

Определение общего белка в моче – возможности, особенности и приборная часть

К.А. Щетникович, кафедра клинической лабораторной диагностики РМАПО

Е.Н. Ованесов, И.М. Овчинников, НПП «Техномедика»

Определение общего белка в моче (ОБМ) - один самых важных анализов производимых в клинико-диагностических лабораториях. Более 30% анализов, выполняемых в клинико-диагностических лабораториях – это анализ мочи на общий белок. Этот показатель важен для диагностики кардиологических, эндокринологических заболеваний и заболеваний почек. В последние годы много внимания уделяется также проблеме выявления малых количеств альбумина в моче, так называемой микроальбуминурии. Клиническое значение микроальбуминурии заключается в первую очередь в том, что её обнаружение у больных сахарным диабетом является наиболее ранним и достоверным признаком развития диабетического гломерулосклероза.

Задача количественной оценки микроальбуминурии в настоящее время принципиально решена. Большинство из известных методов основаны на иммунологической реакции между альбумином и антителами к нему. Это радиоиммунологический анализ (RIA), иммуноферментный анализ (ИФА), радиальная иммунодиффузия, иммунотурбидиметрия. Все эти методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, выбор конкретного из них определяется, аналитическими и, в большей степени, финансовыми возможностями лаборатории. Широкому распространению этих методов оценки выраженности альбуминурии препятствует их высокая стоимость.

Наиболее распространенным в широкой лабораторной практике является турбидиметрический метод, основанный на снижении растворимости белков мочи вследствие образования суспензии взвешенных частиц под воздействием сульфосалициловой кислоты (ССК метод). В силу дешевизны реактива ССК и возможности приготовления рабочего реагента в лабораторных условиях данный метод используют около 90% КДЛ России. Этот метод известен почти сто лет и аналитики и клиницисты в значительной степени ориентированы на его аналитические свойства.

В последнее время распространение получил также новый метод определения белка, основанный на способности красителя пирогаллолового красного образовывать комплексы с белками (ПГК метод).

При переходе на новый ПГК метод лаборатории столкнулись с неожиданной проблемой сопоставимости результатов, полученных методами ССК и ПГК. При малых концентрациях белков метод с сульфосалициловой кислотой дает в 2-3 раза меньшие значения, чем пирогаллоловый метод. Параллельные исследования двумя методами показали существенные, до 3-х, раз уменьшенные значения концентрации. Некоторые специалисты объясняют это более высокой чувствительностью пирогаллолового метода, и считают метод с сульфосалициловой кислотой неприемлемым для лабораторных исследований.

Несложный анализ показывает ошибочность таких выводов.

В рассматриваемой проблеме выделим три основных фактора:

1. Методические особенности определения ОБМ
2. Стандартизация методов определения ОБМ
3. Технологические особенности методов определения ОБМ

Методические особенности.

Основной характеристикой методов является чувствительность ко всем белкам, содержащимся в моче. Спектр белков мочи насчитывает более 30 белков, вот часть из них (Эммануэль В.Л., С-Пб Государственный медицинский университет): β_2 -микроглобулин, лизоцим, α_2 -микроглобулин (ретинол-связыв.), легкие цепи иммуноглобулинов, α_1 -микроглобулин, β_2 -гликопротеид, α_1 -кислый гликопротеин (орозомукоид), α_1 -кислый гликопротеин (орозомукоид), α_1 -антитрипсин, α_1 -антитрипсин, Gc-глобулин, альбумин, лаптоглобин, трансферрин, IgG, IgA(плазменный), продукт расщепления фибриногена, IgA

секреторный, α_2 -макроглобулин, IgM, β -липопротеид. Белок мочи в норме состоит примерно на 40% из альбумина, кроме того, в нем 10% IgG, 5% легких цепей и 3% IgA. Остальную часть составляют другие белки

Понятно, что идеальный метод определения ОБМ должен быть одинаково чувствителен ко всем белкам спектра.

Однако это не так.

Например, под воздействием ССК светорассеивающая способность частиц, образующихся из альбумина, в четыре раза превосходит светорассеяние частицами, образующимися в тех же условиях из глобулинов. Другими словами, поглощение света, обусловленное присутствием глобулинов, составляет 25% от поглощения обусловленного альбумином.

Основным недостатком этого метода является различная чувствительность ССК по отношению к разным белкам, содержащимся в моче. К недостаткам так же относится интерференция результатов анализа белка с небелковыми компонентами мочи (йод, сульфаниламиды, пенициллин) и необходимость фильтрации или центрифугирования пробы при наличии первичной мутности мочи. К тому же взвесь преципитатов белка нестабильна и при высокой концентрации белка (несколько г/л) происходит довольно быстрая (минуты) седиментация преципитатов. Другими источниками ошибок при использовании данного метода являются: низкая устойчивость комплекса, образующегося при взаимодействии белка с ССК; сложная, нелинейная зависимость интенсивности мутности реакционной смеси от концентрации белка; значительное влияние некоторых компонентов мочи на результаты определения белка, за счет сильного разбавления реагента (отношение объемов анализируемой пробы мочи и раствора ССК - 1:3); неполная преципитация ряда белков анализируемой пробы, приводящая к заниженному результату определения общего белка.

Для метода ПГК поглощение комплекса глобулины-краситель составляет 70% от величины поглощения комплекса альбумин-краситель, для легких цепей иммуноглобулинов эта величина колеблется от 52% до 68%. Образующийся комплекс устойчив к воздействию многих соединений, в том числе лекарственных препаратов, солей, оснований, кислот.

Отсюда следует, что значение измеренной концентрации белковой смеси, состоящей из альбуминов и глобулинов, полученное при использовании альбуминового калибратора будет ниже для ССК метода, по сравнению с ПГК методом, причем, разница будет тем больше, чем больше доля глобулинов.

Стандартизация методов определения ОБМ

Результат определения ОБМ напрямую зависит от белкового состава калибратора.

Для нивелирования различной чувствительности ПГК к разным типам белков для калибровки этого метода используют комбинированный калибратор, содержащий альбумин и глобулины в соотношении, характерном для стандартных образцов мочи.

Так, в наборы ПГК, выпускаемые фирмой Вектор-Бест, включается составной калибратор с соотношением А/Г равным 7/3.

Наборы же ССК чаще всего содержат чисто альбуминовый калибратор, что заведомо занижает результат.

Таким образом, для улучшения сопоставимости ССК и ПГК методов желательно использовать хотя бы одинаковые комбинированные калибраторы.

Селективность методов определения общего белка моче, приводит к тому, что калибровочный график зависит от белкового состава калибратора. В особенности эта зависимость выражена для ССК метода. На рисунке 1 представлены два калибровочных графика для калибратора из чистого альбумина в диапазоне концентраций 0,02 – 0,6 г/л и для калибратора из смеси альбумина и глобулина в отношении А/Г=7/3 в диапазоне концентраций 0,2 -2 г/л. Как видно из рисунка 1 разница очень существенна. В совпадающих

концентрациях калибраторов 0,2 и 0,6 г/л фактор (наклон калибровочных графиков в линейном масштабе) для альбумин-глобулинового калибратора в 2 раза больше, чем для альбуминового. При меньших концентрациях различие может быть больше из-за нелинейности графика при малых концентрациях (на рисунке не видно).

Это означает, что при калибровке альбуминовым калибратором в присутствии глобулинов в моче результат определения общего белка в моче для ССК метода будет занижен, как минимум в 2 раза за счет различной чувствительности ССК к альбумину и глобулинам.

Поскольку обычно соотношение альбумина и глобулинов в моче близко к 7/3, точность измерений будет существенно выше при использовании альбумин-глобулинового калибратора.

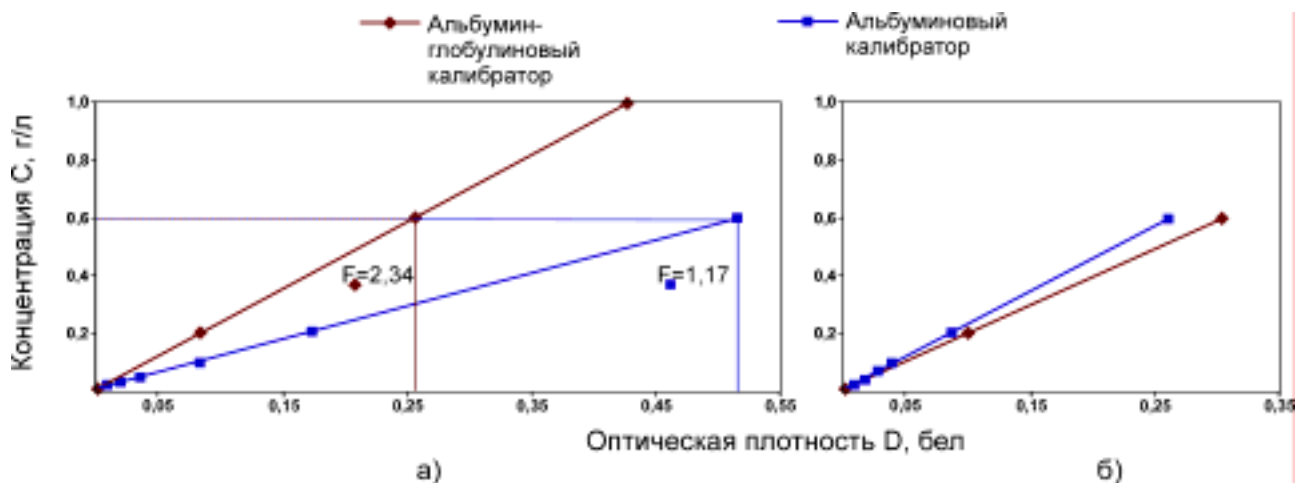


Рисунок 1. Калибровочные графики: а-ССК метод, б-ПГК метод

Рисунок 1.

Для пирогаллолового метода калибровочные графики с калибраторами разного белкового состава приведены на рисунке 2. Как видно из этих графиков влияние белкового состава калибратора существенно слабее, а калибровочный график прямолинеен.

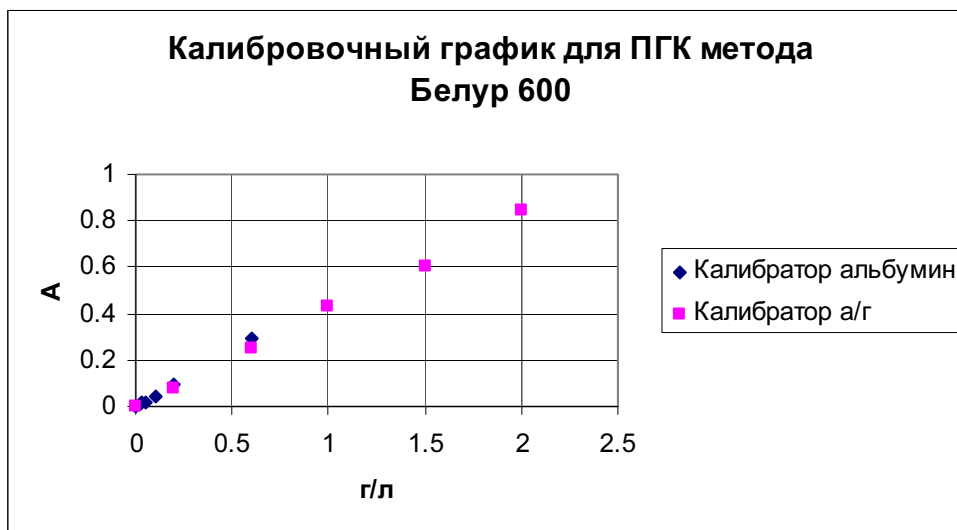


Рисунок 2.

Технологические особенности.

Особенности протекания реакции в методах ССК и ПГК.

В методе ССК динамика увеличения оптической плотности смеси реагент-моча существенно зависит от концентрации белка в моче (рисунок 3). А именно, чем меньше концентрация белка, тем позже достигается максимум оптической плотности. Чем больше концентрация белка, тем раньше начинается осаждение преципитатов белка и соответственно уменьшение оптической плотности. При этом кинетика зависит так же и от белкового состава мочи. Отсюда вывод: чтобы точность была приемлемой время инкубации от смешивания пробы и реагента до выполнения измерения оптической плотности должно строго выдерживаться. Белковый состав калибратора должен быть близок к белковому составу измеряемой мочи. Обычно рекомендуемое время инкубации для ССК составляет 5 минут. В этих условиях трудно обеспечить высокую точность определения, в особенности, определение низких концентрации белка. В пособии рекомендуется увеличить время инкубации до 20 минут, тогда вариация времени инкубации в несколько минут слабо влияет на точность результата. Однако увеличение времени инкубации с 5 до 20 минут увеличивает долю анализов с высокой концентрацией белка, у которых может начаться падение оптической плотности после достижения максимума из-за седиментации преципитатов и получение ложноотрицательных результатов.

Для пирогаллолового метода, кинетика увеличения оптической плотности практически не зависит от концентрации белка и требования к временному режиму проведения анализа невысокие (рисунок 4).

Оценим ошибку определения общего белка методом ССК при наименьших концентрациях, обусловленную временным фактором. Из рисунка видно, что при малых концентрациях при рекомендуемом времени инкубации 5 минут градиент изменения оптической плотности составляет 0,058 относительных единиц оптической плотности в минуту. Если измерение производится в промежутке 3-7 минут, то ошибка составит до 11,6%.

Оценим ошибку, связанную с различием оптической плотности для различных концентраций при времени инкубации 5 минут. Если при калибровке использовался калибратор с минимальной концентрацией 0,05 г/л, то для концентрации 0,02 г/л относительная ошибка составит примерно $(0,9 - 0,7)/0,7 \sim 0,26$ или 26%. **Таким образом, результат измерения может быть занижен за счет этих ошибок в 1,116*1,26=1,4 раз. С учетом ошибки, связанной с выбором калибратора (рисунок 1) получим суммарную ошибку $1,4*2=2,8$ (раза).**

Примерно такое различие получили лаборатории, сравнивая результаты исследования традиционным методом ССК с альбуминовым калибратором и методом ПГК с альбумин-глобулиновым калибратором.

Снизить ошибку в методе ССК при малых концентрациях, связанную с временным фактором, можно увеличив время инкубации до 20-25 минут (рисунок 3).

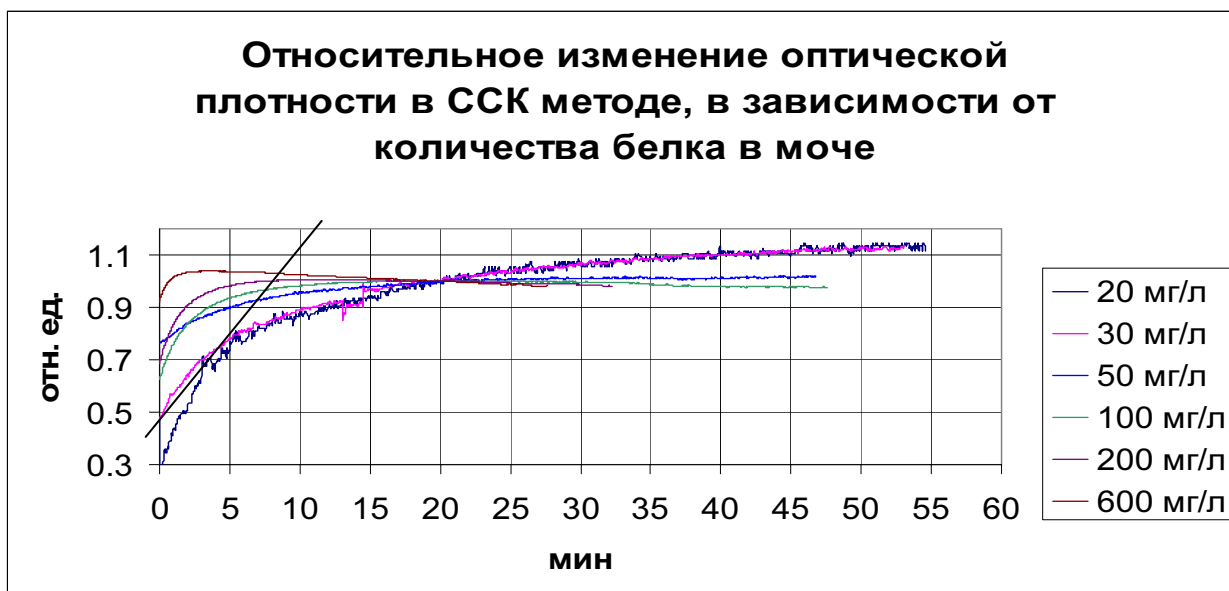


Рисунок 3.

Особенности технологии измерения.

Для метода ПГК существенным является осаждение белка на стенках кювет и пробирок. Практика показала, что стеклянные кюветы и пробирки, даже при старательном уходе уже через месяц интенсивной работы окрашиваются и становятся непригодными для измерений, особенно при малых концентрациях белка. Поэтому, для ПГК метода предпочтительнее использовать одноразовые пластиковые кюветы.

Для ССК метода никакого окрашивания стенок кювет не наблюдается, однако кюветы должны тщательно обрабатываться моющим раствором. Никаких следов на оптических поверхностях кювет оставаться не должно.

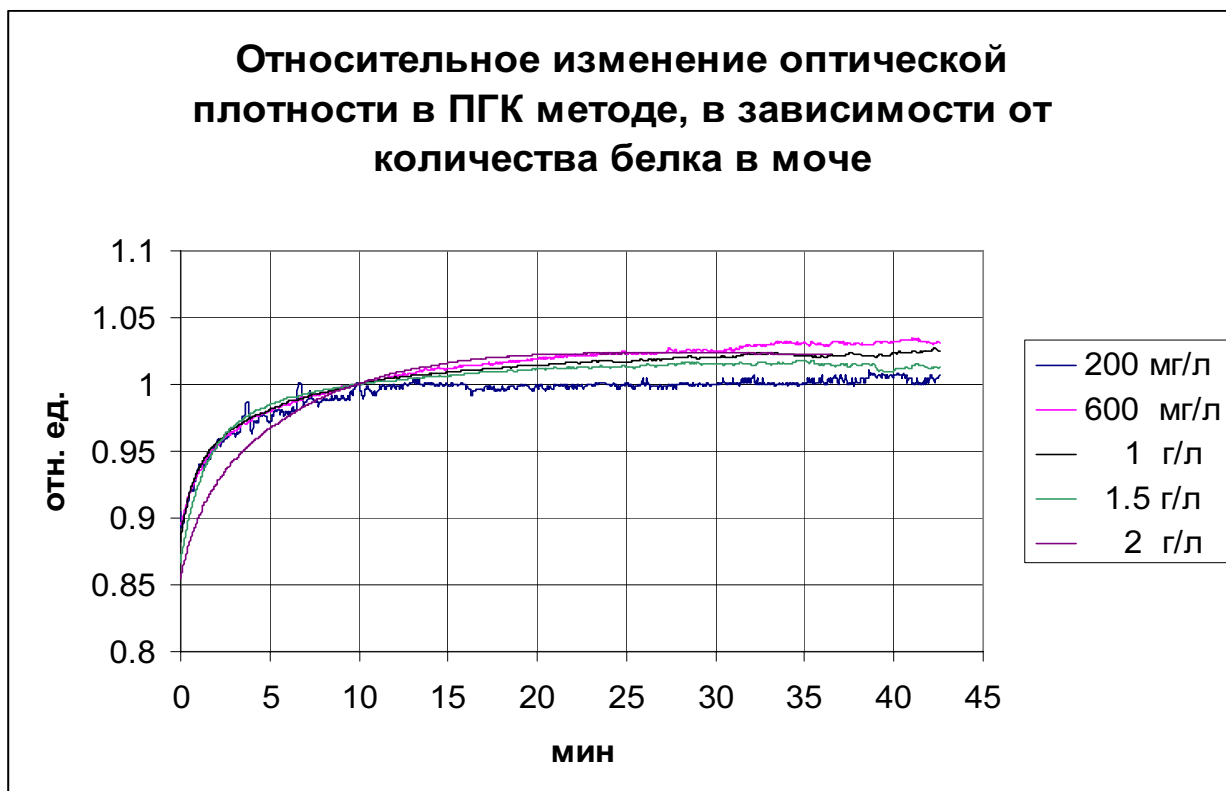


Рисунок 4.

Представленные данные позволяют сформулировать ряд правил определения общего белка в моче.

Если в вашей лаборатории используется ССК метод, тогда:

Правило № 1.

Используйте многоточечную калибровку.

Правило № 2

Если в вашем лечебном учреждении в качестве пограничного значения норма-патология установлено значение-Х г/л, например Х= 0.033 г/л, убедитесь, что калибровочный график для ССК включает это значение Х (например, есть калибровка для 0.02 г/л).

Правило № 3

Если есть возможность, то инкубируйте калибровочную пробу и пробу пациента примерно 20 минут.

Правило № 4

Если есть возможность, используйте для калибровки альбумин-глобулиновый калибратор.

Точное соблюдение временного интервала инкубации необходимое для ССК метода трудно обеспечить при большом объеме проведения анализов белка. Использование калибровочного графика для определения концентрации белка так же снижает производительность. Поэтому ССК метод можно рекомендовать для лабораторий с ограниченным бюджетом и при небольшом объеме производимых анализов.

Использование регента с ПГК и метода Брэдфорд можно рекомендовать при большом объеме выполнения анализов и повышенным требованиям к точности результата анализа.

Но, в этом случае необходимо жестко контролировать качество отмывки кювет из-за прокрашивания стенок или, лучше, использовать одноразовые кюветы.

При соблюдении рекомендации производителей реагентов все перечисленные методы определения общего белка в моче могут обеспечить, по крайней мере, высокую воспроизводимость результатов измерений. В таблице 1 приведены результаты оценки воспроизводимости определения общего белка в моче ССК методом анализатором Белур 600 по контрольным материалам производства Био-Рад и Вектор Бест.

Таблица 1.

| Контрольный материал | Био рад | Био рад | Вектор Бест | Вектор Бест |
|------------------------|-----------|-----------|-------------|-------------|
| Среднее значение | 0.41 г/л | 0.65 г/л | 0.14 г/л | 0.97 г/л |
| Стандартное отклонение | 0.005 г/л | 0.009 г/л | 0.005 г/л | 0.011 г/л |
| CV% | 1.2 % | 1.4 % | 3.8 % | 1.1 % |

В таблице 2 приведены результаты оценки воспроизводимости определения общего белка в моче реагентом ПГК-Ново, производства Вектор Бест анализатором Белур 600 по контрольным материалам производства Био-Рад и Вектор Бест.

Таблица 2.

| Контрольный материал | Био рад | Био рад | Вектор Бест | Вектор Бест |
|------------------------|------------|-----------|-------------|-------------|
| Среднее значение | 0.272 г/л | 0.739 г/л | 0.101 г/л | 0.529 г/л |
| Стандартное отклонение | 0.0013 г/л | 0.006 г/л | 0.0049 г/л | 0.025 г/л |
| CV% | 0.5 % | 0.75 % | 4.9 % | 4.7 % |

В таблице 3 представлены общие характеристики некоторых методов определения ОБМ.

Таблица 3.

| Метод | Рабочая длина волны, нм | Пробоподготовка | Проба:реагент | Время инкубации; минут | Стабильность окраски; минут | Диапазон концентраций без разведения;г/л | Селективность альбумин/глобулин | Прокрашивание кюветы | Стоимость реагента | Калибровка |
|----------|-------------------------|-----------------|---------------|------------------------|-----------------------------|--|---------------------------------|----------------------|--------------------|------------|
| ССК | 340-700 | Есть | 1:3 | 5-20 | 5-25 | 0-0.5; 0-1 | Высокая | Нет | Низкая | нелинейная |
| Брэдфорд | 590-600 | Нет | 1:25 | 15-30 | 30 | 0-1.5 | Низкая | Сильное | Средняя | линейная |
| ПГК | 590-620 | Нет | 1:10-1:100 | 10-30 | 30-60 | 0-1; 0-10 г/л | Низкая | Слабое | Средняя | линейная |

Исходя из своих потребностей в точности измерений, производительности, финансовых и кадровых ресурсов лаборатории могут выбирать оптимальный для них метод определения общего белка в соответствии с таблицей 3.

Представленные выше данные исследований получены на универсальном полуавтоматическом анализаторе общего белка в моче АОБМФ-01 Белур-600, выпускаемом НПП “Техномедика” (рисунок 5). Белур 600 позволяет производить измерения любым из рассмотренных методов. Анализатор измеряет оптическую плотность продуктов реакции пробы и реагента на длине волны 600 нм.

Белур 600 содержит открытую систему, использующую реагенты любых производителей. Шкала концентраций прибора от 0 до 10 г/л, погрешность фотометрической шкалы 0,001 г/л.

Для реагентов с линейной калибровкой анализатор может быть прокалиброван по стандарту либо по фактору. Во время калибровки Белур 600 отображает значение калибратора и вычисленный фактор, а также оптическую плотность калибратора, что позволяет оператору оценить правильность калибровки и избежать грубых ошибок. После калибровки, результат измерения опытной пробы автоматически отображается на дисплее в единицах концентрации белка в моче, либо мг/л либо г/л, в зависимости от параметров пробы.



Рисунок 5. Анализатор общего белка в моче Белур 600.

Время фотометрирования составляет 1 секунду, время подготовки прибора к работе – 0 секунд. Белур 600 обеспечивает отображение на дисплее, как концентрации, так и оптической плотности пробы без перенастройки прибора, что важно для нелинейной калибровки при методе ССК. Кроме того, при калибровке могут использоваться калибраторы с любой концентрацией белка. Анализатор снабжен системой автоконтроля оптических параметров, обеспечивающей стабильные измерения без подстроек весь срок службы фотометра. Контроль работоспособности прибора производится прилагаемыми

оптическими мерами, без использования контрольных материалов. Белур 600 питается от сети через адаптер и от внутренних батарей, ресурса которых достаточно для многолетней работы. Обслуживание анализатора доступно медперсоналу с минимальными требованиями к квалификации без привлечения инженерных служб.

Белур 600 хорошо зарекомендовал себя в самых различных лабораториях - в областных и городских больницах, в поликлиниках и в ЦРБ. Получены положительные отзывы от главных и ведущих специалистов из различных регионов: из Алтайского края, из Москвы, из Петербурга и из Ленинградской области, из Смоленской области, из Вологодской области, из Тамбовской области, из Ростовской области, из Республики Башкортостан, из города Когалым.