

ЗАКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО «ВЕКТОР-БЕСТ»

В.И. Пупкова, Л.М. Прасолова

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МОЧЕ И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Информационно-методическое пособие

Кольцово, 2007

В.И. Пупкова, Л.М. Прасолова. Определение белка в моче и спинномозговой жидкости. – Кольцово, 2007. – 43 с.

В настоящем пособии представлены методы определения белка в моче и спинномозговой жидкости (СМЖ) наиболее широко используемые в клинических лабораториях, а также описание наборов реагентов, производимых с этой целью в ЗАО «Вектор-Бест». Особое внимание уделено рассмотрению факторов, влияющих на правильность определения белка различными методами, среди которых в России наиболее распространенным является турбидиметрический метод, основанный на преципитации белка сульфосалициловой кислотой, а за рубежом – колориметрический метод с использованием в качестве красителя пирогаллолового красного. В пособии дается также сравнение аналитических характеристик коммерческих наборов реагентов для определения белка в моче и СМЖ различных фирм-производителей. Выбор любого из этих наборов для применения в конкретной лаборатории может определяться его характеристиками, задачами, стоящими перед лабораторией, а также ее оснащенностью необходимым оборудованием. Основная цель пособия – помочь специалистам клинических лабораторий сориентироваться в многообразии методов и наборов реагентов для анализа белка в моче и СМЖ и сделать правильный выбор.

© В.И. Пупкова, Л.М. Прасолова
© «Вектор-Бест», 2007

ВВЕДЕНИЕ

Общий анализ белка в моче – одно из наиболее массовых исследований, выполняемых в клинико-диагностических лабораториях. Повышенное содержание белка в моче (более 150 мг/л) – протеинурия – часто впервые выявляется при профилактических осмотрах сотрудников предприятий, обследовании школьников, анализе мочи стационарных и поликлинических пациентов. Для правильной постановки диагноза и проведения адекватного лечения необходимо использовать точные методы качественной и количественной оценки белка. Несмотря на массовость проведения анализов и кажущуюся простоту исследования, точное определение белка в моче является сложной задачей. Трудности ее решения обусловлены рядом причин: присутствием в моче многих соединений (в частности, лекарств), искажающих результаты анализа; низким содержанием белка в моче здорового человека, сопоставимым с чувствительностью методов; широким варьированием белкового состава мочи при различных заболеваниях. Большое значение имеет также преаналитическая фаза анализа – сбор, обработка и хранение образцов мочи, которой зачастую не уделяется достаточного внимания [1].

Метод, предназначенный для использования в лаборатории, должен удовлетворять следующим критериям [2]:

- линейная зависимость оптической плотности раствора от содержания в нем белка должна быть в широком диапазоне концентраций;
- высокая чувствительность и хорошая воспроизводимость результатов;
- высокая специфичность определения белка в различных по составу образцах мочи, содержащих примеси лекарственных и других препаратов (отсутствие интерференции);
- простота и удобство исполнения;

- свободная адаптация к автоматическим анализаторам различного типа;
- приемлемая стоимость реагентов.

Наибольшие методические сложности представляет анализ образцов мочи с низким содержанием белка и выбор адекватного калибровочного материала. На эти вопросы должно быть обращено особое внимание при постановке анализов в лабораториях.

Для количественного определения белка в моче в клинических лабораториях используют в основном два типа методов: турбидиметрические и колориметрические.

1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ И СМЖ

1.1. Турбидиметрические методы

Турбидиметрические методы основаны на преципитации белка различными химическими агентами: сульфосалициловой кислотой (ССК), трихлоруксусной кислотой (ТХУ), бензетоний хлоридом [2–6]. Метод с использованием бензетония хлорида обеспечивает получение стойкой суспензии в щелочной среде. По своей чувствительности он сравним с биуретовым методом, а результаты определения белка мало зависят от соотношения альбумина и глобулина в пробе. Метод адаптирован к автоматическому анализатору, но из-за низкой чувствительности он не нашел широкого применения в лабораторной практике. ТХУ, применяемая для преципитации белка, обеспечивает меньшую по сравнению с ССК чувствительность и имеет высокую стоимость реактива, поэтому ее применение в клинических лабораториях также ограничено [2]. Метод ССК, разработанный еще в 1926 г. F.V. Kingsbury с соавторами [3], до сих пор остается самым распространенным в России. Основные его преимущества состоят в простоте выполнения анализа, доступности реактива, возможности приготовления реагента в лабораторных условиях, что, в целом, и обеспечивает привлекательность и экономичность анализа.

В основе всех турбидиметрических методов лежит изменение интенсивности рассеянного света реакционной смеси, измеряемое в единицах оптической плотности, величина которой зависит от количества и размеров образующихся преципитатов. Реакция происходит следующим образом: молекулы белков мочи в кислой среде денатурируют, переходя из компактной глобулярной формы в рых-

лую нитчатую. При этом у белков резко возрастает способность к образованию конгломератов (реакция преципитации). Отдельные молекулы белка имеют размеры меньше длины волны видимого света, поэтому очень слабо его рассеивают. Эффективность рассеивания резко возрастает, когда размеры образующихся конгломератов молекул белка (преципитатов) приближаются к величине 0,6 мкм (длина волны зондирующего света).

Чем больше концентрация белка в моче, тем большее количество таких преципитатов образуется. Время окончания реакции зависит от концентрации белка, и эта зависимость носит сложный характер. На начальном этапе реакции образуется определенное количество мелких белковых частиц, затем они начинают слипаться в более крупные, при этом происходит два процесса: образование конгломератов и их оседание. В каждый конкретный момент времени в реакционной смеси имеется определенное количество центров рассеивания с различными размерами.

Оптическая плотность растет в процессе образования преципитатов; их осаждение после достижения конечной точки процесса приводит к снижению рассеивающих свойств смеси. Возникающая аналитическая погрешность тем больше, чем выше концентрация белка и чем дальше отстоит фиксированное время измерения от момента завершения реакции. При низких концентрациях белка скорость осаждения преципитатов замедлена, вследствие чего нарушается линейная зависимость между оптической плотностью и концентрацией белка. Ранняя остановка реакции приводит к заниженным результатам. Именно разная скорость осаждения преципитатов и обуславливает слабую воспроизводимость результатов анализа [4, 5].

Скорость осаждения преципитатов зависит от температуры и белкового спектра образца: уменьшение доли альбумина увеличивает устойчивость преципитатов во взвешенном состоянии. Знание состава белков мочи необходимо для достоверной оценки их общей концентрации. Моча человека в норме и патологии обычно содержит альбумин (А) и глобулины (Г) в отношении $A/G = 0,6-3,0$, поэтому результаты получаются правильными только при близком соответствии белкового состава мочи белковому составу калибратора. ССК определяет в основном альбумин, и общее содержание белка в пробе оказывается заниженным в присутствии глобулинов. Однако

белковый спектр мочи, представленный одним альбумином, встречается крайне редко – только при некоторых заболеваниях почек.

В качестве калибратора белка при постановке метода ССК обычно используют альбумин, что предопределяет заниженный результат анализа, и ошибка анализа может быть трехкратной. Очевидно, что такие погрешности недопустимы и могут привести к тому, что у двух пациентов с совершенно различным содержанием белка в моче лабораторно будут определяться одни и те же концентрации. Все вышеизложенное указывает на то, что в существующем ныне виде метод ССК неприемлем для оценки не только макропротеинурии, но и, что особенно важно, микропротеинурии.

Чтобы уменьшить ошибку до естественной аналитической вариации, белок целесообразно определять либо двумя разными методами с использованием одного калибратора, либо проводить расчет концентрации белка с использованием двух разных калибраторов, один из которых приготовлен на основе человеческой сыворотки с минимальным значением отношения А/Г, другой – водный раствор альбумина. Принцип подхода состоит в том, что разница между выявленными концентрациями зависит от отношения А/Г, зная которое можно вычислить ошибку определения по соответствующей формуле. Применение простейшего математического аппарата позволяет минимизировать аналитическую погрешность в диапазоне отношения А/Г от 2 до 16, отклонение от правильного результата составляет не более 20% [6].

Турбидиметрические методы плохо поддаются стандартизации [7], часто приводят к получению ошибочных результатов, но, несмотря на это, в настоящее время они широко используются в лабораториях из-за невысокой стоимости и доступности реактивов.

Основные факторы, приводящие к получению некорректных результатов при использовании ССК [4–6, 8]:

- низкая устойчивость комплекса, образующегося при взаимодействии белка с ССК;
- сложная, нелинейная зависимость оптической плотности реакционной смеси от концентрации белка;
- низкое отношение объема мочи и раствора ССК, равное 1:3, при котором велико влияние некоторых компонентов мочи на результаты анализа;
- существенные различия в белковом составе калибратора и анализируемой пробы мочи;

- неполная преципитация ряда белков анализируемой пробы, приводящая к заниженному результату определения общего белка.

Неточные результаты анализа приводят к ошибочному диагнозу и неправильному лечению больного. Метод ССК не пригоден даже для качественного определения белка, поэтому в развитых странах он практически не применяется; но в большинстве клинико-диагностических лабораторий России он все еще широко используется для определения белка в моче.

1.2. Колориметрические методы

К группе колориметрических методов определения белка относятся методы Лоури, биуретовый и методы, основанные на связывании белка с органическими красителями.

1.2.1. Методы Лоури и биуретовый

Метод Лоури, ставший уже классическим, обладает высокой чувствительностью: ~10 мг/л и широкой линейной областью измерения – до 1 г/л. Но результаты анализа значительно зависят от аминокислотного состава белка – интенсивность окрашивания различных белков может различаться в 300 и более раз, поэтому метод не нашел широкого применения в лабораторной практике [6, 9].

Биуретовый метод практически не зависит от аминокислотного состава белков, это реакция на пептидные связи белка: для протекания реакции достаточно наличие двух пептидных связей в молекуле исследуемого вещества, т. е. в реакцию могут вступать низкомолекулярные белки, начиная с трипептидов. Метод высокоспецифичен, поскольку в реакции не участвуют присутствующие в пробе соединения небелковой природы. Область линейной зависимости оптической плотности от содержания белка примерно в 10 раз шире, чем у метода Лоури, однако чувствительность – примерно в 10 раз ниже. Поэтому биуретовый метод не пригоден для определения низких концентраций белка.

Чувствительность биуретового метода может быть повышена различными модификациями. Одна из таких модификаций – биуретовый метод с осаждением и концентрированием белка – биурет-ТХУ, который считается референсным методом для определения белка в моче, но из-за большой трудоемкости анализа для

рутинных исследований в клинических лабораториях практически не применяется [7, 9–11].

1.2.2. Методы, основанные на связывании белка с органическими красителями

Одними из современных подходов для определения белка в моче являются методы, основанные на связывании белка с органическими красителями. Методы привлекают к себе внимание благодаря простоте и скорости исполнения, высокой чувствительности.

В ряде исследований было замечено, что при связывании белка с красителями спектр поглощения последних меняется. Эти данные натолкнули исследователей на мысль использовать указанные изменения для количественного определения белка без его выделения из растворов. Принцип методов основан на взаимодействии белка с органическим красителем, в результате чего образуется окрашенный комплекс, интенсивность окраски которого пропорциональна концентрации белка в пробе.

Данные методы выгодно отличаются от классических по ряду характеристик, и при правильном подборе калибратора они весьма перспективны для использования в лабораторной практике. Однако они также имеют некоторые недостатки, из которых прежде всего следует отметить различия в способности белков связывать те или иные красители. Этот недостаток отмечался выше и для классических методов, но если в том случае его можно было объяснить, предсказать и учесть, то механизм реакций, лежащих в основе связывания белков и органических красителей, пока еще недостаточно изучен.

Показана важная роль изоэлектрической точки и молекулярной массы белка, а также некоторых других факторов, обеспечивающих образование комплекса белок-краситель: ван-дер-ваальсовы силы и электростатическое взаимодействие с аминокислотными группами; участие в реакции основных аминокислот и т. д. Изучение механизма реакций, лежащих в основе связывания красителей с белками, поможет более точно понять причины различий в способности разных белков к связыванию и тем самым оценить границы применимости методов.

Другим существенным недостатком методов является нарушение пропорциональной зависимости между концентрацией не-

которых белков и оптической плотностью комплекса белок-краситель [9, 12, 13].

Наиболее широко используемыми красителями в лабораторной практике определения белка являются кумасси бриллиантовый голубой, бромфеноловый синий и пирогаллоловый красный.

1.2.2.1. Методы, основанные на связывании белка с кумасси бриллиантовым голубым

После опубликования в 1976 г. работы М.М. Bradford [14], применившей в качестве красителя кумасси бриллиантовый голубой G-250 (КБГ), бурное развитие получили методы определения белка, основанные на связывании белка с органическими красителями. Данный метод основывается на соединении аминокислотных групп в составе белка с сульфогруппами красителя, который при этом переходит из свободной формы с максимумом поглощения при 465 нм в связанную – с максимумом поглощения при 595 нм. Комплекс белок-краситель образуется очень быстро – в течение 2–5 мин, остается стабильным в течение часа и обладает высокой оптической плотностью. Чувствительность метода составляет 5–15 мг/л. Но данный метод не обеспечивает строгой пропорциональной зависимости между концентрацией белка и оптической плотностью раствора: линейная область определения составляет ~ 500 мг/л.

Кумасси бриллиантовый голубой G-250 обладает неодинаковой способностью связывать различные белки: если принять оптическую плотность (ОП) комплекса КБГ с альбумином за 100%, то такую же величину ОП имеют его комплексы с гемоглобином и трансферрином. Однако оптическая плотность комплекса КБГ с глобулинами, а также свободными κ - и λ -цепями иммуноглобулинов составляет всего лишь около 60% [2]. Частично эти недостатки устраняются с помощью некоторых модификаций метода [10–12].

Узкая линейная область измерения и значительная сорбция красителя на стенках кювет ограничивает применение метода в лабораторной практике для рутинных анализов и адаптации на автоматических анализаторах. Тем не менее ряд фирм производит коммерческие наборы реагентов с применением КБГ для определения белка в моче и спинномозговой жидкости (СМЖ), например фирма «Sigma» (США).

1.2.2.2. Методы, основанные на связывании белка с бромфеноловым синим

Практически одновременно с применением КБГ для определения белка в биологических жидкостях было предложено использовать краситель бромфеноловый синий (БФС) [15–17].

Раствор БФС в кислой среде имеет желтый цвет и максимум поглощения при 440 нм. При связывании красителя с белками катионная форма красителя изменяется на анионную, имеющую синюю окраску, а максимум поглощения сдвигается до 597 нм. Реакция связывания БФС с белками происходит при pH ~3,0 в течение 1 мин, стабильность окраски ~8 ч. Данный метод имеет меньшую чувствительность, чем КБГ. Характеристики метода: чувствительность – 30–70 мг/л, линейная область определения – до 1 г/л, коэффициент вариации результатов измерения не превышает 5%; стандартное отношение объема мочи и раствора БФС составляет 1:5. Метод прост, краситель БФС доступен и недорог, поэтому может широко применяться в клинических лабораториях [18–21].

Однако ни одна из известных нам зарубежных фирм не производит аттестацию белка в контрольных растворах мочи методом БФС. Это обусловлено тем, что БФС связывается преимущественно с альбумином, а не глобулинами и другими белками [20–23], поэтому определение белка в моче, содержащей сложную смесь белков, данным методом не обеспечивает необходимую точность анализа. Традиционное применение альбумина в качестве калибратора для расчета концентрации белка не способствует получению правильных результатов при анализе проб мочи. Это наглядно продемонстрировано в результате экспериментов по определению общего белка методом БФС в растворах, содержащих искусственные смеси альбумина и глобулинов с концентрацией белка 1 г/л (табл. 1).

Как следует из данной таблицы, при использовании альбумина в качестве калибратора выявление глобулинов не превышает 30%. В растворах, содержащих альбумин с глобулином, заниженным оказывается показатель общего белка. Применение калибратора, содержащего альбумин с глобулином, несколько повышает правильность определения, но, тем не менее, она остается неудовлетворительной.

Низкое отношение объема реагента и образца, равное 5 (1,0:0,2), усиливает влияние матрикса мочи и интерференцию различных

Таблица 1
Результаты определения общего белка методом БФС в искусственных смесях различного состава

Состав белковой смеси	Определение белка по калибратору, состоящему из			
	альбумина		70% альбумина и 30% глобулина	
	г/л	%	г/л	%
α -, β -, γ -глобулины	0,27	27	0,35	35
A/G = 0,5	0,53	53	0,69	69
A/G = 0,75	0,57	57	0,74	74
A/G = 1,0	0,65	65	0,84	84
A/G = 2,0	0,77	77	1,00	100
A/G = 3,0	0,82	82	1,07	107
Альбумин	1,00	100	1,30	130

соединений, искажая результаты анализа. А отсутствие контрольных растворов мочи, белок в которых аттестован данным методом, не позволяет оценить правильность определения белка данным методом. Таким образом, наборы реагентов, основанные на связывании белка с БФС, пригодны только для определения альбумина, а не общего белка.

1.2.2.3. Методы, основанные на связывании белка с пирогалловым красным

В 1983 г. Y. Fujita с соавторами [24] предложили использовать для определения белка в моче органический краситель – пирогалловый красный (ПГК). Прошло 20 лет, и метод занял одно из первых мест, постепенно вытесняя все другие. Коммерческие наборы реагентов с использованием ПГК выпускает множество фирм, среди которых «Bayer Diagnostics», «Beckman», «Biodirect», «Bicon Diagnostik», «Bio-Rad Laboratories», «Eurodiag», «Kone», «Merck», «Randox», «Serono», «Sentinel CH», «Sigma» и другие.

Оригинальный метод основан на связывании белка с красителем в кислой среде (pH ~2,5). Комплекс устойчив к воздействию многих соединений, в том числе лекарственных препаратов, солей, оснований, кислот. Поглощение комплекса глобулин-ПГК составля-

ет ~70% от величины поглощения комплекса альбумин-ПГК. Для легких цепей иммуноглобулинов эта величина составляет 52–68%.

Широкое применение в лабораторной практике метод определения белка с ПГК получил после его модификации N. Watanabe с соавторами [25]. Предложенная модификация позволила расширить линейную область измерения до 2 г/л, при этом надежность и воспроизводимость модифицированного метода соответствуют клиническим требованиям. Авторы подобрали состав буферного раствора и оптимизировали концентрацию ПГК таким образом, что реагент при минимальной абсорбции обеспечивает максимальную чувствительность определения. Влияние оксалатов, присутствующих в моче в концентрации более 3 ммоль/л и понижающих абсорбцию комплекса, устранили введением в реагент соответствующих компонентов.

При взаимодействии ПГК с белком пик поглощения красителя сдвигается с 467 на 598 нм. Максимальная абсорбция альбуминового комплекса наблюдается при pH, равном 2,5–3,0; глобулинового – при pH 2,25–2,50. Оптическая плотность повышается при повышении температуры от 12 до 25 °С и остается стабильной при ее изменении от 25 до 37°С. Аналитические характеристики метода: время выхода оптической плотности на постоянные величины – 10 мин; воспроизводимость результатов в диапазоне концентраций белка от 0,09 до 4,11 г/л – 1–3%; правильность определения альбумина – 97–102%, глобулина – 69–72%; чувствительность метода – 30–40 мг/л; стабильность реагента при хранении в защищенном от света месте – 6 мес. Вещества, присутствующие в моче, дают суммарную ошибку определения менее 2%.

Даже с проблемами, обусловленными различной степенью взаимодействия ПГК с разнородными белками, данный метод является лучшим среди других колориметрических методов; он прост и удобен для ручного исполнения в клинических лабораториях и адаптации на автоматических анализаторах [26].

Краситель пирогаллоловый красный не сорбируется на стенках кювет до концентрации белка 5 г/л, поэтому метод используется для определения белка на автоматических анализаторах (он адаптирован к анализаторам: Hitachi 717; Hitachi 726; Cobas Bio Analyzer) [27–30].

1.2.3. Влияние белкового спектра мочи на аналитическую погрешность колориметрических методов

Нормальные величины белка в моче для взрослых – 28–141 мг/сут. При различных заболеваниях белковый состав мочи может значительно меняться. Так, при нефротическом синдроме с минимальными изменениями в моче содержится в основном альбумин, при миеломной болезни – легкие цепи иммуноглобулинов – белки Bence Jones (BJ), тубулярной нефропатии – низкомолекулярные белки. Состав белков мочи при этих заболеваниях отличается различным соотношением альбумина и глобулинов (А/Г). Правильные результаты анализа получаются лишь в том случае, когда отношение А/Г анализируемого образца соответствует отношению А/Г калибратора. Влияние белкового спектра на аналитическую погрешность в значительной степени зависит от аминокислотного состава белков: альбумин и глобулины различаются по содержанию некоторых аминокислот: глутамина, серина триптофана, фенилаланина и цистеина. Увеличение доли альбумина при неизменной концентрации общего белка сопровождается возрастанием оптической плотности во всем диапазоне концентраций. Достоверные результаты с реагентом ПГК получаются при условии, что отношение А/Г калибратора и опытных проб >2; при меньшем отношении ошибка определения резко возрастает. При соблюдении этих условий метод ПГК является лучшим среди методов Лоури, ССК и КБГ [6].

С целью повышения воспроизводимости анализа общего белка в различных смесях белков методом ПГК было предложено добавлять к реагенту додецилсульфат натрия (SDS) [30, 31]. Взаимодействие ПГК с белками осуществляется через связывание аминокислотных групп основных аминокислот с сульфогруппами красителя. При добавлении SDS происходит разворачивание полипептидных цепей и высвобождение дополнительных аминокислотных групп, которые вступают в реакцию с ПГК. Таким образом, реагент с добавкой SDS нивелирует чувствительность красителя к различным белкам, что было показано в экспериментах с модельными пробами, содержащими альбумин и γ -глобулин. При отношении альбумина к глобулину от 2 до 10 открытие белка методами ПГК и ПГК-SDS было близким: $79,0 \pm 2,2$ и $77,0 \pm 2,1$ и практически не зависело от отношения А/Г.

В разбавленной же сыворотке крови больного миеломной болезнью (А/Г от 0,39 до 2,35), имеющей сложный гетерогенный белковый состав и содержащей альбумин, α -1, α -2 глобулины, легкие цепи иммуноглобулинов (моно- и/или поликлональных), открытие белка методом ПГК-SDS составило 83%, что существенно превосходило аналогичный показатель для немодифицированного метода ПГК – 63%.

Поскольку белковый состав индивидуального образца мочи при рутинных исследованиях установить невозможно, чаще всего в качестве белка-калибратора используют альбумин, сознавая при этом, что результаты будут занижены. Для нивелирования различной чувствительности ПГК к разным типам белков, кроме введения в состав реагента SDS, было предложено использовать калибратор, содержащий альбумин и γ -глобулин в тех же отношениях, которые присутствуют в стандартных образцах мочи [30].

Известно, что результаты колориметрического определения белка в моче существенно различаются в зависимости от использования того или иного красителя. Для повышения сходимости результатов, полученных методами КБГ и ПГК, была предпринята попытка выбора адекватного и единого калибратора для обоих методов. С этой целью были исследованы: альбумин; альбумин с глобулином (А/Г) и лиофилизированный мочевой белок (ЛМБ) [11]. Эксперименты показали, что отношение средних значений результатов, полученных методами КБГ и ПГК, с использованием в качестве калибратора альбумина или смеси альбумина с глобулином составило $0,69 \pm 0,10$; правильность полученных результатов была подтверждена анализом контрольного раствора мочи. Применение в качестве калибратора ЛМБ привело к минимальным различиям результатов в контрольном растворе мочи и клинических образцах, а отношение результатов, полученных данными методами, составило 0,96.

Таким образом, проблема несогласованности результатов, полученных разными методами, наилучшим образом может быть решена с использованием в качестве калибратора ЛМБ. Однако в данном случае лабораторная практика сталкивается со значительными трудностями. Для использования в клинических лабораториях в качестве калибратора ЛМБ он должен быть коммерчески доступен, стабилен и предварительно аттестован референсным методом, в качестве которого принято использовать метод биурет-ТХУ. Однако данный метод слабочувствителен, а его постановка связана со значительным

расходом белка. Коммерческий же ЛМБ (мочевой калибратор) дорог, труднодоступен и выпускается расфасованным по 10 мг. Поэтому его применение для рутинных лабораторных анализов не оправдано. В связи с этим на практике чаще в качестве калибратора белка используют альбумин или смесь альбумина с глобулином и получают при этом удовлетворительные результаты анализа (поскольку, как приводилось выше, отношение КБГ/ПГК равно $0,69 \pm 0,10$).

Каждый из вышеописанных колориметрических методов имеет свой интервал нормальных величин, который определяется следующими факторами: возможностью анализировать низкомолекулярные белки и пептиды в дополнение к альбуминам и глобулинам; чувствительностью реагентов к разным типам белков; взаимодействием реагентов с пигментами мочи и соединениями, присутствующими в моче, которые могут значительно снижать специфичность определения белка. Все эти факторы следует учитывать при выборе метода анализа белка в лабораторной практике.

1.3. Определение белка с помощью диагностических полосок

Диагностические полоски (далее – полоски) позволяют быстро провести оценку содержания белка в моче. При визуальной оценке концентрации белка с их помощью полученные данные рекомендуется рассматривать как ориентировочные. Такое применение полосок для скрининга удобно для быстрой оценки протеинурии непосредственно у постели больного.

Применение прибора, основанного на принципе отражательной фотометрии, позволяет использовать полоски как для полуколичественной, так и для количественной оценки результатов [2, 8].

На полосках в качестве индикатора чаще всего используется краситель БФС в цитратном буфере. По интенсивности сине-зеленой окраски индикаторной зоны, развивающейся после контакта полоски с мочой, можно рассчитать содержание в ней белка. Основной предпосылкой получения надежных результатов является поддержание стабильного уровня pH, обеспечивающего связывание белком индикатора в стандартных условиях.

При исследовании мочи с высоким значением pH емкость буферного раствора может оказаться недостаточной, что приведет к смещению значения pH в реакционной зоне и, соответственно, к не-

правильному результату анализа. Повышение или понижение относительной плотности мочи также может вызвать изменение чувствительности анализа. Высокое содержание солей снижает результаты.

При использовании БФС в качестве индикатора диагностические полоски более чувствительны к альбумину, чем к другим белкам, и не являются надежным детектором низких уровней протеинурии. Отрицательные результаты в данном случае не исключают присутствия в моче глобулинов, гемоглобина, белков В_J, мукопротеина.

Диагностические полоски с БФС в большей мере приспособлены к обнаружению селективной клубочковой протеинурии. При оценке неселективной клубочковой протеинурии (а также канальцевой) результаты исследования оказываются ниже ее реального уровня. Еще в меньшей степени эти полоски приспособлены для обнаружения протеинурии, обусловленной выделением белков В_J.

Ложноположительные результаты, полученные с использованием диагностических полосок, могут быть вызваны загрязнением посуды для сбора мочи остатками соединений четвертичного аммония и других детергентов; наличием хлоргексидина и амидоаминов; лечением феназопиридином, введением поливинилпирролидона [8].

1.4. Методы определения белка в спинномозговой жидкости

Общий белок в СМЖ определяют теми же методами, что и в моче: турбидиметрическими и колориметрическими. Турбидиметрические методы в данном случае обеспечивают полуколичественный анализ белка в исследуемых пробах. Для постановки колориметрических методов используют органические красители КБГ, БФС и ПГК [32].

Измерение альбумина в СМЖ в основном проводят методом с БФС. Метод точен, воспроизводим, однако чувствительность его невысока. Для увеличения чувствительности данного метода предлагается увеличить количество исследуемого образца в аналитической пробе [33].

При сравнении методов КБГ и ПГК для определения белка в СМЖ оказалось, что результаты, полученные методом ПГК, были на 25% выше, чем полученные методом КБГ. Показано, что метод ПГК менее зависим от белкового состава СМЖ и калибратора в ши-

рокой линейной области измерения. Именно этот метод рекомендован за рубежом для определения общего белка в СМЖ [34].

2. ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ И СМЖ

2.1. Оборудование

Для турбидиметрических методов определения белка в моче и СМЖ используется оборудование, имеющееся практически в каждой клинико-диагностической лаборатории: фотоэлектроколориметры, спеклолы, спектрофотометры. Для колориметрических методов кроме вышеперечисленного оборудования в КДЛ используются также полуавтоматические и автоматические биохимические анализаторы.

2.2. Проба и требование к ней

2.2.1. Моча

Моча, собранная за сутки; утренняя порция мочи. Для анализа рекомендуется использовать свежие образцы мочи, не применять консерванты. Моча стабильно хранится при комнатной температуре не более 4 ч; при 2–8 °С – не более суток; для длительного хранения образцы необходимо замораживать [8].

Диагностическая информация

Определение белка в моче является одним из самых распространенных исследований в клинической практике и имеет большое значение для выявления заболеваний почек и мочевыводящих путей. Наличие белка в моче в концентрациях, превышающих нормальный уровень, называется протеинурией. Различают физиологическую и патологическую протеинурию. *Физиологическая протеинурия* обусловлена временным появлением белка, не связанным с каким-либо заболеванием: после физических нагрузок; после приема большого количества пищи, богатой белками; при эмоциональных переживаниях; после холодного купания или бальнеологических процедур и др. Физиологическая протеинурия встречается у подростков в период становления гормонального баланса, у новорожденных – в процессе формирования почечного фильтра на «внешние» процессы питания и выделения. *Патологическая* протеинурия разделяется на преренальную, ренальную и постреналь-

ную. *Преренальная протеинурия* (связана с повышенным распадом белка или образованием патологических белков) встречается при инфекционных и токсических состояниях, сердечной недостаточности, парапротеинемических гемобластозах (множественная миелома), «Краш-синдроме» (синдром раздавливания), шоке, прогрессирующей мышечной дистрофии и др. *Ренальная протеинурия* (связана с патологией почек – повышенной проницаемостью почечных клубочков и/или нарушением реабсорбции белка в почечных канальцах) наблюдается при пиелонефрите, остром и хроническом гломерулонефрите, нефротическом синдроме, острой почечной недостаточности, гемолитико-уремическом синдроме и др. *Постренальная протеинурия* (обусловлена патологией мочевыводящих путей) связана с воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей, заболеваниями женской половой сферы, опухолями мочевыводящих путей, мочекаменной болезнью и др. [8,35].

Содержание белка в моче у человека в покое в норме составляет 50–80 мг/сут; после интенсивной физической нагрузки – менее 250 мг/сут [8].

Преаналитическая фаза

В период сбора мочи для определения суточной протеинурии образцы необходимо содержать на холоде. Для устранения мутности образцы центрифугировать при 1500–3000 об/мин (200–900 g). Мутность в образцах может быть вызвана: присутствием трудно растворимых солей, денатурацией белковых компонентов вследствие нарушения условий хранения, бактериальным загрязнением образца. В последнем случае образцы не рекомендуется использовать для анализа.

Референтные пределы концентрации белка в моче

1. Для турбидиметрических методов – 10–140 мг/л. [8].
2. Для метода ПГК – 24–141 мг/сут [37, 38].

Интерференция

Турбидиметрические методы. На результат определения белка в моче могут оказать влияние:

↑ аминосалициловая кислота, аспирин, промазин, хлорпромазин, гентамицин, нафциллин, пенициллин, фенолфталеин, рентге-

ноконтрастные среды, бикарбонат натрия, ацетаминофен, аминокликозиды, амфотерицин В, бацитрацин, соли висмута, капреомицин, интерферон, изониазид, литий, кортикостероиды, котримоксазол, эналаприл, циклоспорин, митомицин, нестероидные противовоспалительные средства, рифампин, сульфамиды, сульфоны, тетрациклин, метаболиты толбутамида;

↓ индометацин (у пациентов с нефротическим синдромом), высокощелочная моча [8].

Колориметрические методы (метод ПГК). Наличие билирубина и других компонентов, обуславливающих розово-коричневую окраску мочи, может мешать протеканию реакции и снижать специфичность анализа. При патологии почек и мочевого тракта уровень билирубина в моче может достигать значительных величин, что приводит к ложноположительным результатам. Это нужно учитывать при использовании окрашенных образцов мочи [39].

2.2.2. Спинномозговая жидкость

Для анализа необходимо использовать свежий образец СМЖ или образец, хранившийся при температуре ~4°C не более 72 ч. Перед исследованием образец необходимо центрифугировать.

СМЖ стабильна в замороженном виде при температуре – 20°C до 6 мес, для более длительного хранения необходимо использовать температуру –70°C. Образцы СМЖ не должны содержать кровь [8].

Диагностическая информация

Исследование белка в СМЖ имеет важное диагностическое значение при заболеваниях центральной нервной системы и мозговых оболочек. Повышение уровня белка в СМЖ может быть вызвано энцефалитами, гнойным и серозным менингитами, арахноидитами, опухолями мозга, ишемическим и геморрагическим инсультами, черепно-мозговыми травмами и т.д. [35].

Преаналитическая фаза

Анализ белка в СМЖ обычно проводят при инфекционных и тяжелых воспалительных заболеваниях, поэтому сбор, консервацию и хранение таких образцов следует осуществлять в соответствии с правилами, принятыми для работы с потенциально инфицированным материалом [39].

Референтные пределы концентрации белка в СМЖ

1. Для турбидиметрических методов:

а) в жидкости: люмбальной – 200–300 мг/л [35]; 150–450 мг/л [8]; вентрикулярной – 100–220 мг/л [35]; 50–150 мг/л [8]; цистернальной – 150–250 мг/л [8].

б) у новорожденных – 400–1 200 мг/л; у недоношенных новорожденных – 150–1 300 мг/л и более; у детей до 1 месяца – 200–800 мг/л; у детей старше 1 месяца – 150–400 мг/л [8].

2. Для метода ПГК – 150–450 мг/л [39, 40]; 80–420 мг/л [41].

Интерференция

Турбидиметрические методы. К искажению результатов анализа может привести наличие в СМЖ:

↑ аспирина, хлорпромазина, имипрамина, лидокаина, метициллина, метотрексата, морфина, пенициллина, фенацетина, прокаина, стрептомицина, тирозина, ибупрофена, сулиндака [8].

2.3. Определение белка методом ССК с использованием диагностических наборов ЗАО «Вектор-Бест»

Несмотря на то, что метод ССК имеет ряд существенных недостатков, таких как низкая специфичность, чувствительность и воспроизводимость, его все еще используют около 90% клинико-диагностических лабораторий России. Благодаря доступности и дешевизне реактива, а также из-за плохого приборного оснащения КДЛ (во многих лабораториях отсутствуют фотометры, пригодные для проведения анализа колориметрическими методами) определение белка в моче, к сожалению, будут проводить методом ССК и в ближайшем будущем.

В этой связи ЗАО «Вектор-Бест» были разработаны и производятся наборы реагентов «Белок–ССК–Ново», «Новосо–БМ–ССК», «Мочевой контроль–Ново», применение которых в соответствии с инструкцией позволяет снизить аналитическую погрешность определения белка в моче и ежедневно получать стабильные результаты анализа.

2.3.1. Наборы реагентов

2.3.1.1. Набор реагентов для определения белка в моче с сульфосалициловой кислотой «Белок–ССК–Ново»

В состав набора входят:

- реагент 1 – раствор сульфосалициловой кислоты (20%) для качественного определения белка, готовый к использованию, 1 банка (80 мл);
- реагент 2 – раствор сульфосалициловой кислоты для количественного определения белка, концентрат, 1 банка (100 мл).

Конечная концентрация сульфосалициловой кислоты в рабочем реагенте 2 составляет 3%.

Для приготовления рабочего раствора реагента 2 его разводят дистиллированной водой в 25 раз. Рабочий реагент 2 можно готовить в любом нужном объеме.

Реагент 1 и реагент 2 взаимозаменяемы.

Реагент 1 можно использовать для количественного определения белка: для этого его необходимо разбавить дистиллированной водой в 7 раз (к 80 мл реагента 1 прилить 480 мл дистиллированной воды).

Реагент 2 можно использовать для качественной оценки белка: для этого его необходимо разбавить дистиллированной водой в 3,5 раза (к 100 мл реагента 2 прилить 250 мл воды).

Рабочий реагент сульфосалициловой кислоты прозрачен и бесцветен, его оптическая плотность, измеренная против воды при $\lambda = 600$ нм (при длине оптического пути 10 мм), менее 0,010.

Аналитические характеристики набора «Белок–ССК–Ново»:

- область определения концентрации белка по калибровочному графику в диапазоне 0,02 – 0,60 г/л;
- чувствительность – 0,020 г/л;
- коэффициент вариации результатов измерений – не более 10%.

Качество набора может проверяться по отечественным или импортным контрольным растворам мочи с известным содержанием белка, аттестованным данным методом.

Условия хранения и эксплуатации набора:

набор должен храниться при температуре 18 – 25°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности; срок годности набора – 2 года; рабочий реагент 2 можно хранить в склянке из темного стекла при температуре 18 – 25°C не более 6 мес.

2.3.1.2. Набор образцов калибровочных белка мочи «Новосо–БМ–ССК»

Набор используется для построения калибровочного графика, проверки области измерений концентраций белка, контроля точности измерений.

В состав набора входят:

калибровочные растворы белка следующих концентраций: 0,020; 0,030; 0,050; 0,100; 0,200; 0,600 г/л, 6 флаконов (по 8,0 мл), готовые к использованию. Значения концентраций указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте. Допустимое отклонение аттестованных значений концентраций белка от информационных – не более 5%. Коэффициент вариации результатов измерения белка каждой концентрации – не более 5%.

Разведение приготовленных калибровочных образцов не допускается, так как ошибка при разведении до низких концентраций белка достигает 20% и более.

Условия хранения и эксплуатации набора:

набор должен храниться в темном месте в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности; допускается хранение набора при температуре до +25°C в течение 10 суток; срок годности набора – 2 года.

Калибровочные образцы белка после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре 2–8°C не более 3 мес.

2.3.1.3. Набор водных контрольных растворов мочи «Мочевой контроль–Ново»

Набор предназначен для проведения внутрилабораторного контроля качества: контроля правильности и воспроизводимости результатов определения концентраций компонентов мочи.

В состав набора входят:

контрольные растворы мочи, содержащие кетоны, глюкозу и белок двух уровней концентраций, выпускаются в двух фасовках (по 10 и 25 мл): по 3 флакона каждого уровня, готовые к использованию. Значения концентраций компонентов контрольного раствора для каждой конкретной серии указаны в аналитическом паспорте. Допустимое отклонение аттестованных значений концентраций белка и глюкозы – 5%.

Условия хранения и эксплуатации набора:

набор должен храниться в темном месте в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности; допускается хранение набора при температуре до +25°C в течение 10 суток; срок годности набора – 2 года.

Контрольные растворы мочи после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре 2–8°C не более 3 мес.

2.3.2. Проведение анализа

2.3.2.1. Построение калибровочного графика

Построение калибровочного графика следует проводить для всех приборов, на которых проводится определение белка в моче. Для этого использовать коммерческие наборы образцов калибровочных белка шести концентраций «Новосо–БМ–ССК».

Перед измерением калибровочных растворов кюветы тщательно вымыть и проверить их чистоту, измеряя оптическую плотность дистиллированной воды.

К 1,25 (1,00) мл калибровочного образца добавить 3,75 (3,00) мл рабочего реагента 2 и сразу же перемешать путем встряхивания пробирок вручную. Пробы выдержать при комнатной температуре (18–25°C) в течение 20 мин и, не перемешивая, перенести в кювету фотометра с длиной оптического пути 10 мм. Измерить оптическую плотность в диапазоне длин волн 590–620 нм против контрольной (холостой) пробы, состоящей из 1,25 (1,00) мл дистиллированной воды и 3,75 (3,00) мл рабочего реагента 2.

Калибровочный график следует строить на логарифмической бумаге (прилагается к набору) с фиксированной шкалой концентрации белка и оптической плотности. На таком графике, по сравнению с построенным на миллиметровой бумаге, шкалы концентрации белка и оптической плотности в области низких концентраций значительно растянуты. Использование логарифмической шкалы позволяет в 5–8 раз повысить точность результатов анализа и упрощает процедуру расчета концентрации белка [42]. Пограничную между нормой и патологией концентрацию белка, равную 0,02 г/л, на миллиметровой бумаге определить практически невозможно, а на логарифмической бумаге она определяется достоверно. Для наглядной демонстрации этого на рис. 1 и 2 приведены два варианта построения калибровочных графиков.

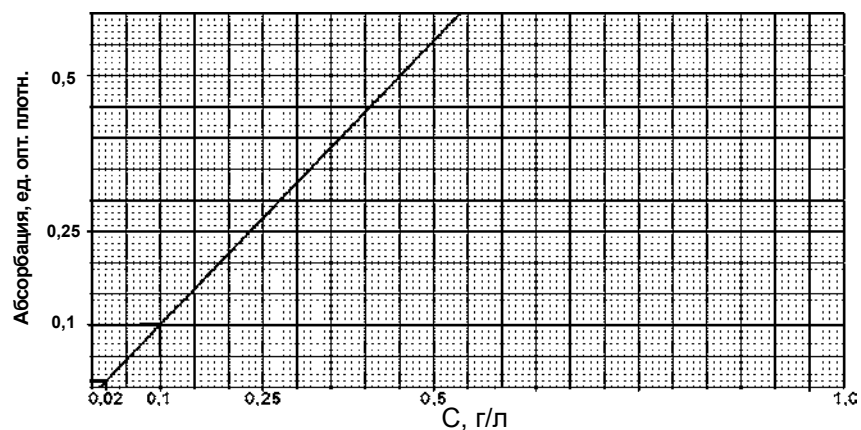


Рис. 1. Калибровочный график (миллиметровая бумага).

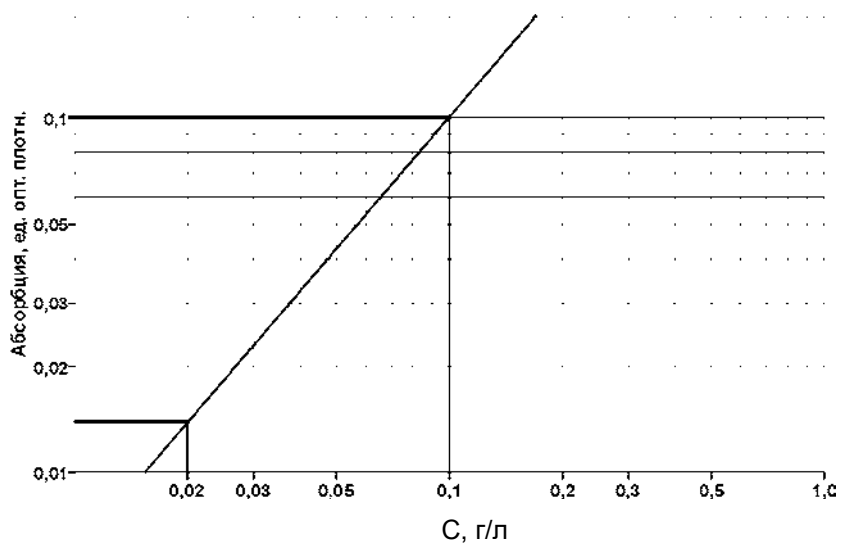


Рис. 2. Калибровочный график (логарифмическая бумага).

На оси y отметить оптическую плотность, соответствующую различной концентрации белка в калибровочных образцах. Из точек на оси x и на оси y , соответствующих концентрации белка и оптической плотности, восстановить перпендикуляры до точек их пересечения. Полученные точки соединить последовательно прямой линией. На графике отсутствует участок, соответствующий концентрации белка от 0 до 0,01 г/л – в этом диапазоне белок определяется недостоверно из-за низкой оптической плотности образующегося преципитата. Началу координат соответствует концентрация белка, равная 0,01 г/л, и оптическая плотность, равная 0,01.

На калибровочном графике, прилагаемом к каждому набору, в качестве примера приведена зависимость оптической плотности от концентрации белка для набора калибровочных образцов соответствующей серии (указана) и на определенном оборудовании (указано) при $\lambda = 590$ нм и длине оптического пути 10 мм.

2.3.2.2. Измерение образца

Определение белка в моче проводят по схеме, приведенной в табл. 2.

Пробы тщательно перемешать путем встряхивания пробирок вручную сразу же после добавления рабочего реагента 2 и выдержать в течение 20 мин при комнатной температуре (18–25°C). Далее, не перемешивая, пробы перенести в кювету фотометра с длиной оптического пути 10 мм. Измерить оптическую плотность опытных проб против контрольной (холостой) пробы при $\lambda = 590$ (590–620) нм.

2.3.2.3. Расчет результатов

Концентрацию белка определить по калибровочному графику. На оси y найти точку, соответствующую значению оптической плот-

Таблица 2

Схема проведения анализа

Растворы	Проба, мл	
	контрольная (холостая)	опытная
Моча	–	1,25 (1,00)
Рабочий реагент 2	3,75 (3,00)	3,75 (3,00)
Дистиллированная вода	1,25 (1,00)	–

ности измеренной пробы, из которой восстановить перпендикуляр до пересечения с калибровочным графиком. Из точки пересечения провести перпендикуляр к оси x , пересечение с которой и соответствует концентрации белка в пробе.

2.3.2.4. Внутрिलाбораторный контроль качества

При проведении исследований возможно возникновение различных погрешностей (систематических и случайных), связанных с ошибками операторов, приборными ошибками, неточностью дозаторов, несоблюдением времени проведения реакции, несоблюдением температурного режима и др. Эти и другие погрешности выявляются с помощью набора контрольных растворов мочи «Мочевой контроль–Ново» при проведении внутрिलाбораторного контроля качества.

Такой контроль должен проводиться регулярно во всех КДЛ в соответствии с приказом № 45 от 07.02.2000 г. «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации (приложение 2)» и приказом № 220 от 26.05.2003 г. «Об утверждении отраслевого стандарта «Правила проведения внутрिलाбораторного контроля качества количественных методов клинических исследований с использованием контрольных материалов».

Возможные ошибки при проведении анализа

Систематические ошибки возможны при:

- неправильном построении калибровочного графика, использовании некачественных калибровочных образцов (например, при приготовлении в лаборатории низкоконцентрированных растворов белка из высококонцентрированных), нелинейных характеристик измерительного прибора или его нестабильной работе;

- использовании некалиброванных пипеток.

Случайные ошибки обусловлены:

ошибками оператора при использовании мутных образцов мочи, нарушением рекомендуемого температурного режима, несоблюдением времени проведения реакции, использованием некачественных или неправильно приготовленных рабочих реагентов, неправильным определением оптической плотности или неправильным расчетом.

2.3.3. Факторы, влияющие на правильность определения белка методом ССК

2.3.3.1. Качество реактива ССК

ССК отечественного производства обычно недостаточно очищена, при хранении она набирает воду из воздуха и темнеет. Степень чистоты реактива существенно влияет на правильность результатов, особенно для низких концентраций белка. Низкое качество реактива приводит к снижению чувствительности метода и воспроизводимости результатов.

Для производства набора «Белок–ССК–Ново» ЗАО «Вектор-Бест» использует высокоочищенную ССК импортного производства или отечественный реактив, подвергнутый дополнительной очистке.

2.3.3.2. Время проведения реакции

От правильно выбранного времени остановки реакции и замера оптической плотности существенно зависит достоверность получаемых результатов. Для разных проб мочи время образования и оседания преципитатов разное: при малых концентрациях белка образование и оседание преципитатов происходит медленно и реакция требует длительного времени. При больших концентрациях белка преципитаты образуются быстро и в большом количестве, что обуславливает высокую скорость их оседания. Если замер абсорбции проводить раньше оптимального времени – содержание белка при низкой концентрации будет занижено вследствие его неполной преципитации (не успеют образоваться конгломераты); если позднее – содержание белка будет занижено в пробах с высокой концентрацией, где будет преобладать процесс оседания. Оптимальным временем проведения реакции является 20–25 мин, при котором низкие и высокие концентрации белка определяются с сопоставимой аналитической погрешностью. Данные, подтверждающие это, приведены в табл. 3.

Как видно из таблицы, часто используемое в КДЛ время реакции 5–10 мин не обеспечивает достоверное определение низких концентраций белка, которые в этом случае занижаются. Высокие концентрации белка определяются практически одинаково во временном диапазоне 5–25 мин.

Образующаяся в результате реакции суспензия очень неустойчива, поэтому следует обратить серьезное внимание на технику

Таблица 3

Определение концентрации белка в различном временном диапазоне

Концентрация белка в пробе, г/л	Оптическая плотность	Время проведения реакции, мин					
		5	10	15	20	25	30
0,03	Абсолютная величина	0,017	0,020	0,025	0,026	0,028	0,028
	Отклонение от максимального значения, %	39	21	9	7	0	0
0,60	Абсолютная величина	0,862	0,860	0,847	0,838	0,827	0,817
	Отклонение от максимального значения, %	0	0,2	1,7	2,8	4	5,2

подготовки и перенесения исследуемой пробы в кювету перед замером оптической плотности. Рекомендуется пробу перемешать сразу после добавления ССК, а перед замером оптической плотности без перемешивания аккуратно перенести в кювету фотометра. Не допускается повторный замер оптической плотности реакционной смеси, так как из-за низкой устойчивости суспензии результат будет не сопоставим с предыдущим.

2.3.3.3. Расчет концентрации белка

Концентрацию белка исследуемой пробы необходимо определять по полученному значению оптической плотности непосредственно по калибровочному графику. Вводить фактор пересчета нельзя, так как зависимость оптической плотности от концентрации белка не является прямопропорциональной, поэтому фактор пересчета для разных концентраций белка отличается. Данные, подтверждающие это, приведены в табл. 4.

Как видно из таблицы, факторы пересчета при минимальной и максимальной концентрации белка отличаются более чем в 2 раза, т.е. результаты анализа могут быть получены со 100% аналитической вариацией.

При работе с наборами «Новосо–БМ–ССК» необходимо строить калибровочный график, проводя замеры на приборе, который используется в лаборатории для анализа клинических образцов. Для каждой новой серии наборов реагентов рекомендуется строить свой калибровочный график в соответствии с прилагаемой инструкцией.

2.3.3.4. Замер оптической плотности

Для измерения оптической плотности необходимо использовать кювету с длиной оптического пути 10 мм, так как величины оптической плотности при низких концентрациях белка малы и составляют 0,011–0,030. При применении кюветы с длиной опти-

Таблица 4

Результаты определения белка, рассчитанные по фактору

Концентрация белка, г/л	A_{590}	Фактор*	Концентрация белка, рассчитанная по среднему фактору, г/л	Отклонение результата от информативной величины, %
0,020	0,011	1,82	0,014	30
0,030	0,020	1,50	0,025	17
0,050	0,039	1,28	0,048	4
0,100	0,094	1,06	0,117	17
0,200	0,211	0,95	0,262	31
0,600	0,721	0,83	0,894	49

*Среднее значение фактора – 1,24

ческого пути 5 или 3 мм чувствительность и точность результатов уменьшается в 2 и 3 раза соответственно.

2.3.3.5. Зависимость правильности определения концентрации общего белка от белкового состава мочи

В данном разделе брошюры приведены результаты исследований, проведенных сотрудниками ЗАО «Вектор-Бест». Они позволяют оценить ошибки, возникающие при анализе в лаборатории сложных по составу белков образцов мочи. Зависимость правильности определения концентрации общего белка от белкового состава мочи изучали, используя растворы белка с различной концентрацией альбумина и глобулинов.

Для исключения неспецифического влияния веществ, присутствующих в образцах мочи, на результат анализа белка высокоочищенные препараты альбумина и глобулинов (фирма «Sigma», США) растворяли в физиологическом растворе. Приготовленные растворы с концентрацией общего белка, равной 0,5 г/л, имели отношение альбумина к глобулинам А/Г = 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; подобно белковому спектру мочи (см. стр. 5). Результаты экспериментов представлены в табл. 5.

Таблица 5

**Результаты определения общего белка
в искусственных смесях**

Состав белка	Определено общего белка, г/л	Отклонение от расчетной величины, %
γ-глобулин	0,15	-70
α-, β-глобулины	0,12	-76
α-, β-, γ-глобулины	0,14	-72
A/G = 0,5	0,18	-64
A/G = 0,75	0,20	-60
A/G = 1,0	0,21	-58
A/G = 2,0	0,25	-50
A/G = 3,0	0,30	-40
Альбумин	0,46	-8

Как видно из табл. 5, в растворах, содержащих альбумин с глобулином, ошибка определения общего белка составляет 40–64%, причем она пропорционально растет с увеличением концентрации глобулинов. В растворах, содержащих только глобулины, определение белка составляет 25–30%, поэтому использование метода ССК в данном случае приводит к занижению концентрации общего белка, как минимум, на 40%.

На каждом из этапов проведения анализа и расчета результатов необходимо учитывать факторы, которые могут приводить к получению некорректных, в большинстве случаев заниженных результатов.

Использование стандартного серийно выпускаемого набора реагентов «Белок–ССК–Ново» и полное соблюдение рекомендаций по его применению позволяет снизить аналитическую погрешность определения белка в среднем до 10%. Однако устранить ее полностью не удастся, поскольку погрешность анализа обусловлена самим методом ССК.

2.4. Определение белка колориметрическим методом с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест»

Хорошей альтернативой методу ССК являются колориметрические методы, основанные на связывании белка с органическими красителями. Эти методы завоевывают все большее признание бла-

годаря простоте и скорости исполнения, высокой чувствительности, хорошей воспроизводимости результатов, достаточно широкому диапазону линейной зависимости оптической плотности от концентрации белка в пробе. Метод, основанный на применении в качестве красителя пирогаллолового красного, в настоящее время широко внедряется в лабораторную практику, особенно за рубежом.

В ЗАО «Вектор-Бест» был разработан и серийно производится набор реагентов для колориметрического определения белка в моче и спинномозговой жидкости с пирогаллоловым красным «Белок–ПГК–Ново». В его состав входят готовый к использованию монореагент и калибратор белка, содержащий 70% альбумина и 30% глобулина.

Несомненным достоинством набора является то, что используемое при анализе разведение пробы 1:50 (20 мкл мочи на 1 мл реагента) практически не приводит к разбавлению реагента и тем самым максимально снижает влияние матрикса исследуемой пробы на результаты определения белка. Установлено, что при таком разведении реагента интерференция всех компонентов мочи не превышает 2%.

Для правильного определения белка необходимы также набор калибровочных образцов белка «Новосо–БМ–ПГК» и набор водных контрольных растворов мочи «Мочевой контроль–Ново» (см. п. 2.3.1.3.).

2.4.1. Наборы реагентов

2.4.1.1. Набор реагентов для колориметрического определения белка в моче и СМЖ «Белок–ПГК–Ново»

В состав набора входят:

- реагент – раствор пирогаллолового красного с молибдатом натрия в сукцинатном буфере, готовый к использованию, 2 банки (по 100 мл);
- калибратор – калибровочный раствор белка, 0,50 г/л, содержащий 70% альбумина и 30% γ-глобулина, готовый к использованию, 1 флакон (2,0 мл);

Значение концентрации белка указано на этикетке флакона и в аналитическом паспорте.

Аналитические характеристики набора «Белок–ПГК–Ново»:

- линейная область определения – до 2,0 г/л;
- чувствительность – не более 0,060 г/л;
- коэффициент вариации результатов измерений – 5%.

Качество набора может проверяться по отечественным или импортным контрольным растворам мочи и СМЖ с известным содержанием белка, аттестованным данным методом, с использованием калибратора белка, содержащего 70% альбумина и 30% глобулина.

Условия хранения и эксплуатации набора:

набор должен храниться при температуре 2–8°C в упаковке предприятия-изготовителя в течение всего срока годности; срок годности набора – 1 год; реагент после вскрытия банки можно хранить в плотно закрытом виде в темном месте при температуре 2–8°C не более 6 мес.

Калибратор после вскрытия флакона можно хранить в плотно закрытом виде в темном месте при температуре 2–8°C не более 3 мес.

2.4.1.2. Набор образцов калибровочных белка мочи «Новосо–БМ–ПГК»

Набор используется для калибровки, проверки линейной области измерения, контроля точности измерений.

В состав набора входят:

калибровочные растворы белка, содержащие 70% альбумина и 30% глобулина следующих концентраций: 0,20; 0,60; 1,00; 1,50; 2,00 г/л; 5 флаконов (по 2,0 мл), готовые к использованию.

Значения концентраций указаны на этикетках флаконов и в аналитическом паспорте.

Допустимое отклонение аттестованных значений концентраций белка от информационных величин – не более 5%.

Коэффициент вариации результатов измерения белка каждой концентрации – 5%.

Условия хранения и эксплуатации набора:

набор должен храниться в темном месте в упаковке предприятия-изготовителя при температуре 2–8°C в течение всего срока годности; допускается хранение набора при температуре до +25°C не более 10 суток; срок годности набора – 1,5 года.

Калибровочные образцы белка после вскрытия флаконов можно хранить в плотно закрытом виде при температуре 2–8°C не более 3 мес.

2.4.1.3. Набор водных контрольных растворов мочи «Мочевой контроль–Ново»

Описание набора – см. п. 2.3.1.3.

2.4.2. Проведение анализа

Компоненты реакционной смеси отобрать в количествах, указанных в табл. 6.

Пробы перемешать, выдержать 10 мин при комнатной температуре (18–25°C). Затем измерить оптическую плотность растворов при $\lambda = 598$ (590–620) нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против контрольной (холостой) пробы. Окраска растворов стабильна в течение 1 ч.

Содержание белка в пробе С, г/л, рассчитывать по формуле:

$$C = \frac{E}{E_k} \times 0,50,$$

где: E – оптическая плотность опытной пробы, ед. опт. плотн.;

E_k – оптическая плотность калибровочной пробы, ед. опт. плотн.;

0,50 – концентрация белка в калибраторе, г/л.

Примечание. Если концентрация белка в пробе превышает 2,0 г/л, пробу разбавить физиологическим раствором: мочу в 3 раза, СМЖ – в 10 раз. Результат умножить на коэффициент разбавления.

Таблица 6

Растворы	Проба, мкл		
	опытная	калибровочная	контрольная (холостая)
Калибратор	–	20	–
Моча, СМЖ	20	–	–
Вода дистиллированная	–	–	20
Реагент	1000	1000	1000

2.4.3. Внутрिलाбораторный контроль качества

Описание проведения контроля качества – см. п. 2.3.2.4.

2.5. Сравнение набора «Белок–ПГК–Ново» с аналогичными наборами других фирм

2.5.1. Аналитические характеристики наборов реагентов различных фирм-производителей

Набор реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» «Белок–ПГК–Ново» сравнили по аналитическим характеристикам с аналогичными наборами следующих фирм: «Chronolab» (Швейцария),

«Bioson» (Германия), «Bio-Rad» (Германия). Принцип работы всех наборов основан на связывании белка с красителем пирогаллоловым красным.

Производители коммерческих наборов в инструкциях по применению приводят только основной состав реагента без указания наименования и концентрации составляющих, а также других компонентов набора (полный состав реагента – коммерческая тайна производителя). Различия в составе реагентов приводят к тому, что аналитические характеристики и область референтных пределов для различных наборов отличаются (табл. 7).

2.5.2. Сравнительное определение белка в контрольных растворах мочи и СМЖ

Правильность определения белка в моче и СМЖ наборами различных фирм оценивали, анализируя контрольные растворы мочи фирм «Bio-Rad» и «Sigma», а также контрольные растворы СМЖ фирмы «Bio-Rad». Используемые контрольные растворы мочи представляют собой лиофилизированную мочу человека, в которую добавлены различные компоненты человеческого и животного происхождения, лекарственные препараты, гормоны и стабилизаторы. Контрольный раствор СМЖ – жидкий препарат, приготовленный из СМЖ человека, с добавлением различных компонентов животного происхождения и ряда химических веществ. Результаты определения белка в контрольных растворах мочи и СМЖ представлены в табл. 8.

Как видно из данной таблицы, концентрация белка правильно определена всеми наборами в контрольных растворах мочи и СМЖ фирмы «Bio-Rad». В контрольных растворах мочи фирмы «Sigma» концентрация белка правильно определена с помощью всех наборов, за исключением набора фирмы «Chronolab», где результаты оказались несколько завышенными.

2.5.3. Зависимость определения концентрации общего белка от белкового состава калибратора

Из данных литературы и результатов наших собственных исследований следует, что точность результатов определения белка в образцах мочи, содержащих различное количество альбумина и глобулинов, существенным образом зависит от правильности выбора калибратора. В настоящем разделе представлены данные по за-

Таблица 7

Аналитические характеристики наборов

Показатели	Наборы фирм			
	«Chronolab»	«Bioson»	«Bio-Rad»	«Вектор-Бест»
Отношение реагент: образец	50 (1,00 : 0,020)	60 (3,00 : 0,050)	50 (2,50 : 0,050)	50 (1,00 : 0,020)
Линейная область определения, г/л	4,0	4,0	2,0	2,0
Чувствительность теста, г/л	не указана	не указана	0,040–0,050	0,060
λ, нм	598	578, 598, 604	600	590–620
Время проведения реакции, мин	10	10	15	10
Стабильность цветного комплекса, ч	0,5	0,5	1,0	1,0
Кювета, см	1,0	1,0	1,0	1,0
Белковый состав калибратора	альбумин, глобулин	не указан	70% альбумина и 30% глобулина	70% альбумина и 30% глобулина
Референтные пределы белка				
в моче, мг/24 ч	10–140	21–120	1–114	0,094 г/л
в СМЖ, мг/л	80–320	80–420	150–450	150–450
Абсорбция реагента, ед. опт. плотн.	0,050	0,160	0,250	0,090
Абсорбция комплекса краситель-белок (1 г/л)	0,200	0,480	0,600	0,500

Таблица 8

Определение белка в контрольных растворах мочи и СМЖ

Контрольные растворы	Диапазон концентраций, г/л	Определено белка, г/л, наборами фирм			
		«Chronolab»	«Bioson»	«Bio-Rad»	«Вектор-Бест»
<i>Lyphocheck Quantitative Urine Control («Bio-Rad»)</i>					
Level 1	0,231 (0,185–0,278)	0,245	0,253	0,204	0,253
Level 2	0,744 (0,595–0,893)	0,878	0,703	0,688	0,755
Urine Control («Sigma»)	0,39 (0,33–0,45)	0,57	0,38	0,37	0,38
<i>Liquichek Spinal Fluid Control («Bio-Rad»)</i>					
Level 1	0,330 (0,233–0,433)	0,412	0,293	0,278	0,352
Level 2	0,842 (0,589–1,095)	1,08	0,727	0,693	0,830

Результаты определения белка в искусственных смесях

Состав белка	Расчет концентрации белка							
	«Chronolab»		«Bioscop»		«Bio-Rad»		«Вектор-Бест»	
	С, г/л	ΔС, %	С, г/л	ΔС, %	С, г/л	ΔС, %	С, г/л	ΔС, %
<i>по калибраторам к наборам фирм</i>								
α-, β-, γ-глобулины	0,817	-18,3	0,554	-44,6	0,565	-43,5	0,707	-29,3
A/Г = 0,5	1,00	0	0,748	-25,2	0,672	-32,8	0,842	-15,8
A/Г = 0,75	1,03	+3,0	0,822	-17,8	0,725	-27,5	0,929	-7,1
A/Г = 1,0	1,05	+5,0	0,844	-15,6	0,745	-25,5	0,948	-5,2
A/Г = 2,0	1,08	+8,0	0,915	-8,5	0,800	-20	1,00	0
A/Г = 3,0	1,10	+10,0	0,942	-5,8	0,825	-17,5	1,01	+1,0
Альбумин	1,15	+15,0	1,04	+4,0	0,900	-10,0	1,11	+11,0
<i>по одному калибратору наборами фирм</i>								
α-, β-, γ-глобулины	0,755	-24,5	0,638	-36,2	0,706	-29,4		
A/Г = 0,5	0,924	-7,6	0,826	-17,4	0,841	-15,9		
A/Г = 0,75	0,951	-4,9	0,892	-10,8	0,906	-9,4		калибратор и результаты те же
A/Г = 1,0	0,967	-3,3	0,927	-7,3	0,931	-6,9		
A/Г = 2,0	1,0	0	1,00	0	1,00	0		
A/Г = 3,0	1,02	+2,0	1,03	+3,0	1,03	+3,0		
Альбумин	1,06	+6,0	1,14	+14,0	1,13	+13,0		

всисмости результатов определения белка от соотношения альбумина и глобулинов в исследуемой пробе, а также белкового состава калибратора, используемого для расчета. Для этого был проведен анализ специально приготовленных растворов с концентрацией белка 1,00 г/л, содержащих различное количество альбумина и глобулинов. Расчет содержания белка проводили по калибраторам к наборам, имеющим различный белковый состав, и по единому калибратору, содержащему 70% альбумина и 30% глобулина (весовые проценты), приготовленному в ЗАО «Вектор-Бест».

Из экспериментальных данных, приведенных в табл. 9, следует, что в диапазоне отношений A/Г от 1 до 3 (близком к белковому составу мочи), правильные результаты получены только по единому калибратору с отклонением от расчетной величины менее 7%. При расчете концентрации белка по калибраторам к наборам правильные результаты получены наборами ЗАО «Вектор-Бест» и «Chronolab».

Содержание глобулина, определенное различными наборами при расчете по единому калибратору, практически одинаково и составляет 64–75%. При расчете по калибраторам к наборам открытие глобулинов существенно различается и составляет: ~80% для набора «Chronolab», ~70% для набора ЗАО «Вектор-Бест» и ~55% для наборов «Bioscop» и «Bio-Rad». По всей вероятности, в калибраторе набора «Chronolab» содержится больше глобулинов, чем в калибраторах других наборов.

Таким образом, для правильного определения белка в моче необходимо использовать калибратор белка, содержащий альбумин с глобулином в соотношении 70:30 весовых процентов. При использовании данного калибратора отклонение концентрации белка от расчетной величины минимально.

2.5.4. Сравнительное определение белка в клинических образцах мочи и СМЖ

В данном разделе работы нами было проведено сравнительное определение белка в клинических образцах мочи и СМЖ вышеописанными наборами четырех фирм-производителей. Концентрацию белка рассчитывали как по калибраторам, прилагаемым к наборам, так и по единому калибратору (п. 2.5.3). Расчет по единому калибратору проводили с целью получения сравнительной оценки резуль-

татов анализов. Средние значения концентрации белка в исследуемых образцах мочи и СМЖ и количество патологических образцов, выявленных разными наборами, представлены в табл. 10.

Средние значения концентрации белка в моче и СМЖ, определенные с помощью четырех наборов, различаются. Обращает на себя внимание тот факт, что при расчете концентрации белка по калибраторам к наборам во всех случаях выявлено разное количество образцов мочи с повышенным содержанием белка (патологические образцы). Однако при использовании единого калибратора этот показатель существенно выравнился.

Для оценки правильности результатов анализа, полученных на основе того или иного калибратора, был использован метод добавок и проведены эксперименты по исследованию зависимости оп-

Таблица 10

Результаты определения белка в образцах мочи и СМЖ

Показатель	Расчет концентрации белка по							
	калибраторам к наборам фирм				единому калибратору наборами фирм			
	«Chronolab»	«Biocon»	«BioRad»	«Вектор-Бест»	«Chronolab»	«Biocon»	«BioRad»	«Вектор-Бест»
	<i>Моча</i>							
\bar{X}	0,146	0,090	0,108	0,112	0,132	0,104	0,131	0,112
$N_{\text{пат}}$	25	14	22	23	23	22	23	23
	<i>СМЖ</i>							
\bar{X}	–	–	–	–	0,89	0,95	1,12	1,10
$N_{\text{пат}}$	–	–	–	–	17	17	17	17

\bar{X} – среднее значение концентрации белка

$N_{\text{пат}}$ – количество патологических образцов

ределения концентрации общего белка от белкового состава мочи и белкового состава калибратора.

2.5.5. Проверка правильности определения белка в моче методом добавок

Проверка правильности определения белка в моче методом добавок была проведена следующим образом: к различным образцам мочи добавили одинаковое количество раствора белка, содержащего 50% альбумина и 50% глобулина. Концентрацию белка рассчитывали по калибраторам к наборам и единому калибратору белка. Данные эксперимента представлены в табл. 11.

При расчете концентрации белка по калибраторам к наборам отклонение концентрации белка от расчетной величины значительно выше, чем при расчете по единому калибратору, при использовании которого оно не превышает 4,8% для всех наборов. Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили правильность результатов определения белка в моче, рассчитанных по единому калибратору (см. табл. 10).

Из полученных экспериментальных данных можно также сделать вывод о том, что реагенты наборов «Chronolab», «Biocon», «Bio-

Таблица 11

Проверка правильности определения белка в моче методом добавок

№ образца мочи	Отклонение концентрации белка от расчетной величины, %; расчет по							
	калибраторам к наборам фирм				единому калибратору наборами фирм			
	«Chronolab»	«Biocon»	«BioRad»	«Вектор-Бест»	«Chronolab»	«Biocon»	«BioRad»	«Вектор-Бест»
1	+32	-9,2	-15	-1,4	+2,7	-1,3	-1,3	-1,4
2	+26	-10	-13	-1,8	+0,7	-2,2	-4,0	-1,8
3	+30	-6,5	-17	-0,7	+1,7	-4,8	0	-0,7
4	+13	-7,4	-12	-3,3	+1,8	-0,9	-0,8	-3,3

Rad», «Вектор-Бест» имеют близкий состав компонентов, позволяющий правильно определять белок в моче. Результаты анализа, таким образом, зависят только от качественного и количественного белкового состава калибратора и точности его приготовления. Белковый состав калибратора, входящего в набор реагентов «Белок–ПГК–Ново», является оптимальным, и проводимый на его основе расчет концентрации белка правильным. Таким образом, набор «Белок–ПГК–Ново» производства ЗАО «Вектор-Бест» обеспечивает проведение анализа белка с высокой точностью.

В табл. 12 представлены наборы реагентов, выпускаемые ЗАО «Вектор-Бест» для определения белка в моче и СМЖ. Для правильного определения белка необходимо, кроме основных наборов реагентов, использовать также наборы соответствующих калибровочных образцов и набор водных контрольных растворов мочи «Мочевой контроль–Ново».

Диагностические наборы реагентов, производимые ЗАО «Вектор-Бест» для качественного и количественного определения белка в моче и СМЖ, отвечают всем требованиям, предъявляемым к качеству аналогичных наборов. Набор «Белок–ПГК–Ново», основанный на связывании белка с красителем пирогаллоловым красным, по аналитическим характеристикам и правильности определения белка сопоставим с лучшими мировыми аналогами.

Таблица 12

Наборы, выпускаемые ЗАО «Вектор-Бест» для определения белка

№ по каталогу	Наименование	Фасовка, мл	Число определений (конечный объем реакционной смеси)
B-8046	«Белок–ССК–Ново» Набор реагентов для качественного и количественного определения белка в моче с сульфосалициловой кислотой	1 × 80 1 × 100	660 (5 мл)
B-8047	«Белок–ПГК–Ново» Набор реагентов для колориметрического определения белка в моче и спинномозговой жидкости с пирогаллоловым красным	2 × 100	200 (1 мл)
B-8123	«Новосо–БМ–ССК» Набор образцов калибровочных белка мочи с концентрацией 0,020; 0,030; 0,050; 0,100; 0,200 и 0,600 г/л для метода с сульфосалициловой кислотой	6 × 8	
B-8124	«Новосо–БМ–ПГК» Набор образцов калибровочных белка мочи с концентрацией 0,20; 0,60; 1,00; 1,50 и 2,00 г/л для метода с пирогаллоловым красным	5 × 2	
B-8208	«Мочевой контроль–Ново» Набор водных контрольных растворов мочи, содержащей белок, глюкозу, кетоновые тела двух уровней концентрации	3 × 10, 3 × 10	
B-8212	«Мочевой контроль–Ново» Набор водных контрольных растворов мочи, содержащей белок, глюкозу, кетоновые тела двух уровней концентрации	3 × 25, 3 × 25	

ВЫВОДЫ

В данной работе рассмотрены наиболее широко используемые в клинических лабораториях методы определения белка в моче и СМЖ. Показано, что методы турбидиметрические, Лоури, биуретовый и метод, основанный на связывании белка с БФС, практически не пригодны для количественного определения белка в моче, даже если используется калибратор, белковый состав которого аналогичен белковому составу мочи.

Среди методов, основанных на связывании белка с органическими красителями, наиболее перспективным является метод, в котором используется пирогаллоловый красный. Он имеет хорошие аналитические характеристики и пригоден как для ручного анализа, так и для работы на автоматических биохимических анализаторах. Данный метод позволяет правильно определять белок

при следующих условиях: состав реагента должен обеспечивать количественное связывание красителя с различными белками и исключать интерференцию всех компонентов мочи; белковый состав калибратора должен быть близок белковому составу мочи.

При предварительной оценке пригодности набора реагентов для правильного определения белка в моче сотрудникам КДЛ весьма полезно иметь информацию о качественном и количественном белковом составе калибратора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Le Bricon T. // Ann. Biol. Clin. 2001. V. 59. P. 701–715.
2. Козлов А.В., Слепышева В.В. Методы определения белка в моче: возможности и перспективы. Сб. трудов VII ежегодного СПб нефрологического семинара. СПб.: ТНА, 1999. С. 17–28.
3. Kingsbury F.B., Clark C.P., Williams G. et al. // J. Lab. Clin. Med. 1926. V. 11, P. 981–989.
4. Ким Ю.В., Потехин О.Е., Токар М.И., Шибанов А.Н. // Лаборат. медицина. 2003. №6. С. 94–98.
5. Шибанов А.Н., Потехин О.Е. Официальный сайт компании «Юнимед АО» www.unimedao.ru
6. Альтшулер Б.Ю., Раков С.С., Ткачев Г.А. // Вопр. медиц. химии. 2001. №4. С. 426–438.
7. Dilena V.A., Penberthy L.A., Fraser C.G. // Clin. Chem. 1983. V. 29. P. 553–557.
8. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. / Под ред. Н.У. Тица. М., 1997. С. 76–78.
9. Загребельный С.Н., Пупкова В.И. Количественные методы определения белка. Обзорная информация ВНИИ СЭНТИ, М., 1986.
10. Mc Elderry L.A., Tarbit I.F., Cassells-Smith A. J. // Clin. Chem. 1982. V. 28. P. 356–360.
11. Marshall T., Williams K.M. // Clin. Chem. 2000. V. 46. P. 392–398.
12. Шишкин С.С. // Вопр. медиц. химии. 1982. №5. С. 134–141.
13. Trivedi V.D. // Ital. J. Biochem. 1997. V. 46. P. 67–73.
14. Bradford M.M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
15. Hemmingsen L. // Clin. Chim. Acta. 1972. V. 36. P. 185–188.
16. Romer W. // Z. Med. Labortech. 1976. V. 17. P. 209–214.
17. Sydow G. // Acta Biol. Med. Ger. 1979. V. 38. P. 1141–1144.
18. Карягина И.Ю., Слепышева В.В., Козлов А.В. // Клин.лаб. диагн. 1996. № 6. С. 27–28.
19. Гаврилов В.Б., Никольская В.П., Калер Г.В., Конев С.В. // Молекул. биология. 1990. Т. 24. С. 1211–1218.

20. Tayyab S., Qasim M.A. // *Int. J. Biol. Macromol.* 1990. V. 12. P. 55–58.
21. Ahmad H., Saleemuddin M. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1983. V. 7. P. 335–343.
22. Schosinsky K.H., Vargas M., Luz Esquivel A., Chavarria M.A. // *Clin. Chem.* 1987. V. 33. P. 223–226.
23. Lever M., Walmsley T.A. // *Clin. Chim. Acta.* 1978. V. 83. P. 279–285.
24. Fujita Y., Mori I., Kitano S. // *Bunseki Kagaku.* 1983. 32. P. 379–386.
25. Watanabe N., Kamei S., Ohkubo A. et al. // *Clin. Chem.* 1986. V. 32. P. 1551–1554.
26. Boisson R.C., Eynard J.C., Crozier M., Grafmeyer D.C. // *Clin. Chim. Acta.* 2000. V. 297. P. 285–295.
27. Lynch K.M., Sellers T.S., Gossett K.A. // *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1996. V. 34. P. 569–571.
28. Lynch P.L.M., Savory J, Haverstick D.M. // *Clin. Chem.* 1998. V. 44. P. 674–675.
29. Van Ingen H. E. // *Clin. Chem.* 1990. V. 36. P. 702.
30. Orsonneau J-L. Douet P., Massoubre C. et al. // *Clin. Chem.* 1989. V. 35. P. 2233–2236.
31. Lefevre G., Bloch S., Le Bricon T. et al. // *J. Clin. Lab. Anal.* 2001. V. 15. P. 40–42.
32. Bonate P.L. // *Anal. Biochem.* 1988. V. 175. P. 300–304.
33. Marshall T., Williams K.M. // *Br. J. Biomed. Sci.* 2000. V. 57. P. 281–286.
34. Williams K.M, Marshall T. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2001. V. 47. P. 197–207.
35. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. М.: Медицина, 2000. С.74.
36. Медицинские лабораторные технологии. Справочник. / Под ред. А.И. Карпищенко. СПб.: Интермедика, 1998. Т. 1. С. 241.
37. Инструкция по применению набора «Total Protein in urine and CSF Pyrogallol-red». Chronolab. Швейцария.
38. Каталог фирмы Sigma, «Protein, Total, Microprotein-PR». США. 2001. P. 2697.
39. Общий белок в моче и СМЖ (методические рекомендации). Медицинская компания «ОМБ». Россия.
40. Инструкция по применению набора «Pyrogallol Red Total Protein Test Kit». Bio-Rad. Германия.
41. Инструкция по применению набора Fluitest USP. Ultra – Sensitive Proteins Pyrogallol – Red Method. Biocon. Германия.
42. Инструкция по применению набора контрольных растворов белков мочи «БМ–Контроль». «Медлакор С-Пб». Россия.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
1. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ И СМЖ	
1.1. Турбидиметрические методы	4
1.2. Колориметрические методы	7
1.3. Определение белка с помощью диагностических полосок	15
1.4. Методы определения белка в спинномозговой жидкости	16
2. ЛАБОРАТОРНАЯ ПРАКТИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКА В МОЧЕ И СМЖ	
2.1. Оборудование	17
2.2. Проба и требования к ней	—
2.3. Определение белка методом ССК с использованием диагностических наборов ЗАО «Вектор-Бест»	20
2.4. Определение белка колориметрическим методом с использованием наборов реагентов ЗАО «Вектор-Бест»	30
2.5. Сравнение набора «Белок–ПГК–Ново» с аналогичными наборами других фирм	33
ВЫВОДЫ	40
ЛИТЕРАТУРА	41

Информационно-методическое пособие

Валентина Ивановна Пупкова
Людмила Михайловна Прасолова

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКА В МОЧЕ
И СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ**

Редактор *В.И. Офицеров*
Оригинал-макет *Н.А. Вяткина, О.Н. Савватеева*

Подписано в печать 05.07.2007. Формат 60×84 $\frac{1}{16}$. Гарнитура «Century Schoolbook».
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 2,63. Тираж 1000 экз. Заказ № 8.

Типография ЗАО «Вектор-Бест», 630559, Новосибирская обл., пгт. Кольцово,
а/я 125, тел. (3832) 27-67-68, 36-60-60