

Методы определения концентрации белка в моче

Ю.В. Ким, А.Н. Шибанов

А/О Юнимед, Москва

ВВЕДЕНИЕ

Определение концентрации белка в моче является одним из наиболее часто выполняемых видов исследований в клинических лабораториях. Ежедневно в каждой лаборатории исследуется от нескольких десятков до сотен проб мочи.

Проблема разработки корректных методов определения концентрации белка в моче имеет длительную историю [1, 23]. Сложность проблемы состоит в том, что метод должен иметь большой диапазон определения концентрации белка: от сотых долей грамма до нескольких граммов на литр. В тоже время, учитывая массовый характер данного исследования, он должен быть простым по технологии и дешевым [7].

Все многообразие применяемых сегодня в отечественных лабораториях методов определения концентрации белка в моче можно условно разделить на три группы. Первую группу образуют турбидиметрические методы, основанные на регистрации изменения светопропускания реакционной смесью вследствие образования мутности раствора белка в присутствии сульфосалициловой или трихлоруксусной кислоты. Вторую группу составляют фотометрические методы, основанные на регистрации изменения оптической плотности реакционной смеси в результате образования комплекса белок-краситель. К третьей группе методов определения концентрации белка в моче относятся методы «сухой химии».

При принятии решения о том, какой метод целесообразно использовать в клинико-диагностической лаборатории, необходимо соотносить аналитические характеристики метода и требования к ним, вытекающие из решаемых диагностических задач. В одних случаях допустимо использование

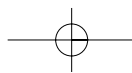
полуколичественных методов определения концентрации белка в моче, а в других требуется выполнение измерения с достаточно высокой точностью.

Цель настоящей статьи дать краткое описание физико-химических принципов вышеперечисленных методов и сравнить их аналитические характеристики.

Турбидиметрические методы

В нормальном состоянии молекулы белка имеют размеры значительно меньше длины волны видимого света и практически его не рассеивают. В кислой среде молекулы белка денатурируют и объединяются в крупные конгломераты (реакция преципитации), размеры которых сопоставимы или больше длины волны, на которой проводят фотометрирование реакционной смеси. В результате реакции преципитации реакционная смесь становится мутной. Величина изменения светопропускания имеет нелинейную зависимость от концентрации белка в пробе мочи. История развития турбидиметрических методов определения белка в моче насчитывает примерно 170 лет. Этим методам посвящено большое количество статей [1, 3-5, 6, 11, 12, 14, 18, 20], причем в последние десятилетия преимущественно критического характера [1, 4, 5, 6, 11, 18, 19]. Сегодня в России наиболее часто используется вариант турбидиметрического метода с применением сульфосалициловой кислоты, описанный в работе F.V. Kingsbury и соавт. в 1926 г. [14]. В последующих работах были предложены различные модификации данного метода [1, 3].

Поскольку данный метод постепенно уходит из практики лабораторной службы, мы не будем подробно на нем останавливаться. Отметим лишь основные причины, порождающие существенные недостатки турбидиметрического метода.



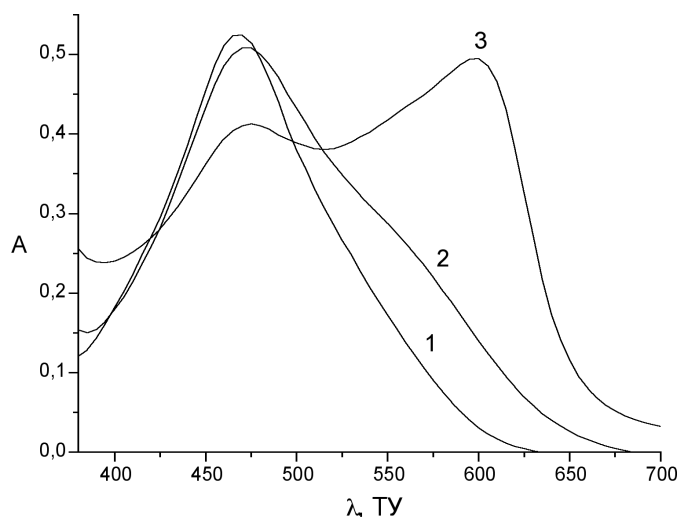
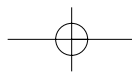


Рис. 1. Спектры светопоглощения растворов пирогаллолового красного (1), его комплекса с молибдатом натрия (2) и комплекса с молибдатом натрия в присутствии белка (3).

Малая степень разведения пробы мочи в реагенте (обычно 1:3) приводит к сильному влиянию в реакционной смеси интерферирующих факторов, таких как рН, гематурия, присутствие лекарственных препаратов и пр. В результате этого в разных пробах мочи с одним и тем же содержанием белка мы можем получать результаты измерений, отличающиеся в несколько раз [1, 4, 5, 8, 11, 18, 19].

Эффективность рассеяния света реакционной смесью определяется концентрацией и размерами белковых преципитатов. Последние зависят как от концентрации белковых молекул в реакционной смеси, так и от качественного состава белковых молекул, а также от условий проведения реакции. Например, встряхивание пробирки может приводить к образованию более крупных преципитатов. При высокой концентрации белка преципитаты имеют тенденцию к осаждению [1, 4, 5, 12].

Фотометрические методы

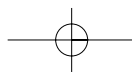
При взаимодействии молекулы красителя с молекулой белка появляется заметное поглощение света в той области спектра, где свободные молекулы красителя не поглощают. При низких концентрациях белка в моче количество молекул, образовавших комплекс белок-краситель пропорционально концентрации молекул белка. С ростом концентрации белка эта зависимость принимает нелинейный характер и, начиная с некоторого значения, становится константой. К группе фотометрических

методов относится метод Bradford, предложенный в 1976 г., в котором используется раствор красителя кумасси G-250 [10]. В 1986 г. N. Watanabe описал метод, основанный на применении комплекса красителя пирогаллолового красного и молибдата натрия [24]. Спектры поглощения пирогаллолового реактива и реакции в присутствии белка показаны на рис. 1. Приведенные данные показывают, что спектр раствора красителя пирогаллолового красного (спектральная зависимость 1) имеет максимум поглощения в области 470 нм. При увеличении длины волны света поглощение плавно уменьшается так, что на длине волны 600 нм оптическая плотность раствора в 7 раз меньше, чем в максимуме полосы поглощения. Комплекс молекул красителя с молибдатом натрия имеет максимум поглощения примерно там же (см. спектральную зависимость 2).

Если в пробе присутствуют молекулы белка, то они образуют комплекс с молекулами красителя и спектр поглощения (спектральная зависимость 3) последних сдвигается в область 600 нм, что мы и наблюдаем на рис. 1. Чем выше концентрация молекул белка, тем больше увеличение оптической плотности реакции на длине волны 600 нм. Поскольку реактив имеет заметное поглощение на длине волны 600 нм, то очевидно в качестве холостой пробы следует брать реактив.

Спектр поглощения комплекса краситель-молибдат натрия-белок имеет резкий спад в сторону увеличения длины волны. Это позволяет использовать бихроматический метод фотометрирования: основная длина волны 600 нм, вспомогательная 650 – 680 нм. В этом случае устраняются все ахроматические интерференцы: мутность реакции, царапины на фотометрической кювете. Бихроматический метод фотометрирования позволяет проводить измерение в круглых пробирках.

Ранее проведенные исследования [6] показали, что при использовании реагента «ЮНИ-ТЕСТ-БМ», при соотношении объемов мочи и реагента 20 мкл/1 мл (1:50), чувствительность метода составляет 0,05 г/л белка в моче. При этом линейный диапазон измерения достигает 2,5 г/л. Пятидесятикратное разведение пробы мочи в реагенте практически полностью исключает влияние состава мочи пациентов на результат измерения концентрации белка. При соотношении пробы мочи и реагента 100 мкл/1 мл (1:10) чувствительность ме-



тогда возрастает в пять раз (до 0,01 г/л) по сравнению с чувствительностью при соотношении 20 мкл/1 мл и позволяет определять концентрацию белка в моче в области микропротеинурии.

Таким образом, за счет пренебрежительно малого объема исследуемого образца, участвующего в реакции, результаты анализа пирогаллоловым методом не подвержены интерференции со стороны состава мочи (присутствие крови, бактерий, солей, лекарственных препаратов, определяющие цвет, мутность, рН мочи). Изменяя объем исследуемого образца при пробоподготовке: 20 мкл или 100 мкл, — лаборант может выполнять анализ общего белка в моче с высокой линейностью либо с высокой чувствительностью соответственно, что значительно расширяет клиническую значимость анализа.

Методы «сухой химии»

В основе методов лежит эффект изменения окраски реакционной зоны тест-полоски в результате реакции красителя, присутствующего в реакционной зоне с белком мочи [7]. Реакционная зона представляет собой пористую полоску, пропитанную раствором реагентов. В состав реагентов входят вещества, обеспечивающие стабилизацию рН (буфер) и краситель (например, тетрабромфенол синий) [2]. Когда образец пропитывает реакционную зону, сухие компоненты растворяются и взаимодействуют с компонентами мочи. Если в моче отсутствует белок, то реакционная зона остается бесцветной, либо слегка желтоватой, поскольку молекулы красителя поглощают свет в синей области спектра (спектральная зависимость 1 на рис.2). Если же в пробе присутствуют молекулы белка, то молекулы красителя образуют с ними комплексы, при этом их спектр поглощения сдвигается в красную сторону. На рис. 2 видно, что в присутствии белка в образце (спектральные зависимости 2, 3) отражение реакционной зоны резко уменьшается в области 620 нм. Визуально реакционная зона приобретает зеленый цвет.

Оценку реакции осуществляют либо с помощью анализатора мочи (отражательного фотометра, регистрирующего изменение коэффициента отражения света на определенных длинах волн), либо визуально, соотнося изменение окраски реакционной зоны с цветовой шкалой, размещаемой обычно прямо на пенале с тест-полос-

ками. Простота метода сделала его исключительно популярным во всем мире [13, 15, 21, 22]. Сегодня большое число фирм производит диагностические тест-полоски как для определения белка, так и ряда других показателей в моче. Одно из наиболее важных достоинств диагностических тест-полосок состоит в том, что за одну минуту можно определить до 11 показателей состава и свойств мочи.

Вышеописанный метод «сухой химии» является полуколичественным, из-за довольно большой погрешности определения концентрации белка в моче. Поскольку реакция протекает в неразведенном образце, которым пропитывается реакционная зона тест-полоски, влияние интерферентов, содержащихся в моче, максимально [9, 25, 26]. Визуальная оценка реакции привносит дополнительную ошибку из-за субъективного восприятия изменения цвета полоски. Но даже при использовании анализатора мочи, результат измерения остается полуколичественным [2, 16, 17]. При выполнении исследования с помощью тест-полосок следует также учитывать, что окраска реакционной зоны не стабильна. Это может быть обусловлено постепенным высыханием реакционной зоны и, соответственно, изменением концентрации реагентов. По этой причине регистрация реакции должна проводиться в течение строго заданного промежутка времени. Обычно стандартное время оценки реакции для тест-полосок составляет примерно 60 секунд после смачивания [2].

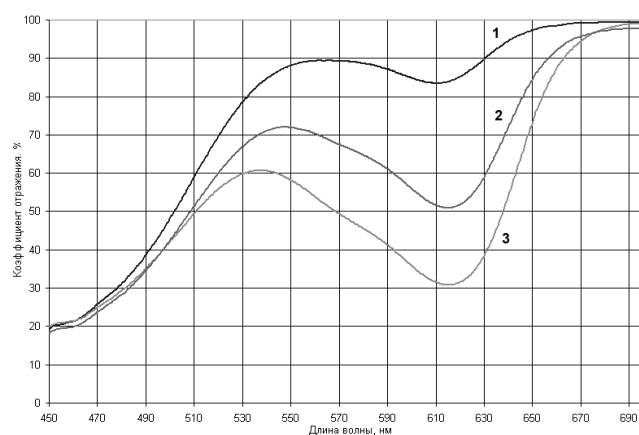
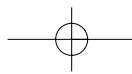


Рис. 2. Спектры отражения реакционной зоны тест-полоски для определения белка в моче: (1) смоченной дистиллированной водой, (2) смоченной раствором альбумина 0,3 г/л, (3) смоченной раствором альбумина 1,0 г/л.



СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИЗМЕРЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В МОЧЕ ТРЕМЯ МЕТОДАМИ

Для проведения сравнительных исследований определения белка в моче разными методами из 300 образцов мочи пациентов крупной многопрофильной больницы были отобраны пробы с положительным результатом определения белка с помощью тест-полосок для анализа мочи «УРИСКАН» (Ген 11). Всего было отобрано 65 образцов мочи: с ориентировочной концентрацией белка 0,1 г/л (30 образцов), 0,3 г/л (27 образцов) и 1,0 г/л (7 образцов). Для этих образцов были выполнены измерения концентрации белка двумя методами: сульфосалициловым и пирогалловым (набор «ЮНИ-ТЕСТ-БМ»).

Значения белка, полученные полуколичественным методом «сухой химии» и турбидиметрическим методом были сопоставлены со значениями, полученными количественным фотометрическим методом.

Для проб мочи, показавших на полосках «Урискан» значение белка 0,1 г/л, среднее значение концентрации при определении пирогалловым методом равнялось 0,1 г/л, а при определении сульфосалициловым методом — 0,03 г/л. Отсюда следует, что сульфосалициловый метод в области небольших концентраций белка в моче дает примерно втрое заниженные результаты, чем два других метода. Это объясняет, почему для сульфосалицилового метода граница нормы равна 0,03 г/л,

Таблица 1. Концентрация белка в моче, определенная методами: сухой химии, турбидиметрическим и фотометрическим.

Метод	Концентрация белка, г/л		
Тест-полоски «Урискан» (Ген 11)	p=30	p=27	p=7
	0,1	0,3	1,0
Сульфосалициловый метод			
Среднее значение	0,030	0,039	0,11
Дисперсия	0,025	0,032	0,072
Диапазон (min-max)	0-0,091	0-0,141	0,033-0,23
Пирогалловый метод			
Среднее значение	0,10	0,15	0,34
Дисперсия	0,07	0,094	0,19
Диапазон (min-max)	0,028-0,298	0,056-0,472	0,203-0,743

а для методов «сухой химии» и фотометрических методов нормой считается концентрация белка в моче менее 0,1 г/л. Хотя в среднем по 30 пробам мочи оценка концентрации белка пирогалловым методом и с помощью тест-полосок хорошо совпали, однако, как это видно из рис. 3, для нескольких проб с концентрацией белка заметно ниже 0,1 г/л тест-полоски дали оценку на уровне 0,1 г/л.

Для проб мочи с концентрацией белка 0,3 г/л, оцененной с помощью тест-полосок, среднее значение результатов измерений пирогалловым методом получено в два раза ниже. Другими словами,

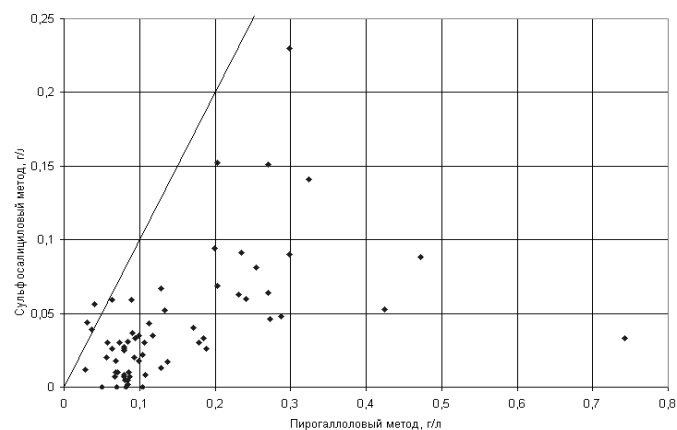


Рис. 3. Сопоставление результатов измерений концентрации белка в моче пирогалловым (реагент «ЮНИ-ТЕСТ-БМ») и сульфосалициловым методами.

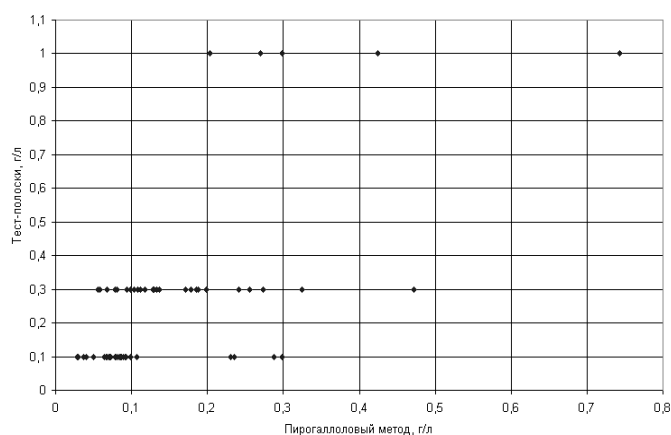
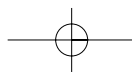


Рис. 4. Сопоставление результатов измерений концентрации белка в моче методами «сухой химии» (тест-полоски «Урискан») и пирогалловым красным (реагент «ЮНИ-ТЕСТ-БМ»).



тест-полоски дали завышенные результаты. Данные, полученные для этих же проб мочи сульфосалициловым методом, почти в пять раз ниже по сравнению с полученными пирогаллоловым методом. Для третьей группы проб мочи мы наблюдали трехкратное завышение оценки концентрации белка с помощью тест-полосок и трехкратное занижение для сульфосалицилового метода относительно значений, полученных пирогаллоловым методом.

Диаграммы сопоставимости результатов измерений пирогаллоловый метод – тест-полоски и пирогаллоловый метод – сульфосалициловый метод приведены на рис. 3 и 4. Из приведенных диаграмм видно, что как метод «сухой химии», так и сульфосалициловый метод имеют весьма значительные погрешности относительно пирогаллолового метода.

Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что сульфосалициловый метод существенно занижает значения результатов измерения концентрации белка в моче. Известно [5], что степень занижения зависит не только от состава мочи (присутствие крови, бактерий, солей, лекарственных препаратов, определяющие цвет, мутность, рН мочи и др.), но и от техники выполнения измерения (время инкубации пробы, температура реакции, интенсивность перемешивания пробы и др.). Это может привести к тому, что анализ мочи не позволит выявить даже весьма значительную степень протеинурии. Именно поэтому этот метод практически не используется в лабораториях западноевропейских и американских клиник.

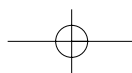
Метод «сухой химии» дает полуколичественную оценку степени протеинурии, и, как показали исследования, не редко эта оценка завышена. По этой причине применение тест-полосок следует рекомендовать для решения задач скрининга, и в тех случаях, когда не требуются точные количественные результаты оценки степени протеинурии. При выявлении белка в моче с помощью тест-полосок, следует выполнить более точное измерение с применением пирогаллолового метода.

Таким образом, пирогаллоловый метод следует применять при необходимости точного, количественного определения концентрации белка в моче, например, при обследовании пациентов, анамнез которых дает основание ожидать почечную патологию в качестве вторичных осложнений: больные сахарным диабетом, гипертонической болезнью и др. Именно в этих случаях необходимо иметь достаточ-

но точные результаты измерений в области малых значений концентраций белка в моче. Пирогаллоловый метод также следует применять при наблюдении за больным в динамике. Только этот метод позволяет надежно регистрировать относительно небольшие изменения концентрации белка в моче пациента, на основании которых можно судить о развитии патологического процесса в почках.

Литература:

1. Альтшулер Б.Ю., Раков С.С., Ткачев Г.А. Методические аспекты лабораторного определения низких концентраций белка в биологических жидкостях (опыт применения математического анализа). *Вопр. мед. химии.* – 2001. – № 4. – С.426-438.
2. Инструкция по применению тест-полосок URISCAN Urine Strip. YD Diagnostics, Seoul, Korea. – 2001.
3. Катсенельсон Н.Н. Анализы белка в моче модифицированным методом Кингсбери. *Лаб. дело* – 1973. – № 12. – С.728-729.
4. Ким Ю.В., Потехин О.Е., Токар М.И., Шибанов А.Н. Что мы измеряем в моче сульфосалициловым методом? *Лаб. мед.* – 2003. – № 6. – С.94-98.
5. Ким Ю.В., Шибанов А.Н. 170 лет с сульфосалициловым методом (обзор литературы). *Клин. лаб. диагн.* – 2004. – №8. – С.10-15.
6. Ким Ю.В., Шибанов А.Н. Сравнительный анализ методик определения белка в моче: набор «ЮНИ-ТЕСТ-БМ» и унифицированный метод с сульфосалициловой кислотой. *Клин. лаб. диагн.* – 2004. – №9. – С.84-85.
7. Козлов А.В., Слепышева В.В. Методы определения белка в моче: возможности и перспективы. *Сборник трудов VII ежегод. СПб нефрол. семинара.* – СПб: ТНА. – 1999. – С.17-28.
8. Миронов О.Л. Химический состав почечных камней и фракционный состав белков сыворотки крови и мочи. Автореф. дис. на соискание уч. степ. канд. хим. наук. *Донецк: Ин-т Физ.-Органич. Химии и Углекислотной им. Л.М. Литвиненко АН Украинской ССР.* – 1991.
9. Beer J.H., Vogt A., Neffel K., Cottagnoud P. False positive results for leucocytes in urine dipstick test with common antibiotics. *BMJ.* – 1996. – Vol. 313 (7048). – P.25.
10. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P.248–254.
11. Chambers R.E., Bullock D.G., Whicher J.T. External quality assessment of total urinary protein estimation in the United Kingdom. *Ann. Clin. Biochem.* – 1991. – Vol. 28 (Pt 5). – P.467-473.



ПРОБЛЕМЫ ПАТОЛОГИИ УРОГЕНИТАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

12. Folin O., Denis W. The Quantitative Determination of Albumin in Urine. *J. Biol. Chem.* – 1914. – Vol. 18. – P.273-276.
13. Jazayeri A., Chez R.A., Porter K.B., Jazayeri M., Spellacy W.N. Urine protein dipstick measurements. A screen for a standard, 24-hour urine collection. *J. Reprod. Med.* – 1998. – Vol. 43 (8). – P.687-690.
14. Kingsbury F.B., Clark C.P., Williams G., Post A.L. The rapid determination of albumin in urine. *J. Lab. Clin. Med.* – 1926. – Vol. 11. – P.981-989.
15. Leong S.O., Lui K.F., Ng W.Y., Thai A.C. The use of semi-quantitative urine test-strip (Micral Test) for microalbuminuria screening in patients with diabetes mellitus. *Singapore Med. J.* – 1998. – Vol. 39 (3). – P.101-103.
16. Marshall S.M., Shearing P.A., Alberti K.G. Micral-test strips evaluated for screening for albuminuria. *Clin. Chem.* – 1992. – Vol. 38 (4). – P.588-591.
17. Minetti E.E., Cozzi M.G., Granata S., Guidi E. Accuracy of the urinary albumin titrator stick «Micral-Test» in kidney-disease patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* – 1997. – Vol. 12 (1). – P.78-80.
18. Nakamura J., Yakata M. Urine contains an inhibitor for turbidimetric determinations of protein. *Clin. Chem.* – 1982. – Vol. 28(11). – P.2294-2296.
19. Nishi H.H., Elin R.J. Three turbidimetric methods for determining total protein compared. *Clin. Chem.* – 1985. – Vol. 31. – P.1377-1380.
20. Popenoe E.A. Characterization of a glycoprotein in the urine of patients with proteinuria. *J. Biol. Chem.* – 1955. – Vol. 217. – P.61-66.
21. Pugia M.J., Lott J.A., Kajima J., Saambe T., Sasaki M., Kuromoto K., Nakamura R., Fusegawa H., Ohta Y. Screening school children for albuminuria, proteinuria and occult blood with dipsticks. *Clin. Chem. Lab. Med.* – 1999. – Vol. 37 (2). – P.149-157.
22. Ruttimann S., Clemencon D. Usefulness of routine urine analysis in medical outpatients. *J. Med. Screen.* – 1994. – Vol. 1 (2). – P.84-87.
23. Sapan C.V., Lundblad R.L., Price N.C. Colorimetric protein assay techniques. Review. *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 1999. – Vol. 29. – P.99-108.
24. Watanabe N., Kamei S., Ohkubo A., Yamanaka M., Ohsawa S., Makino K., Tokuda K. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin. Chem.* – 1986. – Vol. 32 (8). – P.1551-1554.
25. Wilson P., Clarke F.V., Cutler R.R., Merrett J.O., Jenks P. Usefulness of urine dipstick tests. False negative results may occur in the absence of antibiotics, ketones, and glucose. *BMJ.* – 1996. – Vol. 313 (7063). – P.1009-1010.
26. Yosselson-Superstine S., Sinai Y. Drug interference with urine protein determination. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1986. – Vol. 24 (1). – P.103-106.

