent en valeur absolue et diminuent en pourcentage avec la concentration mesurée (Figures 3 et 4). Ces écarts n'ont pas dépassé 0.07 g/L pour toute concentration inférieure ou égale à 1 g/L. L'imprécision intra-séries a été légèrement supérieure pour les

concentrations faibles (4,6% lorsque la concentration était < 0.5 g/L) que pour les concentrations plus fortes (3.1% pour les concentrations > 0.5 g/L).

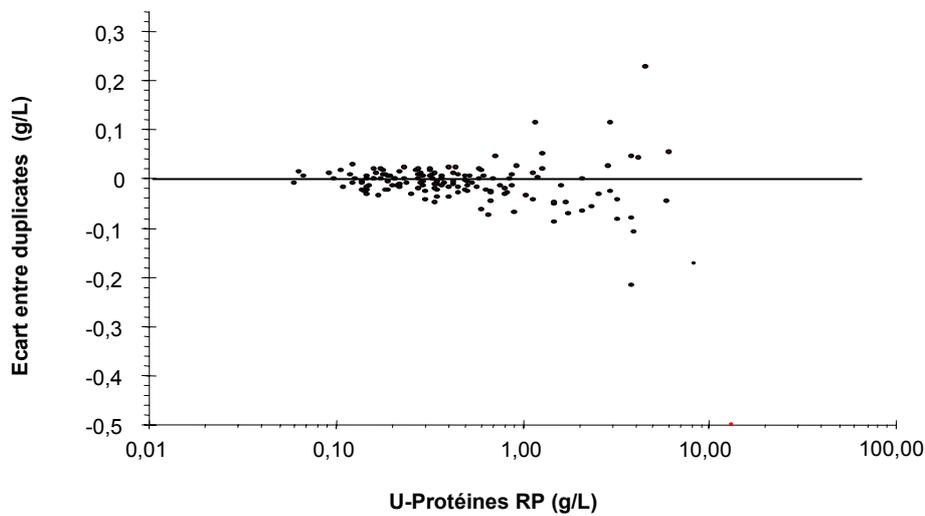


Fig. 3 : Répartition des écarts absolus (en g/L) entre les duplicates en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol.

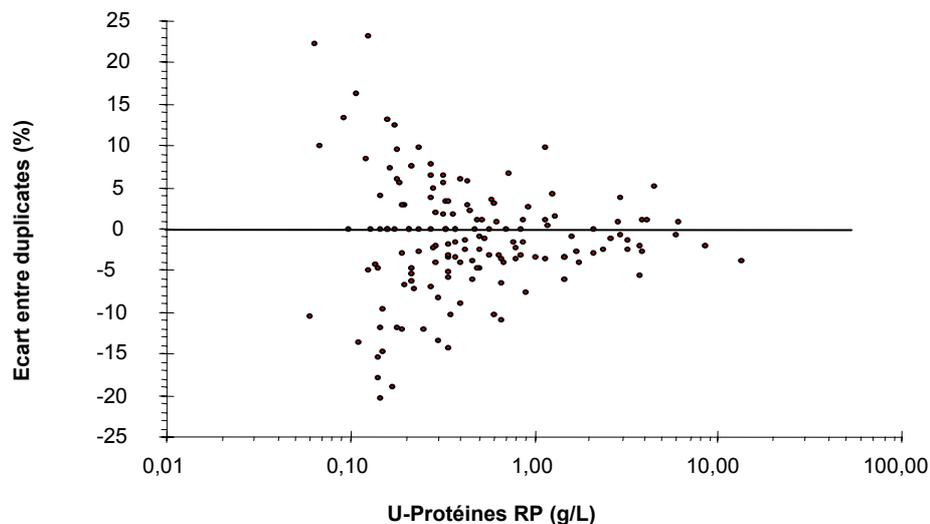


Fig. 4 : Répartition des écarts relatifs (%) entre les duplicates en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol.

b. Résultats du dosage des protéines urinaires

Cent cinquante et un échantillons d'urine ont été dosés en double. Les valeurs de protéinurie moyenne mesurées ont varié de 0.06 à 13.4 g/L, mais la majorité des valeurs était inférieure à 1 g/L : 119 cas sur 151 soit 78.8% des mesures (Figure 5). La moyenne globale des protéinuries a été de 0.94 g/L.

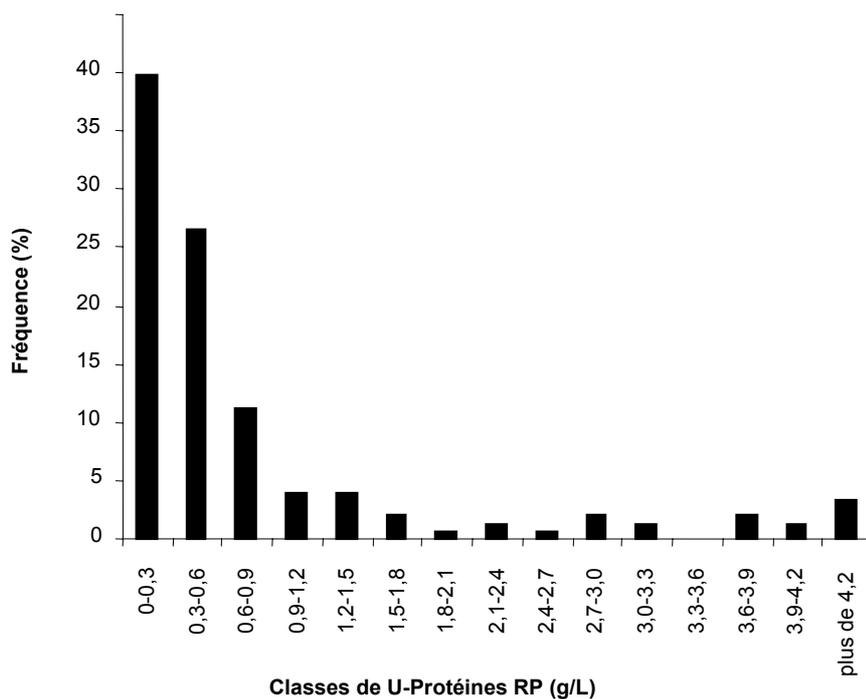


Fig. 5 : Répartition des 151 échantillons testés en fonction de la protéinurie mesurée par la technique au rouge de pyrogallol

La densité moyenne était de 1.028, variant de 1.004 à 1.055. Il n'avait que peu d'anomalies de la composition chimique de l'urine.

2) Comparaison du test semi-quantitatif de la bandelette urinaire et du dosage quantitatif au rouge de pyrogallol

a. Comparaison des lectures visuelle et automatique sur la bandelette urinaire

Sur les 151 urines testées, les évaluations semi-quantitatives ont varié de 0 à 4+ pour la lecture visuelle, et de 0 à 3+ pour la lecture automatique (Figure 6).

Pour 62 cas, l'évaluation visuelle de la protéinurie a été égale à l'évaluation automatique. Dans la majorité des cas (81 cas sur 151), la lecture automatique a donné un résultat supérieur à celui de la lecture visuelle. Cependant, pour de fortes concentrations en protéines urinaires (supérieure à 3+), on a constaté que la lecture visuelle donnait des résultats toujours égaux voire supérieurs à ceux de la lecture automatique (Figure 6).

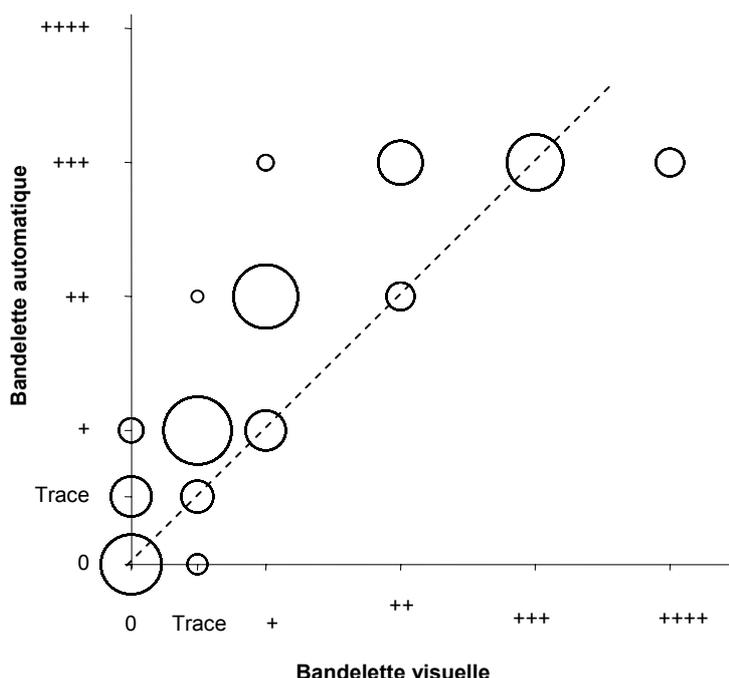


Fig. 6 : Comparaison des résultats d'évaluation de la protéinurie à la bandelette en lecture visuelle et automatique. La surface des disques est proportionnelle au nombre d'échantillons d'une abscisse et d'une ordonnée donnée.

b. Comparaison des lectures visuelle et automatique de la bandelette et du dosage quantitatif par la technique au rouge de pyrogallol

Sur les 151 échantillons testés, on a pu constater que l'évaluation semi-quantitative à l'aide de la bandelette augmentait en fonction de la protéinurie mesurée au rouge de pyrogallol. Cependant, pour chaque graduation semi-quantitative (de 0 à 4+ pour la lecture visuelle et de 0 à 3+ pour la lecture automatique), la dispersion des valeurs mesurées a été importante et on a pu constater une superposition des différentes classes de graduations semi-quantitatives pour une concentration en protéines donnée (Figures 7 et 8).

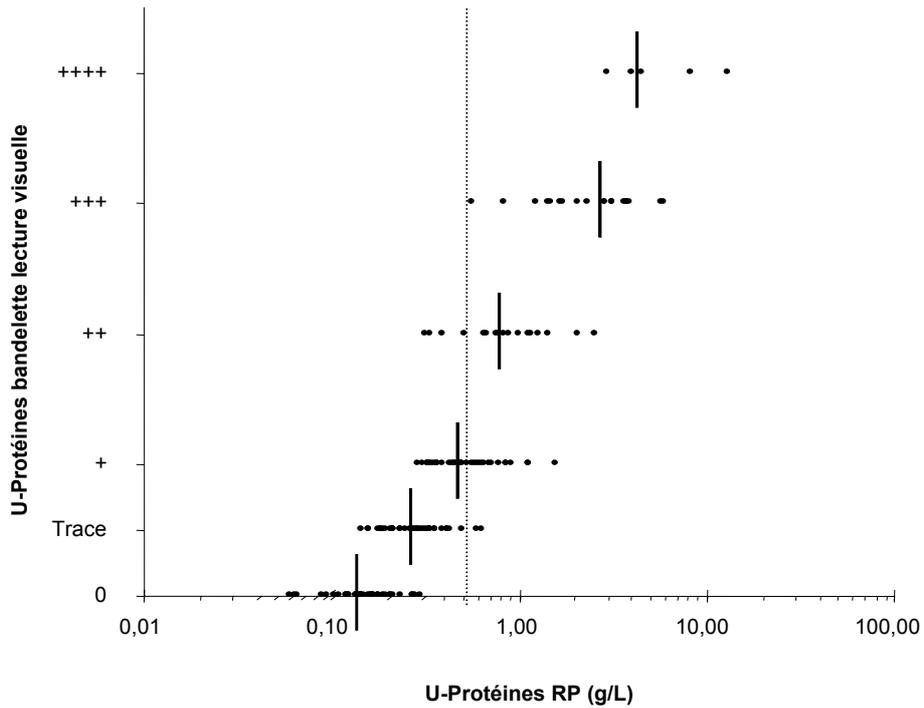


Fig. 7 : Comparaison des résultats de la lecture visuelle de la bandelette urinaire et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 151 cas. Les barres verticales représentent la médiane pour chaque graduation semi-quantitative. La ligne verticale en pointillés représente la limite physiologique de la concentration en protéine urinaire chez le chien, établie à 0.50 g/L (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976)

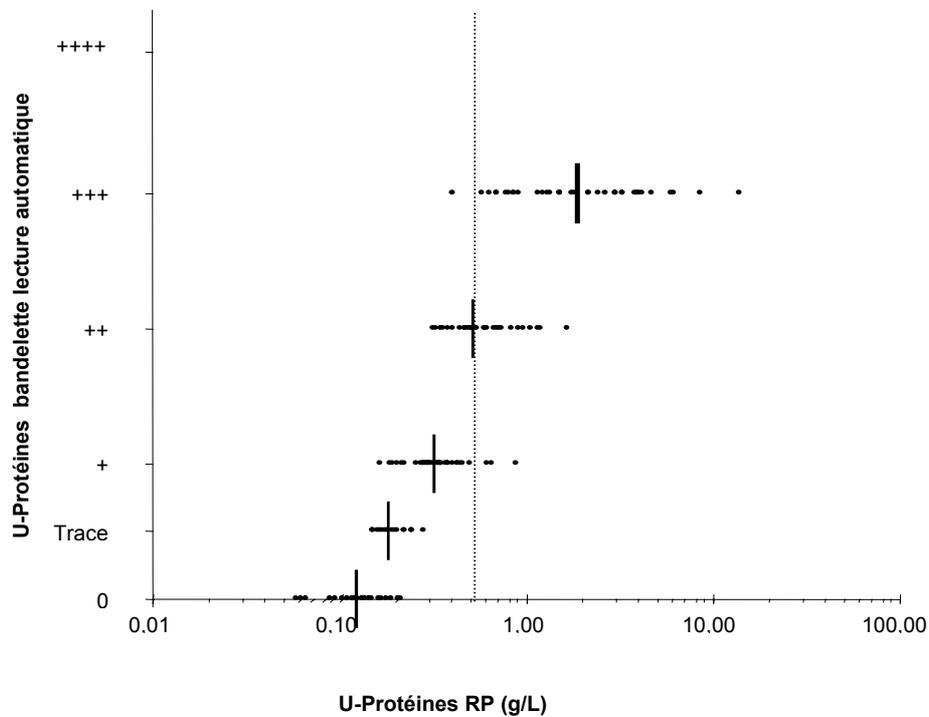


Fig. 8 : Comparaison des résultats de la lecture automatique de la bandelette urinaire et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 151 cas. Les barres verticales représentent la médiane pour chaque graduation semi-quantitative. La ligne verticale en pointillés représente la limite physiologique de la concentration en protéine urinaire chez le chien, établie à 0.50 g/L (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976)

Pour tester l'efficacité des bandelettes, on a compté le nombre de cas où la mesure quantitative était en accord avec l'évaluation semi-quantitative à la bandelette en lecture visuelle et automatique (Tableau 2). Pour ce faire, on a tenu compte de l'imprécision de la mesure au rouge de pyrogallol : par exemple, un résultat de concentration 0.29 g/L obtenu avec cette technique dont le coefficient de variation estimé préalablement (III/1)a.) était de 3% n'a pas été considéré comme analytiquement différent de 0.3 g/L.

Lors de la lecture visuelle, 111 échantillons sur 151 ont été bien classés (16 % de faux positifs et 11 % de faux négatifs) contre 95 pour la lecture automatique (37 % de faux positifs). On a pu noter que les faux positifs ont été plus nombreux lors de lecture automatique. Les faux négatifs ont été principalement observés lors de protéinurie basse (<1+) et les faux positifs lors de protéinurie élevée (>1+). De plus, il est à noter que les 5 échantillons évalués à 4+ lors de lecture visuelle ont tous été des faux positifs et qu'il n'a été mis en évidence aucun faux négatif lors de lecture automatique de la bandelette.

Tabl. 2 : Répartition et classement des valeurs mesurées par la technique au rouge de pyrogallol en fonction de l'évaluation semi-quantitative à l'aide de la bandelette urinaire.

| Estimation de la bandelette | | 0 | Trace | + | ++ | +++ | ++++ |
|---|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| Seuil indiqué par le fabricant (g/L) | | 0 - 0.3 | 0 - 0.3 | 0.3 - 1 | 1 - 3 | 3 - 20 | >20 |
| Valeur mesurée (g/L) | Visu. | | | | | | |
| | moyenne | 0.16 | 0.30 | 0.59 | 1.00 | 2.79 | 6.70 |
| | étendue | 0.06 – 0.30 | 0.15 – 0.64 | 0.29 – 1.60 | 0.33 – 2.58 | 0.57 – 6.03 | 2.97 – 13.40 |
| | Auto. | | | | | | |
| | moyenne | 0.14 | 0.19 | 0.34 | 0.64 | 2.68 | - |
| | étendue | 0.06 – 0.22 | 0.15 – 0.28 | 0.16 – 0.87 | 0.32 – 1.60 | 0.40 – 13.40 | - |
| Nombre de faux positifs | Visu. | - | - | 0/36 | 10/17 | 9/19 | 5/5 |
| | Auto. | - | - | 8/41 | 25/30 | 23/38 | 0/0 |
| Nombre de faux négatifs | Visu. | 0/37 | 13/37 | 3/36 | 0/17 | 0/19 | - |
| | Auto. | 0/25 | 0/17 | 0/41 | 0/30 | 0/38 | - |

Visu. : Lecture visuelle

Auto. : Lecture automatique

3) Evaluation par le test de précipitation à l'acide sulfosalicylique

Sur les 147 échantillons testés, l'évaluation par le test à l'acide sulfosalicylique a augmenté en fonction de la protéinurie dosée au rouge de pyrogallol. De même que pour la bandelette urinaire, la dispersion des valeurs mesurées a été importante et on a pu constater une superposition des différentes classes de graduations semi-quantitatives pour une protéinurie donnée (Figures 9).

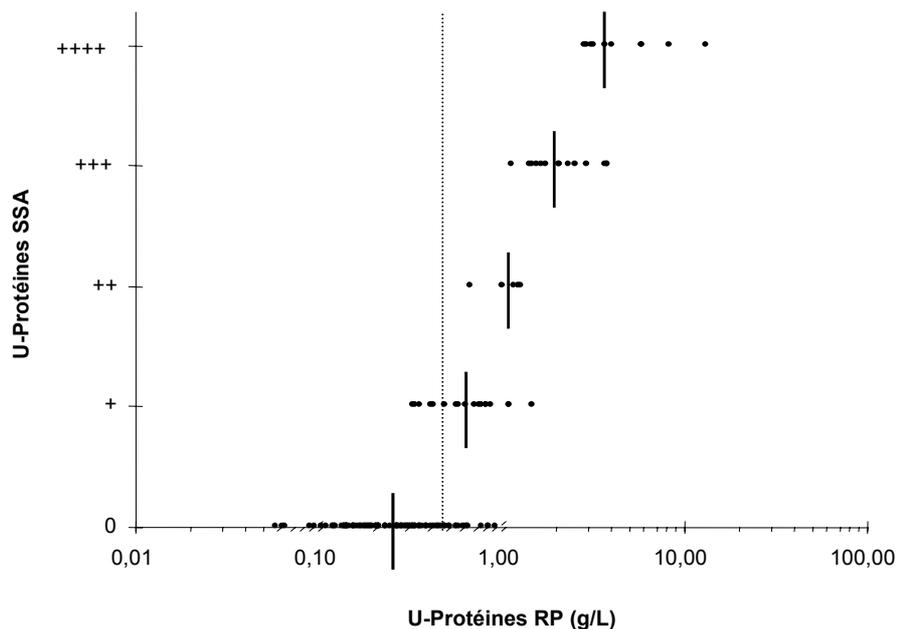


Fig. 9 : Comparaison des résultats du test à l'acide sulfosalicylique et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 147 cas. Les barres verticales représentent la médiane pour chaque graduation semi-quantitative. La ligne verticale en pointillés représente la limite physiologique de la concentration en protéine urinaire chez le chien, établie à 0.50 g/L (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976).

Pour tester l'efficacité du test à l'acide sulfosalicylique, on a dénombré les cas où la mesure quantitative était en accord avec l'évaluation semi-quantitative telle que recommandée en biologie humaine, en tenant compte de l'imprécision de la mesure au rouge de pyrogallol (cf III/1)a.), de la même manière que pour la bandelette urinaire (Tableau 3).

Lors de la lecture visuelle, 36 échantillons sur 147 ont été bien classés (10 % de faux positifs et 65 % faux négatifs). Les faux négatifs ont été principalement observés lors de protéinurie basse (<2+) et les faux positifs lors de protéinurie élevée (>2+). De plus, il est notable que le nombre de faux négatifs par rapport au seuil fixé par la littérature est

particulièrement élevé (93 faux négatifs sur 100 cas testés comme négatifs à l'acide sulfosalicylique).

Tabl. 3 : Répartition et classement des valeurs mesurées par la technique au rouge de pyrogallol en fonction de l'évaluation semi-quantitative au test à l'acide sulfosalicylique.

| Estimation du test SSA | 0 | + | ++ | +++ | ++++ | |
|--|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Seuil indiqué par la littérature (g/L) | 0 - 0.1 | 0.1 – 1.0 | 1.0 – 2.5 | 2.5 – 4.5 | >4.5 | |
| Valeur mesurée (g/L) | moyenne | 0.31 | 0.71 | 1.09 | 2.34 | 5.39 |
| | étendue | 0.06 – 0.94 | 0.34 – 1.48 | 0.68 – 1.29 | 1.16 – 3.91 | 2.90 – 13.40 |
| Nombre de faux positifs | - | 0/18 | 1/5 | 8/14 | 6/10 | |
| Nombre de faux négatifs | 93/100 | 3/18 | 0/5 | 0/14 | - | |

4) Evaluation par le test modifié de Heller à l'acide nitrique

a. Comparaison des tests de Heller N1 et N2

Sur les 120 échantillons qui ont été testés à la fois par les méthodes N1 (l'acide nitrique est déposé en premier) et N2 (l'urine est déposée en premier), 81 ont donné un résultat identique quelle que soit la méthode employée (Figure 10). Lorsque les résultats étaient différents, la méthode N2 a donné des résultats supérieurs à la méthode N1 dans 26 cas sur 39.

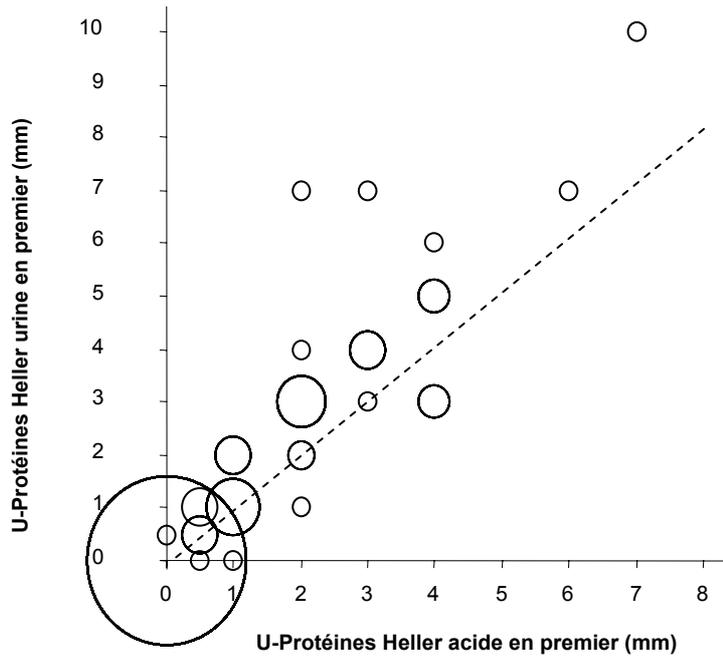


Fig. 10 : Comparaison des résultats d'évaluation de la protéinurie à la réaction de Heller selon si l'acide ou l'urine est déposé en premier. La surface des disques est proportionnelle au nombre d'échantillons d'une abscisse et d'une ordonnée données.

b. Comparaison des tests de Heller N1 et N2 et du dosage quantitatif au rouge de pyrogallol

Sur les 123 (142) urines testées avec la méthode de Heller N1 (N2), l'épaisseur du disque de protéines précipitées a varié de 0 à 7 mm (0 à 10mm) et a globalement augmenté avec la protéinurie mesurée au rouge de pyrogallol (Figures 11 et 12). La dispersion des valeurs mesurées a été forte : par exemple, pour les 78 cas où la réaction de Heller N1 (acide en premier) était négative les protéinuries mesurées ont varié de 0.06 à 0.80 g/L. De même que pour les précédents tests semi-quantitatifs, les gammes d'évaluation de la protéinurie pour les deux méthodes N1 et N2 se sont superposées pour une même mesure de la concentration en protéines par le rouge de pyrogallol.

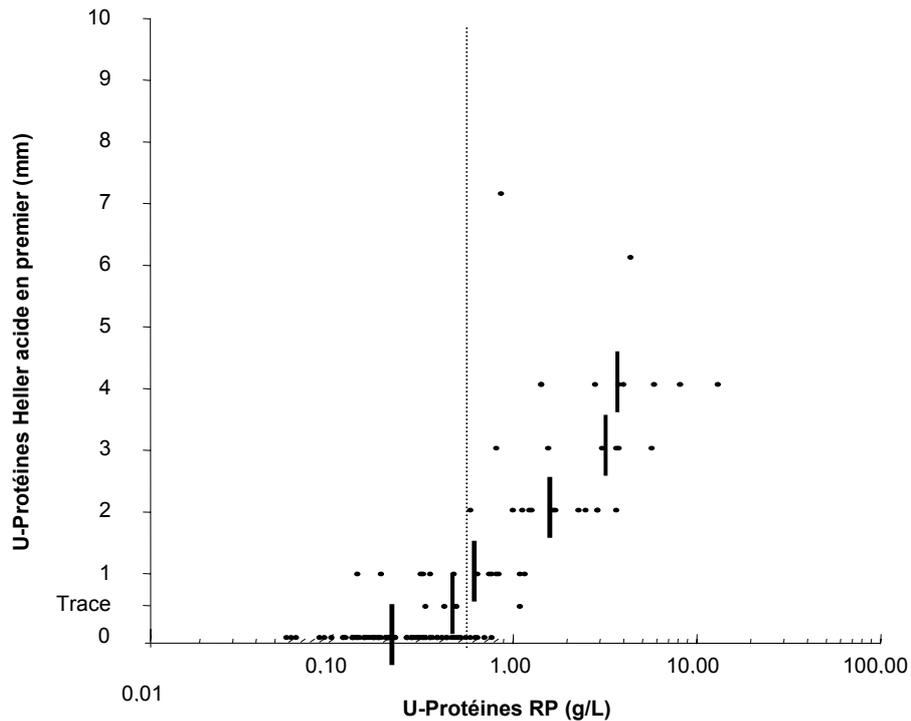


Fig. 11 : Comparaison des résultats du test de Heller N1 (acide en premier) et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 123 cas. Les barres verticales représentent la médiane pour chaque graduation semi-quantitative. La ligne verticale en pointillés représente la limite physiologique de la concentration en protéine urinaire chez le chien, établie à 0.50 g/L (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976).

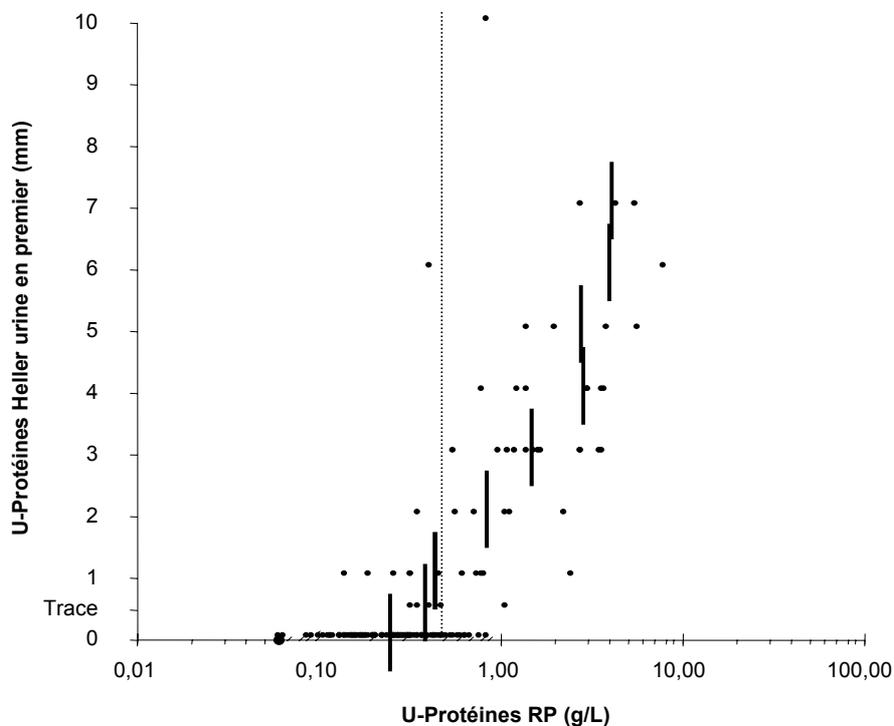


Fig. 12 : Comparaison des résultats du test de Heller N2 (urine en premier) et de la mesure quantitative de la protéinurie sur 142 cas. Les barres verticales représentent la médiane pour chaque graduation semi-quantitative. La ligne verticale en pointillés représente la limite physiologique de la concentration en protéine urinaire chez le chien, établie à 0.50 g/L (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976).

Parmi les urines testées par les méthodes de Heller, deux ont donné des résultats inattendus : les réactions de Heller étaient fortement positives (6 et 10 mm par la méthode N2 (7 mm par la méthode N1 pour le second échantillon, le premier n'ayant pas été testé par cette méthode)) pour des protéinuries mesurées faibles (respectivement 0.43 et 0.90 g/L). Ces deux urines avaient été prélevées par cystocentèse sur le même animal. Le pH de ces urines était de 5, et les commémoratifs ne rapportaient aucun traitement en cours. Le premier échantillon était positif à la bandelette sur la plage « sang » (3+) mais le second était négatif. La plage « protéines » de la bandelette a donné 1+ en lecture visuelle et 2+ en lecture automatique pour le premier échantillon, et 2+ pour les deux modes de lecture pour le deuxième. Le test à l'acide sulfosalicylique a donné 1+ pour les deux échantillons.

5) Dépistage du seuil 0.50 g/L avec les techniques rapides

Le seuil de décision de 0.50 g/L a été fixé arbitrairement en se fondant sur les valeurs rapportées dans la littérature (Asheim, 1964; Barsanti and Finco, 1979; Hendriks et al., 1976). Il a ainsi permis de classer les résultats du dosage quantitatif au rouge de pyrogallol en « physiologiques » vs « pathologiques » et de comparer les résultats obtenus avec les différentes techniques rapides (Tableau 4).

Pour les deux modes de lecture des bandelettes, on a pu constater que pour des résultats négatifs ou « trace », la totalité des échantillons testés était en dessous du seuil de 0.50 g/L, à l'exception de deux cas de concentration 0.60 et 0.64 g/L. Pour une estimation d'une croix à la bandelette urinaire, la majeure partie (56 % en lecture visuelle et 93 % en lecture automatique) des échantillons était aussi inférieure à 0.50 g/L. A partir de 3+, tous les échantillons sauf en lecture automatique (0.40 g/L de protéines) avaient une concentration en protéines urinaires supérieure à 0.50 g/L.

Avec le test à l'acide sulfosalicylique, 80 % des échantillons classés en dessous de 2+ étaient sous le seuil de 0.50 g/L (les 20 % restants étaient inférieurs à 0.94 g/L pour une estimation négative et à 1.48 g/L pour une estimation à 1+), et à partir de 2+, 100% des urines étaient au dessus du seuil de 0.50 g/L.

Pour les méthodes de Heller, pour un seuil de décision de 0.50 g/L, 10 % des cas négatifs étaient des faux négatifs pour la méthode N1 (acide en premier) contre 12 % pour la méthode N2 (urine en premier). De plus, 22 % des échantillons positifs renfermaient moins de 0.50 g/L de protéines en méthode N1 contre 23 % en méthode N2. Pour une estimation de

l'épaisseur du disque égale à 1mm, environ 50 % des échantillons étaient au-delà de 0.50 g/L. A partir de 2 mm de disque, seuls 2 échantillons sur 35 testés avec la méthode N2 étaient inférieurs à 0.50 g/L (0.37 g/L et 0.43 g/L).

Tabl. 4 : Efficacité des tests rapides au seuil de 0.50 g/L

| | 0 | Trace | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 10 |
|-------------------------|--------|-------|-------|-------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| Bandelette visu. | 37/37 | 35/37 | 18/36 | 3/17 | 0/19 | 0/5 | - | - | - | - |
| Bandelette auto. | 25/25 | 17/17 | 37/41 | 10/30 | 1/38 | 0/0 | - | - | - | - |
| SSA | 88/100 | | 6/18 | 0/5 | 0/14 | 0/10 | - | - | - | - |
| Heller N1 | 69/77 | 4/5 | 6/13 | 0/12 | 0/6 | 0/8 | 0/0 | 0/1 | 0/1 | 0/0 |
| Heller N2 | 80/91 | 4/5 | 6/11 | 1/6 | 0/12 | 0/7 | 0/4 | 1/2 | 0/3 | 0/1 |

Dans chaque case est indiqué le rapport du nombre de cas où le résultat du dosage PR était ≤ 0.50 g/L sur le nombre total de cas où le test a donné l'indication de la ligne supérieure (par exemple 35 sujets avaient une protéinurie ≤ 0.5 g/L dans les 37 cas où la bandelette en lecture visuelle a donné le résultat « Trace »)

Les taux de faux négatifs des techniques rapides au seuil de 0.5 g/L ont été de :

- 0% pour la réponse 0 des bandelettes en lecture visuelle et 0 ou « trace » en lecture automatique ;
- 12 % pour les réponses 0 ou « Trace » du test à l'acide sulfosalicylique ;
- 12 % et 13 % pour les réactions de Heller respectivement en déposant l'acide (N1) ou l'urine (N2) en premier.

Les taux de faux positifs des techniques rapides au seuil de 0.5 g/L ont été de :

- 22 % pour la réponse supérieures ou égales à 1+ des bandelettes en lecture visuelle et de 53 % en lecture automatique ;
- 13 % pour les réponses supérieures ou égales à 1+ du test à l'acide sulfosalicylique ;
- 12 % et 23 % pour les réactions de Heller respectivement en déposant l'acide (N1) ou l'urine (N2) en premier.

La certitude de détecter une protéinurie au seuil de 0.50 g/L a été obtenue :

- pour la bandelette à partir de 3+ en lecture visuelle, mais n'a pas été obtenue en lecture automatique puisqu'un échantillon était en dessous du seuil de 0.50 g/L à 3+ ;

- pour le test à l'acide sulfosalicylique à partir de 2+
- pour le test de Heller N1 à partir de 2 mm d'épaisseur de disque, et pour le test N2 à partir de 7 mm puisqu'un échantillon était en dessous de 0.50 g/L à 6 mm d'épaisseur de disque.

Selon les tests rapides, la sensibilité au seuil de 0.50 g/L a été de :

- 96 % et 100 % respectivement pour les réponses 0 et « Trace » de la bandelette en lecture visuelle et automatique ;
- 88 % pour le test à l'acide sulfosalicylique ;
- 87 % pour les tests de Heller.

Selon les tests rapides, la spécificité au seuil de 0.50 g/L a été de :

- 78 % et 47 % respectivement pour les réponses 0 et « Trace » de la bandelette en lecture visuelle et automatique ;
- 87 % pour le test à l'acide sulfosalicylique ;
- 88 % et 77 % respectivement pour les tests de Heller N1 et N2.

6) Effets du pH, de l'hématurie, de la prise de traitement antibiotique et de la densité

a. Effet du pH

Les faux négatifs et les faux positifs (seuils fixés par le fabricant) des tests à la bandelette, à l'acide sulfosalicylique (seuils fixés par W.L Gyure (Gyure, 1977)) et aux méthodes de Heller (seuil de décision fixé arbitrairement à 0.50 g/L) ont été répartis en trois classes en fonction du pH acide (<5.5), physiologique (entre 5.5 et 7,0) ou alcalin (>7,0) de l'urine, dans le but d'évaluer l'effet du pH sur ces cinq tests (Tableau 5).

Tabl. 5 : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction du pH.

| | | pH < 5.5 | pH physiologique | pH>7 |
|-------------------------|-----------|----------|------------------|------|
| Bandelette visu. | FN | 6 % | 12 % | 9 % |
| | FP | 12 % | 9 % | 28 % |
| Bandelette auto | FN | - | - | - |
| | FP | 23 % | 30 % | 52 % |
| SSA | FN | 76 % | 64 % | 63 % |
| | FP | 6 % | 13 % | 8 % |
| Heller N1 | FN | 0 % | 6 % | 9 % |
| | FP | 0 % | 11 % | 18 % |
| Heller N2 | FN | 0 % | 4 % | 15 % |
| | FP | 12 % | 8 % | 8 % |

Les pourcentages représentent la proportion de faux négatif ou de faux positifs dans chaque classe.

On a ainsi constaté qu'en lecture visuelle et automatique de la bandelette urinaire, la proportion de faux positifs était plus importante lorsque le pH urinaire était supérieur à 7. A l'opposé, au test à l'acide sulfosalicylique, on a observé une proportion de faux négatifs plus élevée lorsque les urines étaient acides.

b. Effet de l'hématurie

Les faux négatifs et les faux positifs (seuils fixés par le fabricant) des tests à la bandelette, à l'acide sulfosalicylique (seuils fixés par W.L Gyure (Gyure, 1977)) et aux méthodes de Heller (seuil de décision fixé arbitrairement à 0.50 g/L) ont été répartis en deux classes en fonction de la réaction de la plage « Sang » à la bandelette urinaire, dans le but d'évaluer l'effet de l'hématurie sur ces cinq tests (Tableau 6).

Tabl. 6 : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de la réaction de la plage « Sang » de la bandelette urinaire.

| | | « Sang » < + | « Sang » ≥ + |
|-------------------------|-----------|--------------|--------------|
| Bandelette visu. | FN | 11 % | 9 % |
| | FP | 14 % | 36 % |
| Bandelette auto | FN | - | - |
| | FP | 35% | 64 % |
| SSA | FN | 65 % | 82 % |
| | FP | 10 % | 64 % |
| Heller N1 | FN | 6 % | 14 % |
| | FP | 8 % | 0 % |
| Heller N2 | FN | 6 % | 38 % |
| | FP | 8 % | 0 % |

Les pourcentages représentent la proportion de faux négatif ou de faux positifs dans chaque classe.

Pour les tests à la bandelette et à l'acide sulfosalicylique, il a été constaté que la proportion de faux positifs était plus importante lors d'hématurie que dans des urines « physiologiques ». Pour les réaction de Heller et le test à l'acide sulfosalicylique, la proportion de faux négatif était plus élevée dans les urines contenant 1+ ou plus de « Sang ».

c. Effet de la prise d'antibiotiques

Les faux négatifs et les faux positifs (seuils fixés par le fabricant) des tests à la bandelette, à l'acide sulfosalicylique (seuils fixés par W.L Gyure (Gyure, 1977)) et aux méthodes de Heller (seuil de décision fixé arbitrairement à 0.50 g/L) ont été répartis en deux classes en fonction de la prise ou non de traitement antibiotique lors du prélèvement, dans le but d'évaluer l'effet de ces molécules sur ces cinq tests (Tableau 7).

Tabl. 7 : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de la prise de traitement antibiotique.

| | | Avec traitement antibiotique | Sans traitement antibiotique |
|-------------------------|-----------|------------------------------|------------------------------|
| Bandelette visu. | FN | 6 % | 11 % |
| | FP | 0 % | 18 % |
| Bandelette auto | FN | - | - |
| | FP | 37 % | 37 % |
| SSA | FN | 69 % | 64 % |
| | FP | 12 % | 10 % |
| Heller N1 | FN | 15 % | 5 % |
| | FP | 15 % | 6 % |
| Heller N2 | FN | 13 % | 7 % |
| | FP | 20 % | 5 % |

Les pourcentages représentent la proportion de faux négatifs ou de faux positifs dans chaque classe.

A la bandelette et au test à l'acide sulfosalicylique, aucun effet de la prise d'antibiotique n'a été mis en évidence. A la réaction de Heller, une augmentation de la proportion de faux négatifs et de faux positifs a été constatée lors de la prise de traitement antibiotique (amoxicilline, céphalexine, ceftiofur, clindamycine, métronidazole).

d. Effet de la densité

Les faux négatifs et les faux positifs (seuils fixés par le fabricant) des tests à la bandelette, à l'acide sulfosalicylique (seuils fixés par W.L Gyure (Gyure, 1977)) et aux méthodes de Heller (seuil de décision fixé arbitrairement à 0.50 g/L) ont été répartis en trois classes en fonction de leur densité, dans le but d'évaluer l'effet de la densité sur ces cinq tests (Tableau 8).

Tabl. 8 : Comparaison de la répartition des faux négatifs (FN) et des faux positifs (FP) en fonction de leur densité.

| | | Densité < 1.015 | Densité physiologique | Densité > 1.045 |
|-------------------------|-----------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Bandelette visu. | FN | 8 % | 13 % | 0 % |
| | FP | 12 % | 16 % | 20 % |
| Bandelette auto | FN | - | - | - |
| | FP | 38 % | 35 % | 53 % |
| SSA | FN | 46 % | 68 % | 79 % |
| | FP | 15 % | 10 % | 0 % |
| Heller N1 | FN | 0 % | 4 % | 17 % |
| | FP | 20 % | 5 % | 0 % |
| Heller N2 | FN | 0 % | 7 % | 29 % |
| | FP | 21 % | 5 % | 0 % |

Les pourcentages représentent la proportion de faux négatif ou de faux positifs dans chaque classe.

A la bandelette, pour les deux modes de lecture, on a observé une augmentation modérée de la proportion de faux positifs dans les urines fortement concentrées. Pour les tests à l'acide sulfosalicylique et de Heller, on a constaté une augmentation importante de la proportion de faux positifs dans les urines très diluées, ainsi qu'une augmentation de la proportion de faux négatifs dans les urines concentrées.

IV/ DISCUSSION

1) Validité de l'étude

La validité des résultats présentés précédemment repose sur les résultats du contrôle de qualité de la méthode utilisée comme référence, en l'occurrence le dosage au rouge de pyrogallol, ainsi que sur le nombre de spécimens analysés recouvrant une très large gamme de concentrations

Lors du contrôle de qualité du dosage au rouge de pyrogallol, l'exactitude et la précision de la technique ont été très bonnes. En effet,

- toutes les mesures du contrôle d'exactitude étaient situées dans l'intervalle d'acceptabilité indiqué par le fabricant (0.37 ± 0.05 g/L) avec une moyenne de 0.37 g/L ;
- la répétabilité des dosages a été très bonne, en moyenne de 4% ;
- le coefficient de variation interséries était de 3%. La précision a même été plus grande que celle décrite dans la littérature lors d'une étude réalisée sur du liquide céphalo-rachidien de chien (Behr et al., 2003) : le coefficient de variation entre les séries était alors de 4.3%.

Par conséquent, en utilisant la valeur moyenne des replicates on peut être raisonnablement confiant dans la valeur estimée

L'échantillonnage de spécimens urinaires canins a été plus nombreux que ce qui est habituellement recommandé pour les comparaisons de techniques qui portent souvent sur une quarantaine de spécimens (Jensen, 2006). En l'occurrence, 151 urines ont été analysées, recueillies sur des animaux malades ou en bonne santé indépendamment des techniques de collecte. De plus, l'étendue des protéinuries mesurées a été très large, de 0.06 à 13.40 g/L, couvrant ainsi des valeurs physiologiques et pathologiques. Cela permet d'extrapoler les résultats à l'ensemble des cas que le vétérinaire praticien est susceptible de rencontrer dans sa clientèle.

2) Dépistage à l'aide de la bandelette urinaire

a. Discussion sur les faux positifs

Par rapport aux seuils fixés par le fabricant, 16 % en lecture visuelle et 37 % en lecture automatique des échantillons testés étaient des faux positifs. Cette quantité de faux positifs peut en partie être expliquée par la faible sous-estimation des globulines et de l'albumine (Behr et al., 2003) par le dosage au rouge de pyrogallol.

Contrairement à une étude récente (Welles et al., 2006) mais en accord avec une autre plus ancienne (Grauer, 1985), une augmentation de la quantité de faux positifs dans les urines alcalines a été observée. Cependant, au moins au voisinage de 0.37 g/L, il a été montré que la technique était exacte. Par conséquent, il est probable que la bandelette elle-même soit responsable de cet écart.

La présence de sang dans les échantillons, objectivée par une réaction supérieure à 1+ de la plage « Sang » de la bandelette urinaire, a eu un effet sur la détection de la protéinurie en augmentant le nombre de faux positifs, en particulier lorsque l'hématurie était supérieure à 3+.

Les antibiotiques comme les pénicillines et les céphalosporines, classiquement décrits comme ayant un effet sur la réaction de la bandelette urinaire (DiBartola et al., 1980; Thysell, 1969; Rosenberg and Hostetter, 1992; Russo, 1986) n'ont eu aucun effet sur la détection de la protéinurie. Cependant, la prise des commémoratifs était fondé uniquement sur les déclarations des propriétaires et la tenue des dossiers cliniques par les intervenants de l'ENVV : nous ne pouvons donc certifier que la totalité des traitements administrés a été enregistrée.

Dans les urines fortement concentrées (densité supérieure à 1.045), nous avons constaté que le nombre de faux positifs était supérieur à la moyenne. L'interprétation du résultat du test à la bandelette sur une urine fortement concentrée doit tenir compte de cette observation. Il est possible que la couleur même de l'urine fortement concentrée influe sur la couleur de la plage « Protéines ».

b. Discussion sur les faux négatifs

La comparaison entre les lectures visuelle et automatique de la plage « Protéines » de la bandelette urinaire a permis de constater que l'œil de l'observateur sous-estimait souvent la protéinurie, hormis pour des concentrations très fortes (4+ de protéines en lecture visuelle) pour lesquelles elle était surestimée.

L'absence totale de faux négatifs à la lecture automatique de la bandelette et la plus grande proportion de faux positifs par rapport à la lecture visuelle suggèrent que l'automate surestime la protéinurie. Cependant, la lecture automatique offre l'avantage d'être objective et « opérateur indépendant » (James, 1978) et de ne risquer aucun faux négatif, qualité notable pour un test de dépistage.

Aucune cause permettant d'expliquer les faux négatifs à la bandelette en lecture visuelle (11 % des échantillons testés) n'a pu être mise en évidence.

c. Discussion sur le seuil de décision

Les seuils semi-quantitatifs proposés par le fabricant ont été mis au point pour une utilisation en médecine humaine pour laquelle le seuil de décision est de 0.30 g/L. Les urines du chien étant physiologiquement plus concentrées, la pertinence de ce seuil mérite d'être réévaluée.

Par exemple pour un seuil de décision « physiologique » vs « pathologique » de 0.50 g/L, les résultats précédents ont montré que tous les cas évalués à 0 ou « trace » ont des concentrations en protéines inférieures à 0.50 g/L, à l'exception de deux (0.60 et 0.64 g/L) et qu'à partir de 3+ en lecture visuelle, tous les spécimens renferment plus de 0.50 g/L. Cependant, la quantité élevée de faux positifs (50 % en lecture visuelle et 90 % en lecture automatique) pour un résultat de 1+ à la bandelette est à noter. Dans notre étude, la lecture automatique, certainement du fait de la grande proportion de faux positifs qu'elle provoque, n'a pu apporter la certitude d'avoir plus de 0.50 g/L de protéines urinaires dans un échantillon. Cependant, un seul spécimen sur 38 contenait moins de 0.50 g/L pour un résultat de 3+ en lecture automatique.

La sensibilité du test à la bandelette au seuil de 0.50 g/L est de 96 % en lecture visuelle et de 100 % en lecture automatique et sa spécificité respectivement de 78 % et 47 % si l'on considère que le test est négatif pour les résultats 0 et « Trace ». Ces résultats ne

concordent pas avec ceux rapportés par une étude récente menée chez le chien (Welles et al., 2006) dans laquelle la sensibilité était de 93.3 % et la spécificité de 87.5 % et une autre étude plus ancienne menée chez l'homme (James, 1978) dans laquelle la sensibilité était d'environ 45 % et la spécificité de presque 100 % pour les trois bandelettes testées. Ceci peut être expliqué par la différence des réactifs (bandelettes différentes), des seuils de décisions et de la méthode de référence utilisée.

Ainsi, nous proposons de fixer le seuil de décision de la bandelette à 0.50 g/L de protéines urinaires, ce qui est plus proche de la réalité chez le chien. Le praticien peut être confiant dans un résultat 0 (Lees et al., 2005) ou « Trace » et dans un résultat supérieur ou égal à 3+ (Moore, 1991). Pour un résultat à la bandelette de 1+ ou de 2+, la quantité élevée de faux positifs ne permet pas de classer l'urine en « physiologique » ou « pathologique ». Dans certaines études précédentes, il a été proposé que lorsque le résultat de la bandelette est de 1+ ou 2+, le praticien effectue en seconde intention un test semi-quantitatif à l'acide sulfosalicylique, pour augmenter la spécificité de son dépistage (Lees et al., 2005; Gyure, 1977; Reine and Langston, 2005). Dans tous les cas, un résultat positif à la bandelette, c'est-à-dire supérieur ou égal à 1+, devrait amener le praticien à vérifier la permanence de la protéinurie puis à demander un dosage quantitatif de la protéinurie pour établir son diagnostic et son plan thérapeutique.

3) Dépistage par le test à l'acide sulfosalicylique

a. Discussion sur les faux positifs

Par rapport aux seuils fixés par la littérature pour des urines humaines (Gyure, 1977), 10 % des échantillons étaient des faux positifs. La proportion de faux positifs était particulièrement importante à partir de 3+. Cela peut être expliqué par une inadaptation des seuils fixés initialement pour des urines humaines, ainsi que la tendance du dosage quantitatif au rouge de pyrogallol à faiblement sous-estimer les protéines urinaires (Behr et al., 2003).

Contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature (DiBartola et al., 1980; Grauer, 1985), l'alcalinité des urines (pH > 7) n'a pas causé une augmentation des faux négatifs.

Le taux de faux positifs étant significativement plus élevé lorsque les urines contiennent au moins 1+ de « Sang » à la bandelette, il est essentiel d'en tenir compte lors de l'interprétation.

La prise de traitement antibiotique (selon les données fournies par le propriétaire ou le dossier clinique de l'animal) n'a pas eu d'effet sur les résultats du test.

Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre, la densité urinaire a eu un effet sur le résultat du test à l'acide sulfosalicylique, sans que l'on puisse l'expliquer.

b. Discussion sur les faux négatifs

Par rapport aux seuils fixés par la littérature pour des urines humaines (Gyure, 1977), 65 % des échantillons étaient des faux négatifs. Ce risque d'erreur est inacceptable pour un test de dépistage. Il est cependant possible que d'autres procédures de ce test donnent des résultats différents (concentration de l'acide, proportions relatives d'urine et d'acides différentes).

L'acidité et la présence de 1+ ou plus de « Sang » dans les urines ont eu un effet sur les résultats du test : le nombre de faux négatifs a augmenté pour des urines acides. Ces phénomènes n'ont pu être expliqués.

c. Discussion sur le seuil de décision

Les seuils semi-quantitatifs proposés par W.L Gyure (Gyure, 1977) ont été mis au point sur des urines humaines. Le nombre très élevé de faux négatifs avec les seuils déterminés par cet auteur a amené à douter de leur pertinence pour des urines canines.

Si le seuil de décision « physiologique » versus « pathologique » est amené à 0.50 g/L au lieu de 0.10 g/L, le taux de faux négatifs est considérablement abaissé (de 93 à 12 %). A partir de 2+, tous les spécimens contenaient plus de 0.50 g/L de protéines urinaires. Le taux de faux positifs a peu varié avec le changement de seuil (de 0 à 3 %).

La sensibilité du test à l'acide sulfosalicylique au seuil de 0.50 g/L est de 88 % et sa spécificité de 87 %. Ces résultats ne concordent pas avec ceux d'une étude récente (Welles et al, 2006) dans laquelle la sensibilité était de 43.3 % et la spécificité de 97.5 %. Ceci peut s'expliquer par des réactifs, une échelle de graduation semi-quantitative et une méthode de référence différents.

Nous proposons donc de garder les critères macroscopiques de turbidité établis par W.L Gyure (Gyure, 1977), en adaptant le seuil de décision, c'est-à-dire en considérant qu'à partir de 2+ au test à l'acide sulfosalicylique, la concentration en protéines urinaires est supérieure à 0.50 g/L. Cependant, le praticien doit tenir compte de la présence de faux négatifs (12 %) : en cas de réaction négative au test à l'acide sulfosalicylique, il est conseillé de réaliser un test à la bandelette urinaire (Gyure, 1977) pour augmenter la sensibilité du dépistage avant de conclure à l'absence de protéinurie. Le praticien peut avoir confiance en un résultat supérieur ou égal à 2+. Une réaction de 1+ est douteuse (1/3 des spécimens évalués à 1+ sont des faux positifs). Dans tous les cas où le test à l'acide sulfosalicylique s'avère positif de manière permanente, la quantification de la protéinurie est recommandée pour confirmer le diagnostic.

4) Dépistage par les méthodes de Heller

Aucun seuil de décision ne figurant dans la littérature, il a été décidé arbitrairement de fixer ce seuil à 0.50 g/L, dans le but de distinguer facilement les urines « physiologiques » des « pathologiques ». Le taux de faux négatif est aux environs de 13 % et celui de faux positifs de 12 et 23 % pour les réactions de Heller respectivement en déposant l'acide (N1) ou l'urine (N2) en premier. Les deux techniques sont équivalentes pour la sensibilité (87 % pour les deux). La spécificité varie en fonction de la technique : 88 % pour N1 (acide en premier) et 77 % pour N2 (urine en premier). Dans les 2/3 des cas où les résultats ont été différents entre les deux, l'épaisseur de disque avec la méthode N2 a été supérieure à celle de la méthode N1.

D'après notre étude, l'hématurie (objectivée par la présence d'1+ ou plus sur la plage « Sang » de la bandelette urinaire) provoque des faux négatifs et la prise de traitement antibiotique augmente à la fois la quantité de faux négatifs et de faux positifs. L'effet de la densité est le même que pour le test à l'acide sulfosalicylique.

Le praticien peut avoir confiance en une épaisseur de disque supérieure ou égale à 2 mm, puisque seuls deux spécimens (0.37 et 0.43 g/L) remplissant cette condition renfermaient moins de 0.50 g/L de protéines urinaires pour les deux méthodes. Cependant, du fait de la quantité non négligeable de faux négatifs (13 %), l'interprétation d'un résultat négatif au test de Heller doit se faire avec précaution. Dans ce cas, il est donc indiqué d'effectuer un test à la

bandelette urinaire pour augmenter la sensibilité du dépistage. Dans tous les cas où la réaction de Heller est positive de manière permanente, il est recommandé de réaliser un dosage quantitatif des protéines urinaires, en particulier lorsque l'épaisseur de disque est de 1 mm, car pour ce résultat, 50 % des spécimens testés contiennent moins de 0.50 g/L de protéines.

CONCLUSION

Les tests de dépistage sont utilisables chez le chien pour une première classification des animaux en fonction de leur concentration en protéines urinaires (seuil de décision : 0.50 g/L). En effet, la comparaison de chacun de ces tests au dosage quantitatif au rouge de pyrogallol a mis en évidence une très bonne sensibilité du test à la bandelette aussi bien en lecture visuelle (96 %) qu'automatique (100 %) : la très grande majorité voire la totalité des animaux ayant une concentration en protéines urinaires supérieure à 0.50 g/L est ainsi dépistée. De plus, lorsqu'un résultat à la bandelette est 0 ou « Trace », on peut raisonnablement affirmer que la concentration en protéines urinaires est dans les valeurs usuelles. Le test à la bandelette est donc à recommander en première intention pour écarter une protéinurie chez un chien. L'inconvénient de la bandelette urinaire est sa faible spécificité (78 % et 47 % en lecture visuelle et automatique) : un nombre non négligeable de chien dépistés comme positifs ont une concentration en protéines urinaires inférieure à 0.50 g/L. La spécificité du dépistage peut être augmentée en associant à la bandelette urinaire un autre test rapide pour écarter un certain nombre de faux positifs. Ainsi, dans le cas d'un résultat supérieur ou égal à 1+, il peut être recommandé d'effectuer le test à l'acide sulfosalicylique ou la réaction de Heller. Les tests de Heller ou à l'acide sulfosalicylique ne sont pas recommandés en utilisation isolée du fait de leur relativement faible sensibilité (environ 87 %) : le risque d'erreur est difficilement gérable pour un test de dépistage.

Dans tous les cas, ces tests rapides ne doivent être considérés que comme un dépistage. Ensuite, la permanence de la protéinurie doit être établie avant d'être quantifiée. Une meilleure exploitation d'analyses urinaires systématiques devrait ainsi permettre de mieux dépister les chiens atteints d'affections rénales, donc de les explorer plus précocement et en définitive améliorer leur prise en charge.

BIBLIOGRAPHIE

- ASHEIM, A., PERSSON, F., PERSSON, S.
Comparative pathophysiological aspects of the glomerulonephritis associated with pyometra in dogs.
Acta Vet Scand, 1964, **5**, 188-207.
- BAGLEY, R. S., CENTER, S. A., LEWIS, R. M., SHIN, S., DOUGHERTY, S. A., RANDOLPH, J. F., AND ERB, H.
The effect of experimental cystitis and iatrogenic blood contamination on the urine protein/creatinine ratio in the dog.
J Vet Intern Med, 1991, **5**, 66-70.
- BARSANTI, J. A., AND FINCO, D. R.
Protein concentration in urine of normal dogs.
Am J Vet Res, 1979, **40**, 1583-8.
- BEHR, S., TRUMEL, C., PALANCHE, F., AND BRAUN, J. P.
Assessment of a pyrogallol red technique for total protein measurement in the cerebrospinal fluid of dogs.
J Small Anim Pract, 2003, **44**, 530-3.
- BIEWENGA, W. J., GRUYS, E., AND HENDRIKS, H. J.
Urinary protein loss in the dog: nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease.
Res Vet Sci, 1982, **33**, 366-74.
- CENTER, S. A., WILKINSON, E., SMITH, C. A., ERB, H., AND LEWIS, R. M.
24-Hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropathies.
J Am Vet Med Assoc, 1985, **187**, 820-4.
- DIBARTOLA, S. P., CHEW, D. J., AND JACOBS, G.
Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog.
J Am Anim Hosp Assoc, 1980, **16**, 537-546.
- DILENA, B. A.
Bacterial interference with measurement of creatinine in stored plasma.
Clin Chem, 1988, **34**, 1007-1008.
- EBINA, S., NAGAI, Y.
Re-evaluation of turbidimetry of proteins by use of aromatic sulfonic and chloroacetic acids.
Clin Chem, 1979, **25**, 247-251.
- ERMAN, A., RABINOV, M., AND ROSENFELD, J.
Albumin determination in frozen samples - Underestimated results.
Clin Chim Acta, 1988, **174**, 255-261.

FETTMAN, M. J.

Comparison of urinary protein concentration and protein/creatinine ratio vs routine microscopy in urinalysis of dogs: 500 cases (1987-1988).

J Am Vet Med Assoc, 1989, **195**, 972-6.

FORTERRE, S., RAILA, J., AND SCHWEIGERT, F. J.

Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis.

J Vet Diagn Invest, 2004, **16**, 271-7.

GRAUER, G. F.

Clinical manifestations of urinary disorders.

In: NELSON, R. W., AND COUTO, C. G.

Small animal internal medicine.

Saint Louis : Mosby, 2003, 568-583.

GRAUER, G. F.

Clinicopathologic evaluation of early renal disease in dogs.

Comp Cont Educ Pract Vet, 1985, **7**, 32-38.

GRAUER, G. F.

Early detection of renal damage and disease in dogs and cats.

Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2005, **35**, 581-96.

GRAUER, G. F., GRECO, D. S., GETZY, D. M., COWGILL, L. D., VADEN, S. L., CHEW, D. J., POLZIN, D. J., AND BARSANTI, J. A.

Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis.

J Vet Intern Med, 2000, **14**, 526-33.

GYURE, W. L.

Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein.

Clin Chem, 1977, **23**, 876-879.

HENDRIKS, H. J., HAAGE, A., AND DE BRUYNE, J. J.

Determination of the protein concentration in canine urine.

Zentralbl Veterinarmed A, 1976, **23**, 683-7.

JACOB, F., POLZIN, D. J., OSBORNE, C. A., NEATON, J. D., KIRK, C. A., ALLEN, T. A., AND SWANSON, L. L.

Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure.

J Am Vet Med Assoc, 2005, **226**, 393-400.

JAMES, G. P., BEE, D.E., FULLER, J.B.

Proteinuria: accuracy and precision of laboratory diagnosis by dip-stick analysis.

Clin Chem, 1978, **24**, 1934-1939.

JANSEN, B. S., AND LUMSDEN, J. H.

Sensitivity of routine tests for urine protein to hemoglobin.

Can Vet J, 1985, **26**, 221-223.

JENSEN, A. L., AND KJELGAARD-HANSEN, M.
Method comparison in the clinical laboratory.
Vet Clin Pathol, 2006, **35**, 276-286.

LE BRICON, T.
Exploration biologique de la protéinurie au laboratoire d'analyses: aspects quantitatifs.
Ann Biol Clin, 2001, **59**, 701-715.

LE BRICON, T., ERLICH, D., DUSSAUCY, M., GARNIER, J. P., AND BOUSQUET, B.
Dosage des protéines urinaires totales. Etude comparative des techniques automatisées à l'acide trichloracétique et au rouge de pyrogallol pour les échantillons contenant des chaînes légères monoclonales.
Ann Biol Clin (Paris), 1998, **56**, 719-723.

LEES, G. E., BROWN, S. A., ELLIOTT, J., GRAUER, G. E., AND VADEN, S. L.
Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal).
J Vet Intern Med, 2005, **19**, 377-85.

MAUREY, C.
Sémiologie biologique urinaire.
EMC-Vétérinaire, 2005, **2**, 156-168.

MCELDERRY, L. A., TARBIT, I. F., AND CASSELLS-SMITH, A. J.
Six methods for urinary protein compared.
Clin Chem, 1982, **28**, 356-60.

MOORE, F. M., BRUM, S. L., AND BROWN, L.
Urine protein determination in dogs and cats: comparaison of dipstick and sulfosalicylic acid procedures.
Vet Clin Pathol, 1991, **20**, 95-97.

PAGES, J. P., AND TROUILLET, J. L.
Les protéinuries.
Prat Med Chir Anim Comp, 1990, **25**, 585-597.

PORTER, P.
Comparative Study Of The Macromolecular Components Excreted In The Urine Of Dog And Man.
J Comp Pathol, 1964, **74**, 108-18.

REINE, N. J., AND LANGSTON, C. E.
Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample.
Clin Tech Small Anim Pract, 2005, **20**, 2-10.

RELFORD, R. L., AND LEES, G. E.
Nephrotic syndrome in dogs: diagnosis and treatment.
Comp Cont Educ Pract Vet, 1996, **18**, 279-295.

ROSENBERG, M. E., AND HOSTETTER, T. H.

Proteinuria.

In: SELDIN, D. W., AND GIEBISCH, G.

The kidney: physiology and pathophysiology.

New York : Raven press, 1992, 3039-3061.

RUSSO, E. A.

Assesment of proteinuria in the dog and cat.

In: KIRK, R. W.

Current veterinary therapy IX Small Animal Practice.

Philadelphia. : W.B. Saunders Co, 1986, 1111-1114.

SHIBA, K. S., KANAMORI, K., HARADA, T., NAKAO, M., NAKAJIMA, K., KODAIRA, T., AND NAKAGAWA, H.

A cause of discrepancy between values for urinary protein as assayed by the Coomassie Brilliant Blue G-250 method and the sulfosalicylic acid method.

Clin Chem, 1985, **31**, 1215-8.

THYSELL, H.

A comparison between Albustix, Hema-Combistix, Labstix, the sulphosalicylic-acid test, Heller's nitric-acid test, and a biuret method. Diagnosis of proteinuria.

Acta Med Scand, 1969, **185**, 401-7.

VADEN, S. L., PRESSLER, B. M., LAPPIN, M. R., AND JENSEN, W. A.

Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples.

Vet Clin Pathol, 2004, **33**, 14-9.

WELLES, E. G., WHATLEY, E. M., HALL, A. S., AND WRIGHT, J. C.

Comparison of Multistix Pro dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein (UP), urine creatinine (UC), and UP/UC ration in dogs and cats.

Vet Clin Pathol, 2006, **35**, 31-36.

WHITE, J. V., OLIVIER, N. B., REIMANN, K., AND JOHNSON, C.

Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria.

J Am Vet Med Assoc, 1984, **185**, 882-5.

WILSON, D. M., AND ANDERSON, R. L.

Protein-osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample.

Am J Clin Pathol, 1993, **100**, 419-424.

YALCIN, A., AND CETIN, M.

Electrophoretic separation of urine proteins of healthy dogs and dogs with nephropathy and detection of some urine proteins of dogs using immunoblotting.

Revue Med Vet, 2004, **155**, 104-112.

YOSSELSO-SUPERSTINE, S., AND SINAI, Y.
Drug interference with urine protein determination.
J Clin Chem Clin Biochem, 1986, **24**, 103-106.

Toulouse, 2006

NOM : LEROY

Prénom : Juliane

TITRE : Comparaison des tests de dépistage rapide et de la mesure de la protéinurie chez le chien

RESUME :

Les tests de dépistage des protéinuries utilisables par le vétérinaire praticien ont été établis pour une utilisation en médecine humaine. La détermination de leur valeur diagnostique chez le chien est nécessaire car ces tests ne sont pas validés dans cette espèce. Le but de cette étude a été de comparer une bandelette urinaire, le test à l'acide sulfosalicylique et de test à l'acide nitrique à un dosage quantitatif au rouge de pyrogallol. Au seuil de 0.50 g/L de protéines urinaires, nous avons établi que la bandelette était un très bon test de dépistage chez le chien (sensibilité de 96 à 100%) : pour un résultat de 0 ou « Trace », le dépistage est négatif et positif s'il est supérieur à 2+. Si le résultat est 1+ ou 2+, il est recommandé d'effectuer un test de précipitation à l'acide sulfosalicylique ou à l'acide nitrique pour écarter les nombreux faux positifs. Les tests de précipitation par les acides ne sont pas utilisables seuls du fait de leur faible sensibilité et spécificité.

MOTS-CLES : Protéinurie, Dépistage, Chien, Rouge de pyrogallol, Bandelette urinaire, Acide sulfosalicylique, Acide nitrique.

ENGLISH TITLE : Comparison of screening tests and quantitative determination of proteinuria in dogs.

ABSTRACT :

In-clinics urine tests for proteinuria have been validated for human urine. The determination of their diagnostic value in dogs is necessary because these tests have not been validated for dog urine.

The aim of this study was to compare a dipstick, the sulfosalicylic acid and the nitric acid tests with a quantitative pyrogallol red method. At a threshold of urinary proteins of 0.50g / L, it was determined that the urinary dipstick was a very good rapid test in dog urine (sensitivity of 96 to 100%): for a result of 0 or "Trace" the test is negative and it is positive for a result higher than 2+. If the result is 1+ or 2+, it is recommended to carry out a test of precipitation with sulfosalicylic or nitric acid to eliminate false-positive reactions. The acid-precipitation tests are not recommended because of their low sensitivity and specificity.

KEYWORDS : Proteinuria, Screening test, Dog, Pyrogallol red, Urinary dipstick, Sulfosalicylic acid, Nitric acid.