

Прогресс отечественной лабораторной диагностики в оценке протеинурии.

Эмануэль В.Л., заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова

Значительное распространение заболеваний почек, а также их клиническая малосимптомность и быстрое прогрессирование, приводящее к инвалидизации молодого наиболее работоспособного контингента населения, обуславливает пристальное внимание к лабораторным методам диагностики. Общий анализ мочи остается самым частым исследованием в лабораториях России, а протеинурия является одним из наиболее информативных лабораторных симптомов поражения почек и мочевыводящих путей. Порог чувствительности большинства клинических методов исследования протеинурии не позволяет, как правило, выявлять содержание белка в моче здоровых людей. При более выраженной, патологической протеинурии в мочу попадает широкий спектр протеинов. При этом оценка величины патологической протеинурии зависит от специфичности используемых методов к различному спектру уропротеинов. Определение общего белка является некоторым компромиссом, так как не существует метода, который позволил бы определить весь спектр уропротеинов.

Определение белка в моче с помощью тест-полосок относится к полуколичественным методам. Обычно тест-полоски не могут определить концентрацию альбумина в моче менее 300 мг/л, в то время как при микроальбуминурии, которая наблюдается не только при первичном поражении почек, но и является ранним признаком вторичного поражения нефрона при широко распространенных заболеваниях: сахарном диабете, гипертонической болезни и т.д., требуется определение концентраций от 30 мг/л.

Для количественной оценки белка в моче наиболее чувствительными и точными являются фотометрические методы определения общего белка мочи, основанные на специфических цветных реакциях белков – по *биуретовой реакции* и метод *Лоури*, а также методы, основанные на способности различных *красителей* образовывать комплексы с протеинами (Понсо S, Кумасси бриллиантовый синий и пирогаллоловый красный).

Среди методов, основанных на способности белков к денатурации под влиянием различных физических и химических факторов, наиболее широко используется проба с сульфосалициловой кислотой.

В фундаментальной методической работе, выполненной Б.Ю. Альштулером, С.С. Раковым и Г.А. Ткачевым [1], изучена чувствительность и специфичность применяемых методов измерения уровня протеинурии. Обнаружено сильное влияние соотношения альбуминов и глобулинов A/G исследуемого образца на ошибку определения концентрации общего белка в методе Лоури, реагенты которого обладают большим сродством к глобулинам, и в методах Брэдфорд, сульфосалицилового и пирогаллолового, в которых большее сродство к альбуминам. Биуретовый метод одинаково выявляет белки различной структуры, но обладает недостаточной аналитической чувствительностью. Наиболее достоверные результаты получены для пирогаллолового метода при $A/G > 2$ для калибратора и опытных проб. Это связано с тем, что в большинстве случаев белковый спектр характеризуется соотношением A/G от 0,6 до 3,0. Сочетанное определение концентрации белка двумя различными методами с использованием одного калибратора полностью устраняет аналитическую ошибку:

$$D = 0,4799 B + 0,5230 L; \quad D = 1,0748 P - 0,0986 B; \quad D = 1,5484 B - 0,4825 S;$$

$$D = 1,0104 P - 0,0289 S; \quad D = 0,2167 S + 0,7579 L; \quad D = 0,8959 P + 0,0845 L$$

где: D - «истинное» содержание белка в моче, B, L, P и S – результаты измерения методами Кумасси, Лоури, пирогаллоловым и сульфосалициловым соответственно.

Недопустимая ошибка присуща сульфосалициловому методу при калибровке по водному раствору альбумина, что связано с занижением результата в присутствии глобулинов. Уменьшение аналитической ошибки унифицированного метода до 15 раз может быть достигнуто за счет определения белка по двум калибровочным графикам с последующим пересчетом результата:

$$D = 0,377 X + 0,623 Y,$$

где X и Y – результаты измерений относительно калибратора с минимальным значением A/G и относительно водного раствора альбумина. При $2 < A/G < 16$ отклонение от правильного результата с использованием данной методологии составляет не более 20%.

Однако можно порадоваться не только аналитическому прогрессу отечественной лабораторной диагностики, но и технологическому прорыву, что дает возможность широкого внедрения прогрессивных методов в широкую лабораторную практику. В этом году успешно завершились испытания реагентов для метода пирогаллолового красного, разработанных фирмой «Вектор-Бест» и

содержащих калибратор с оптимальным соотношением $A/G = 7/3$, и фотометрического анализатора общего белка в моче «Белур 600», разработанного НПП «Техномедика».

Анализатор «Белур 600» имеет рабочую длину волны 600 нм и предназначен для использования методов пирогаллолового, сульфосалицилового и Кумасси. Определение концентрации на анализаторе могут проводиться как по оптической плотности с ручным пересчетом по фактору или по калибровочному графику, так и с автоматическим пересчетом по фактору. Численное значение фактора может быть взято из инструкции на реагент и введено в прибор, а может быть определено автоматически по измерению калибратора или стандартного образца. При автоматическом определении пользователю дана возможность измерения от 1 до 15 образцов, что увеличивает точность определения до 4 раз. Значение концентрации представляется на дисплее с минимальным дискретом 1 мг/л в диапазоне от 0 до 999 мг/л и с дискретом 0,01 г/л в диапазоне от 1 до 10 г/л. Конструктивно «Белур 600» выполнен в виде малогабаритного портативного прибора размером 178x128x43 мм, подобно известному гемоглобинометру «МиниГЕМ».

В ходе испытаний были поведены параллельные измерения (РНЦХ РАМН, Москва) проб пациентов пирогаллоловым методом (Вектор-Бест) на «Белуре 600» и биохимическом анализаторе «Konelab 30». Коэффициент корреляции составил 0,998. Нелинейность в диапазоне от 0,1 до 2 г/л не превысила 5%.

Контроль сходимости (ГКБ им. С.П. Боткина Москва), проведенный пирогаллоловым методом с использованием образцов контрольной мочи (Медлакор-СП) при концентрации 0,8 г/л и $n=15$ показал $CV=3\%$ и $B=2,5\%$. При определении правильности для уровня 0,4 г/л $CV=4,34\%$, $B=1,25\%$. CV воспроизводимости CV изо дня в день при измерении контрольной мочи в течение 27 дней составила 4,98%.

CV воспроизводимости в одной серии ($n=10$) для пирогаллолового метода по контрольным материалам производства Био-Рад и Биосистемс не превысила 10%, погрешность правильности – 13% (РКНПК МЗ РФ).

Для метода Кумасси (набор Bio-Rad) ошибка определения концентрации общего белка по калибровочным образцам фирмы Вектор-Бест в диапазоне от 0,05 до 1 г/л не превышает 11%, для сульфосалицилового метода с теми же калибраторами – 18% в диапазоне от 0,03 до 1 г/л (данные фирмы Вектор-Бест).

Результаты определения белка в моче пациентов с использованием анализатора «Белур 600» пирогаллоловым и сульфосалициловым методами показали достоверную корреляции между собой, и с результатами определения унифицированным биуретовым методом (ГМУ им. академика И.П. Павлова, С-Пб).

Таким образом, погрешности измерения на анализаторе «Белур-600» находятся в допустимых пределах и соответствуют требуемым аналитическим характеристикам (приказ МЗ РФ №45 от 07.02.2000) во всем диапазоне концентраций.

Полученная точность исследования протеинурии на приборе «Белур 600» может использоваться и при оценке суточной протеинурии, ориентированной на уровень концентрации креатинина в разовой порции мочи. Отношение белок/креатинин (мг/мг) приблизительно соответствует суточной протеинурии (г/сут на 1,73 кв. м поверхности тела). У здоровых лиц это соотношение меньше 0,2, а при патологии колеблется в пределах 0,2-3,5, т.е. увеличивается по мере увеличения протеинурии. Например, если в пробе мочи обнаружен белок с концентрацией 1 г/л, а концентрация креатинина равна 11 ммоль/л, то с учетом коэффициента пересчета ммоль→мг (88), суточная протеинурия будет приблизительно соответствовать: $1:11/88=8\text{г/сут}$.

Приведенные данные показывают, что использование анализатора «Белур 600» для определения общего белка в моче наиболее эффективно с реагентами пирогаллолового метода и калибратором ($A/G=7/3$) фирмы Вектор-Бест. Методы Кумасси и сульфосалициловый также дают приемлемые результаты при калибровке с $A/G=7/3$. Повысить точность определений можно получить, используя данные исследований различными методами [1].

В заключении необходимо отметить, что диагностическая значимость протеинурии оценивается в совокупности иных признаков мочевого синдрома.

Литература.

1. Б.Ю. Альтшулер, С.С. Раков, Г.А. Ткачев. Методические аспекты лабораторного определения низких концентраций белка в биологических жидкостях (опыт применения математического анализа). Вопросы медицинской химии, № 4, 2001