

Способен ли метод определения белка в моче пирогаллоловым красным претендовать на роль основного?

Е. С. Ларичева

Ю. Н. Андреев

Е. Н. Ребякова

А. В. Козлов, доктор медицинских наук

Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

Данные литературы и результаты собственных исследований указывают на то, что при определении концентрации белка в моче предпочтение следует отдавать методу, основанному на использовании индикатора пирогаллолового красного.

Проблема количественного определения концентрации общего белка в биологических жидкостях до настоящего времени окончательно не решена. Для использования в практике лабораторий был разработан и предложен ряд методов, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки [1]. Аргументы в пользу выбора конкретного метода для решения поставленных конкретных задач до сих пор остаются предметом обстоятельных обзоров и исследований [2, 3]. Наибольшие методические сложности представляет определение низких концентраций белка, которые характерны для мочи, спинномозговой, синовиальной, слезной, выпотной и других жидкостей организма. Особенно важным представляется количественное определение концентрации общего белка в моче для выявления нарушений структуры и функции нефронов [4].

Количественные методы

Корректное определение концентрации белка в моче в ряде случаев оказывается непростой задачей. Трудности ее решения определяются следующим рядом факторов:

- низким содержанием белка в моче здорового человека, часто находящимся на пороге чувствительности большинства известных методов;
 - присутствием в моче множества соединений, способных вмешиваться в ход химических реакций;
 - значительными вариациями содержания и состава белков мочи при различных заболеваниях, затрудняющими выбор адекватного калибровочного материала.
- В клинических лабораториях преимущественно применяются «рутинные» методы определения белка в моче, однако они далеко не всегда позволяют получать удовлетворительные результаты. Результаты, полученные при внешней оценке качества в лабораториях Великобритании, дали в свое время основание для публикации статьи с достаточно красноречивым названием: «Urinary total protein estimation - fact or fiction?» [5].

С точки зрения специалиста-аналитика, работающего в лаборатории, метод, предназначенный для количественного определения белка в моче, должен

отвечать следующим требованиям:

1. Характеризоваться линейной зависимостью между поглощением образовавшегося в ходе химической реакции комплекса и содержанием белка в пробе в широком диапазоне концентраций, что позволит избежать дополнительных операций при подготовке пробы к исследованию.
2. Результат определения не должен зависеть от белкового состава исследуемого образца мочи.
3. Метод должен быть простым, не требовать высокой квалификации исполнителя, выполняться при малом количестве операций.
4. Обладать высокой чувствительностью, аналитической надежностью при использовании небольших объемов исследуемого материала.
5. Быть устойчивым к воздействию различных возмущающих воздействий (колебаниям состава образца, присутствию лекарственных препаратов и др.).
6. Обладать приемлемой стоимостью.
7. Быть легко адаптируемым к автоанализаторам.

Все известные методы количественного определения содержания белка в моче могут быть условно разделены на три группы: химические турбидиметрические, связывания с красителями и взаимодействия с индикаторами.

Химические методы.

В основе биуретовой реакции лежит взаимодействие ионов меди с пептидными связями в молекуле белка в присутствии сильного основания. Интенсивность пурпурно-фиолетовой окраски образующегося комплекса зависит от концентрации белка и может быть оценена фотометрическими методами. Биуретовая реакция не обладает достаточной чувствительностью для определения минимальных количеств белка в моче здорового человека. В связи с этим она чаще всего используется для количественного определения белка после его осаждения. Применяемые для этой цели реагенты обладают различной осаждающей способностью. В частности, сульфосалициловая кислота способна, помимо белков, осаждать значительную часть полипептидов, более полному осаждению из мочи гликопротеидов способствуют хлорная кислота и реактив Цушия (этанол, вольфрамовая кислота, соляная кислота). Метод Лоури, обладающий более высокой чувствительностью по сравнению с биуретовым методом, сочетает биуретовую реакцию и реакцию Фолина на аминокислоты тирозин и триптофан в составе белковой молекулы. Несмотря на высокую чувствительность, данный метод не всегда обеспечивает получение надежных результатов. Причиной служит неспецифическое взаимодействие реактива Фолина с небелковыми компонентами мочи (чаще всего аминокислотами, мочевой кислотой, углеводами). Отделение этих и других компонентов мочи путем диализа или осаждения белков позволяет с успехом использовать данный метод. Некоторые лекарственные препараты - салицилаты, хлорпромазин, тетрациклины - способны оказывать влияние на данную реакцию и извращать результаты исследования [6].

Турбидиметрические методы

Из-за относительной простоты и достаточной чувствительности получили наибольшее распространение. Они основаны на денатурации белков мочи под воздействием различных денатурирующих агентов и образования суспензии взвешенных частиц вследствие снижения растворимости денатурированных белков. Образующиеся преципитаты меняют оптическую характеристику реакционной системы, а наблюдаемое изменение поглощения в определенном диапазоне длин волн пропорционально исходной концентрации белка. О концентрации белка в исследуемом образце судят либо по интенсивности светорассеяния (нефелометрический метод анализа), определяемого числом светорассеивающих частиц, либо по ослаблению светового потока образовавшейся суспензией (турбидиметрический метод анализа).

Чувствительность и специфичность наиболее широко распространенных турбидиметрических методов определяются выбором денатурирующего агента? - сульфосалициловой (ССК) или трихлоруксусной (ТХУК) кислоты. Сам метод определения альбумина в моче с сульфосалициловой кислотой предложили O.Folin и W.Denis в 1914 г. Результаты применения "преципитационных" методов обнаружения белка в моче зависят от множества факторов: скорости смешивания реактивов, температуры реакционной смеси, значения рН среды, присутствия посторонних соединений, способов фотометрии. Тщательное соблюдение условий реакции способствует образованию стабильной суспензии с постоянным размером взвешенных частиц и получению воспроизводимых результатов.

По общему мнению, использование ССК обеспечивает методу более высокую чувствительность по сравнению с применением ТХУК, при этом температура реакционной среды не оказывает существенного воздействия на результаты исследования. В то же время под воздействием ССК светорассеивающая способность частиц, образующихся из альбумина, в четыре раза превосходит светорассеяние частицами, образующимися в тех же условиях из глобулинов. При использовании ТХУК изменение соотношения между альбуминами и глобулинами не сказывается существенно на светорассеянии образующихся частиц только в узком интервале температур от 20 до 25 С. При температуре от 25 до 50 С светорассеивающая способность частиц, образующихся из альбумина, выше, чем из глобулинов [7].

Некоторые лекарственные препараты влияют на результаты турбидиметрических методов определения белка в моче, приводя к ложноположительным либо ложноотрицательным результатам. К ним относятся некоторые антибиотики (бензилпенициллин, клоксациллин и др.), рентгеноконтрастные йодсодержащие вещества, сульфаниламидные препараты.

Методы, основанные на использовании красителей

В качестве последних могут выступать понсо S (Ponceau S), Кумасси бриллиантовый синий (Coomassie Brilliant Blue). Использование красителя понсо S в сочетании с осаждением белков ТХУК позволило разработать высокочувствительный метод определения белка в моче [8]. Различные белки мочи - глобулины и альбумин - выявляются этим методом со сравнимой

чувствительностью. Метод характеризуется высокой воспроизводимостью, для исследований требуется небольшой объем образца мочи - в пределах 50 мкл. Получаемые с его использованием данные хорошо коррелируют с результатами биуретового метода, но ниже по сравнению с турбидиметрическим методом, в котором ТХУК была использована в качестве преципитирующего агента [9]. Краситель Кумасси бриллиантовый синий (КБС) способен связываться с положительно заряженными аминогруппами аминокислот, входящих в состав белковой молекулы, с образованием комплекса с максимумом поглощения при 595 нм (максимум поглощения красителя - 465 нм). Образование комплекса заканчивается через 2 мин после добавления КБС в среду, его окраска стабильна в течение часа. Комплекс белок-краситель обладает высоким поглощением, что обеспечивает методу высокую чувствительность и требует для исследования небольшого объема образца. Метод прост в исполнении и легко адаптируется к автоанализаторам. Различные белки обладают неодинаковой способностью связывать КБС. Если поглощение комплекса КБС - альбумин принять за 100%, то для гемоглобина и трансферрина оно оказывается таким же, величина поглощения глобулина, - и -цепей иммуноглобулинов составляет только 60% [10].

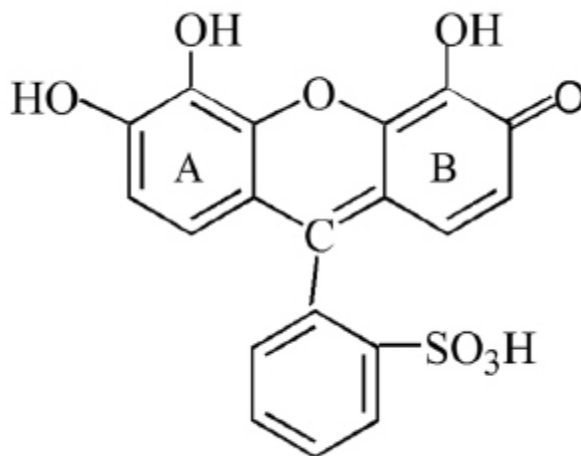
Методы с использованием индикаторов

Наиболее популярными оказались: бромфеноловый синий (БФС) и пирогаллоловый красный (Pyrogallol Red). Данная группа методов основана на так называемом феномене белковой ошибки индикатора. Сам термин был предложен известным датским химиком Zereisen в 1909 г. Согласно его представлениям, в растворе с определенным значением pH устанавливается равновесие между двумя формами индикатора: катионной (неокрашенной) и анионной (окрашенной). При добавлении в раствор белков, способных связывать часть протонов, соотношение между формами индикатора (3,3,5,5-тетрахлорфенол-3,4,5,6-тетрабромсульфопталеина) меняется, что приводит к изменению цвета раствора.



При pH 3,0-3,5 белки связывают часть протонов и меняют исходный желтый цвет на зеленовато-синий. В растворе со значением pH с другими белками (глобулинами или белком Бенс-Джонса) это становится возможным только при снижении pH буферного раствора до 3,0 или ниже как при количественном, так

и качественном способе его определения [11]. Однако даже при таких низких значениях рН чувствительность данного метода остается значительно более высокой для альбумина, чем для других белков.



Описано несколько вариантов метода, отличающихся соотношением объема исследуемого образца и реакционной среды, типом буферного раствора [12, 13]. В целом метод обладает достаточно высокой специфичностью, чувствительностью и воспроизводимостью. В то же время некоторые авторы не считают его полностью свободным от влияния таких компонентов мочи, как мочевиная кислота и креатинин. Их удаление с помощью гель-фильтрации на Сефадексе G-50 повышает чувствительность метода до 3 мг/л [14]. Данный принцип определения белка в моче использован в тест-полосках для определения состава мочи. Сравнение окраски аналитической зоны тест-полоски с цветовой шкалой позволяет оценить концентрацию белка в исследуемой моче [15].

В 1983 г. Y. Fujita и соавт. [16] предложили использовать для определения белка в моче пирогаллоловый красный (ПГК) - пирогаллолсульфопталин C₁₉H₁₂O₈S- индикатор, для титрования ионов висмута, кобальта, никеля, тория в растворах.

Кислые растворы пирогаллолового красного окрашены в желтый цвет, при отщеплении протонов от ОН-групп (при соответствующем повышении рН или при образовании комплекса с металлом) цвет раствора меняется на красный или фиолетовый [17].

Связывание в кислой среде (рН 2,5) белками комплекса краситель пирогаллоловый красный - ионы молибдена сдвигает максимум поглощения с 400 нм до 600 нм (рис. 1), что позволяет проводить количественное определение белка в моче в широком диапазоне концентраций.

Поглощение комплекса глобулины - краситель составляет 70% от величины поглощения комплекса альбумин? - краситель, для легких цепей иммуноглобулинов - от 52% до 68% [18]. Метод легко адаптируется к автоанализаторам.

Постепенно данный метод вытеснил практически все другие. Тест-системы с использованием ПГК выпускают многие компании, как за рубежом, так и в России. Популярность данный метод завоевал после публикации N. Watanabe и

соавт., которым удалось оптимизировать условия реакции и состав реакционной среды. При использовании предложенной ими прописи реактивов образующийся комплекс ПГК - белок поглощает при 600 нм (см. рис. 1).

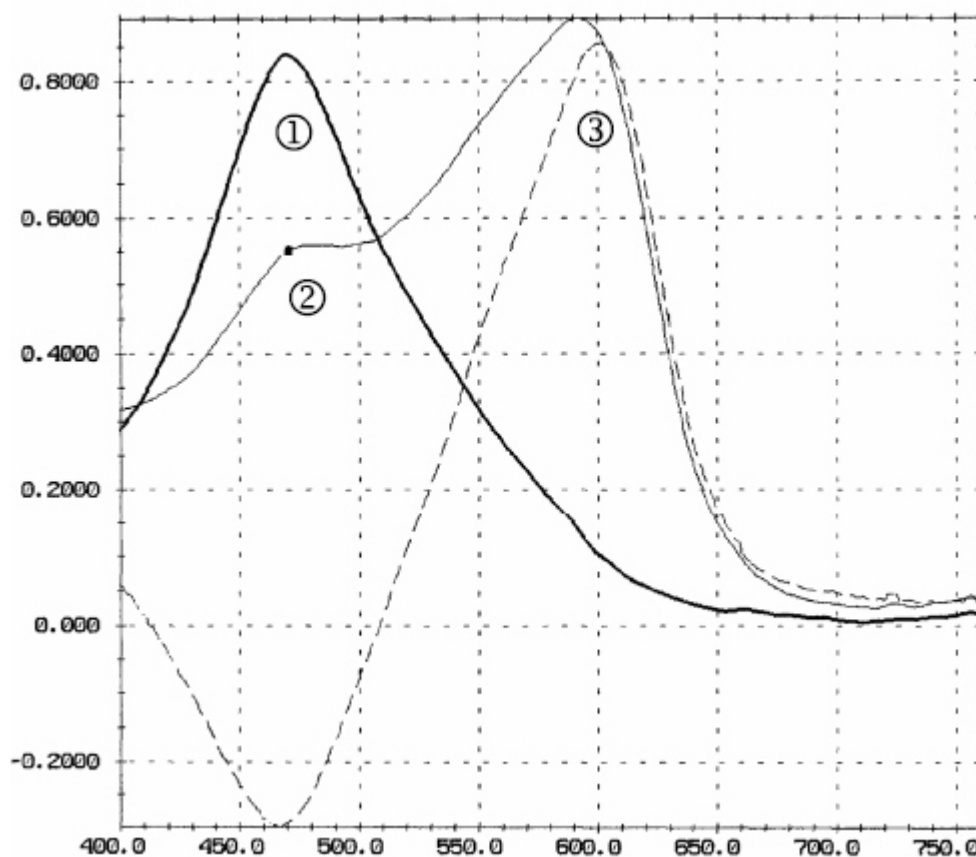


Рис. 1. Спектр поглощения пирогаллолового красного:

1 - раствор пирогаллолового красного (фотометрия против воды); 2 - комплекс белок - пирогаллоловый красный (фотометрия против воды); 3 - комплекс белок - пирогаллоловый красный (фотометрия против контроля на реактивы)

Поскольку пик поглощения комплекса белок - ПГК достаточно узкий и на него накладывается поглощение рабочего реактива, при использовании фотометров с высокой степенью монохроматизации (спектрофотометры, КФК-3) зависимость между поглощением и концентрацией альбумина сохраняется в более значительном интервале концентраций, чем при использовании фотометров с низкой степенью монохроматизации. На наш взгляд, лучшим выходом из данной ситуации является использование чрезвычайно удобного и простого в использовании фотометра - анализатора общего белка в моче «Белур 600», в котором в качестве источника излучения используется оранжевый светодиод и светофильтр максимумом пропускания 600 нм (рис. 2). Достоинством данного анализатора является кювета с длиной оптического пути 1 см, конечный объем реакционной среды составляет 1 мл.

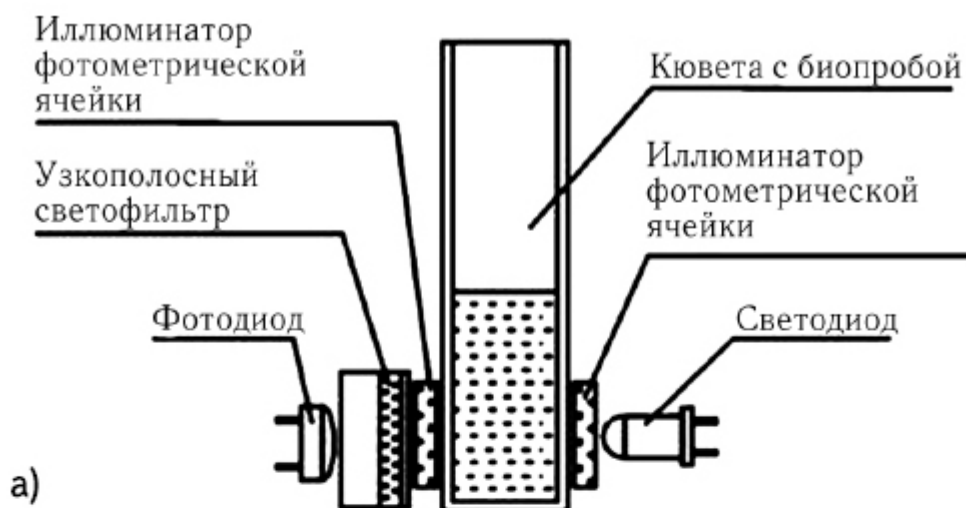


Рис. 2. Анализатор «Белур 600» - оптическая схема (а) и внешний вид (б)

Поскольку величина максимума поглощения комплекса альбумин - ПГК выявлена при рН 2,5-3,0, у комплекса глобулины - ПГК - при рН 2,25-2,50, добавление в рабочий реактив детергента - додецилсульфата натрия (SDS) позволяет в определенной степени нивелировать различия в средстве ПГК к альбумину и глобулинам [19].

Для нивелирования различий в чувствительности ПГК к разным типам белков в растворе многие компании-производители в тест-системах используют калибровочные растворы, содержащие альбумин и -глобулины в соотношении, характерном для образцов мочи. Более достоверные результаты получают в тех случаях, когда отношение альбумин/глобулин калибровочного раствора и образца мочи превышает 2. В противном случае результат может содержать аналитическую погрешность, величина которой будет тем выше, чем больше

состав белков мочи отличается от состава калибровочного раствора. Поскольку белковый состав образцов мочи неизвестен, использование в качестве калибраторов растворов, содержащих только альбумин, способствует занижению результатов.

Несмотря на перечисленные проблемы, обусловленные неодинаковой чувствительностью ПГК к разным белкам, метод обладает рядом достоинств:

- прост и удобен для выполнения как в неавтоматизированном режиме, так и после адаптации к автоанализатору;
- за счет значительного разведения образца мочи в реакционной смеси значительно снижается влияние на результаты фотометрии состава мочи;
- образование комплекса протекает в среде с высокой буферной емкостью, что обеспечивает протекание реакции при стабильном значении рН вне зависимости от состава и рН мочи;
- широкий диапазон линейной зависимости между величиной поглощения и концентрацией белка позволяет избежать необходимости разведения многих образцов мочи;
- стабильность окраски комплекса сохраняется в пределах часа, что достаточно для фотометрии большого числа образцов мочи;
- для анализа не требуется длительной подготовки мочи, достаточен малый объем пробы, реактив стабилен в течение длительного срока.

Метод оказывается чувствительным к вмешательству аминокликозидов, и степень вмешательства меняется в зависимости от состава рабочего реактива. Утверждают, что реактивы, выпускаемые компаниями «Dade Behring» и «Sigma», чувствительны к присутствию аминокликозидов в исследуемом образце, тогда как реактивы к анализаторам «Cobas Fara» и «Roche Integra 700 PRM» - нет [20]. Кроме того, реактив, использованный Fujita и соавт. [16] и Orsonneau и соавт. [21] более чувствителен к вмешательству, чем реактив, приготовленный по прописи Watanabe и соавт. [18]. Добавление в реактив детергентов, в частности додецилсульфата натрия (SDS), увеличивает степень вмешательства аминокликозидов, внесение оксалата натрия уменьшает данный эффект [22, 23].

Интерференция

Список препаратов, способствующих ложному завышению результатов определения концентрации белка в моче - внушительен [24]. В него входят: альдеслейкин, аminosалициловая кислота, аминофиллин, ампициллин, амфотерицин В, аскорбиновая кислота, аспаргиназа, аспирин, ауранофин, ацетазоламид, бацитрацин, беназеприл, бетаксол, ванкомицин, габапентин, гемцитабин, гентамицин, гидралазин, глибуридо, гризеофульвин, дантролен, демеклоциллин, дигидротрахистерол, доксапрам, доксицилин, железо, ибупрофен, изониазид, изотретиноин, индометацин, интерферон- α 2, ифосфамид, йодсодержащие препараты, канамицин, капреомицин, карбамазепин, кеторолак, клиндамицин, клофибрат, кодеин, колистин, кортикостероиды, кортикотропин, литий, метаксалон, метенамин, метицилин, мефенаминовая кислота, моксалактам, напроксен, неомицин, нестероидные

противовоспалительные препараты, нетилмицин, нифедипин, норфлоксацин, оксапрозин, оксациллин, олсалазин, омницеф, параметадион, парацетамол, паромомицин, пеницилламин, пенициллин, пиперациллин, пироксикам, пликамицин, пробенецид, промазин, рамиприл, ранитидин, рентгеноконтрастные вещества, рифампицин, салсалат, стрептокиназа, стрептомицин, сулиндак, сульфаметоксазол, сульфасалазин, сульфизоксазол, супрофен, такролимус, теофиллин, тетрациклин, тиабендазол, тикарциллин, тиклопидин, тобрамицин, толбутамид, толметин, трамадол, трифлуоперазин, феназопиридин, фенопрофен, фоскарнет, фуросемид, хинин, хлоргексидин, хлорпромазин, хлорпропамид, хлорталидон, хлорфенирамин, цефаклор, цефалоридин, цефалотин, цефамандол, цидофовир, циклоспорин, цисплатин, эналаприл, этосуксимид, этретинат.

Проблемы выбора метода

При выборе конкретного метода для количественного определения белка в моче следует руководствоваться следующими соображениями:

- величиной затрат на исследование с учетом стоимости реактивов, оборудования, времени, необходимого для его выполнения, и квалификации персонала лаборатории;
- аналитическими характеристиками метода, включающими чувствительность, специфичность, надежность;
- устойчивостью к воздействию экзогенных и эндогенных соединений, колебаниям белкового состава мочи.

Понятно, что в повседневной работе лаборатории при большом потоке образцов биуретовый метод представляется неудобным вследствие большого числа операций. В то же время он характеризуется высокой аналитической надежностью, позволяет определять белок в широком диапазоне концентраций и выявлять альбумин, глобулины и парапротеины со сравнимой чувствительностью, вследствие чего его рассматривают в качестве референтного и рекомендуют для сравнения с другими аналитическими методами [9]. По нашему мнению, биуретовый метод должен применяться в лабораториях, обслуживающих нефрологические отделения, и использоваться в тех случаях, когда результаты других методов представляются сомнительными, а также для определения величины суточной потери белка у нефрологических больных.

Судя по данным литературы, турбидиметрические методы количественного определения белка в моче плохо поддаются стандартизации, часто приводят к получению ошибочных результатов, что снижает их ценность для клинической практики. Эти методы в настоящее время продолжают широко использоваться в лабораториях из-за низкой стоимости и доступности реактивов, хотя ряд исследователей предлагают полностью отказаться от их применения [5].

Если исключить экономический аспект, методы, основанные на связывании красителей, или «индикаторные» методы, выполняются быстро при небольшом количестве операций и не требуют высокой квалификации персонала.

Достаточная чувствительность, хорошая воспроизводимость и простота делают

их перспективными. При этом все они, за исключением методов, основанных на использовании понсо S, оказываются весьма чувствительными к белковому составу мочи, «лучше» определяют альбумин, чем глобулины, и «недооткрывают» парапротеины.

Следует также считаться с рядом особенностей данной группы методов, обусловленных характером физико-химических реакций, положенных в их основу. Это отчетливо выявляется при анализе данных, полученных нами при сравнении результатов определения различными методами концентрации белка в моче больных трех групп: находившихся на лечении в терапевтическом отделении, пациентов после обширных хирургических вмешательств и больных с множественной миеломой (рис. 3-5).

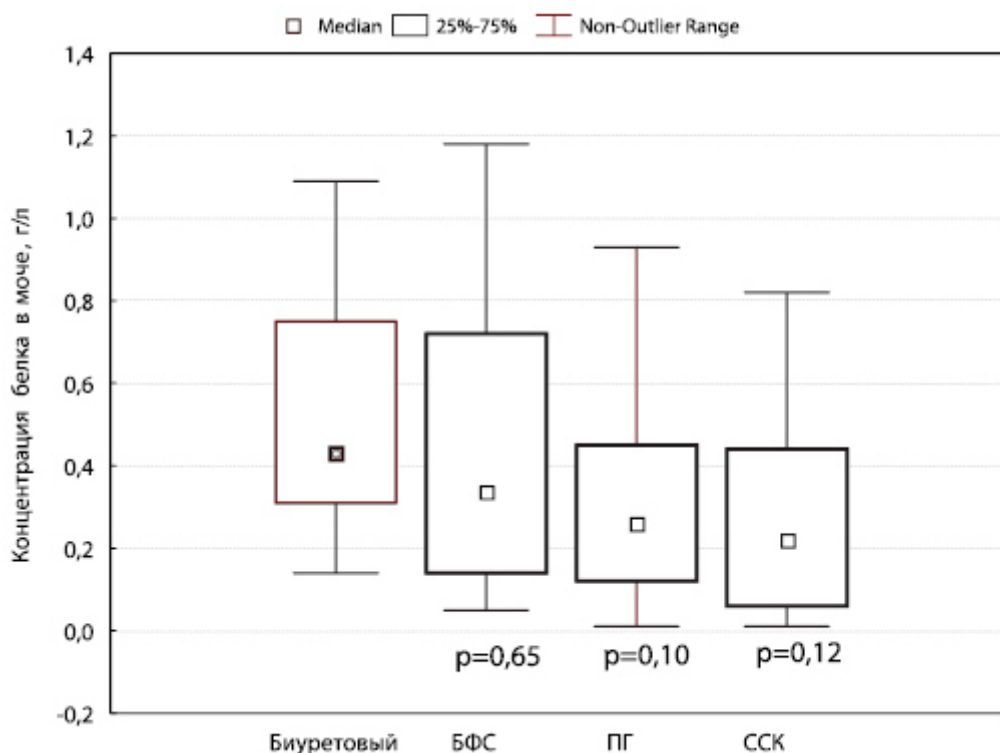


Рис. 3. Концентрация белка (г/л) в моче больных, находящихся на лечении в терапевтическом отделении

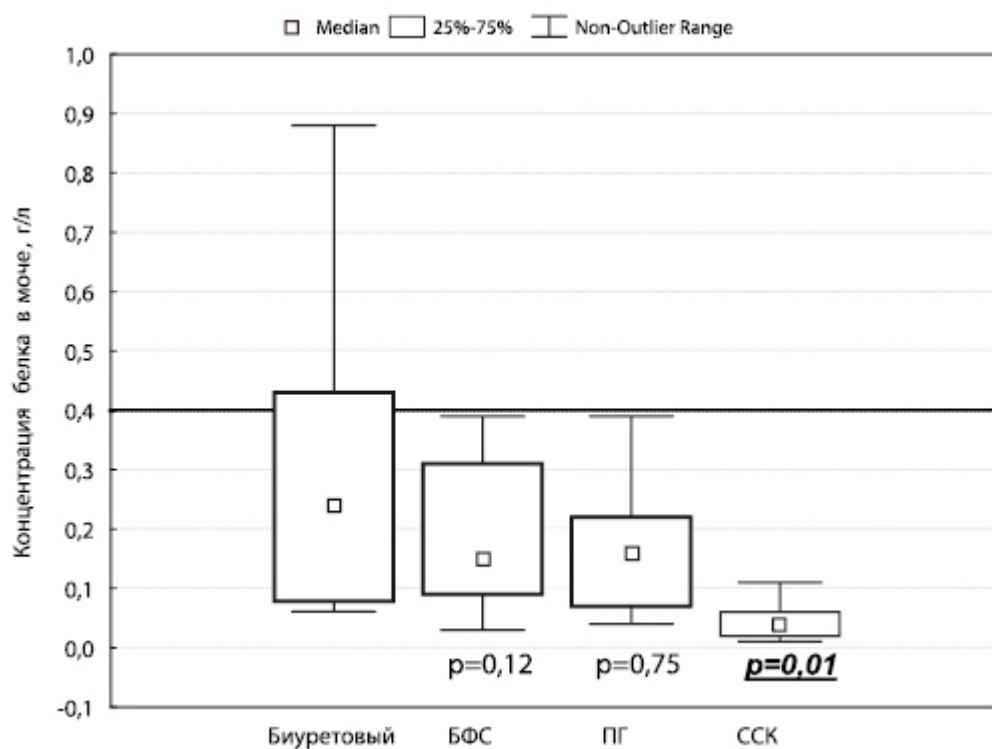


Рис. 4. Концентрация белка (г/л) в моче больных после обширных хирургических вмешательств

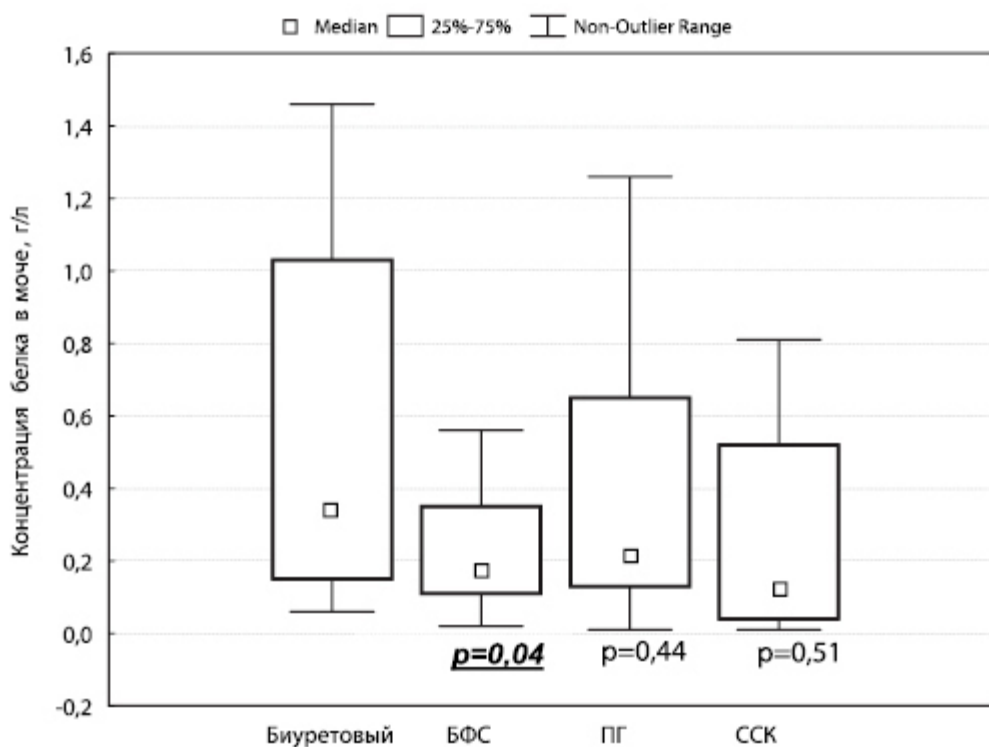


Рис. 5. Концентрация белка (г/л) моче больных с множественной миеломой

Как следует из представленных данных, при определении концентрации белка в

моче всеми методами у больных, находящихся на лечении в терапевтическом стационаре, статистической разницы в результатах не было выявлено. В моче больных с множественной миеломой использование метода с индикатором бромфеноловым синим приводило к достоверному занижению результатов по сравнению с другими методами. В моче пациентов после хирургических вмешательств применение турбидиметрического метода с сульфосалициловой кислотой привело к достоверному занижению результатов по сравнению с другими методами.

Таким образом, представленные нами результаты, а также данные литературы указывают, что для корректного определения концентрации белка в моче больных различных групп следует отдавать предпочтение методу, основанному на использовании индикатора пирогаллолового красного. При этом следует помнить о возможности интерферирующего влияния на его результаты многих лекарственных препаратов.

Кроме того, следует иметь в виду, что результаты количественного определения содержания белка в моче зависят от ее объема и степени разведения, в связи с чем результаты определения белка в образце мочи могут не совпадать с таковыми при исследовании мочи, собранной за 24 ч. Полагают, что введение поправки на величину осмолярности мочи (отношение белок/осмолярность) либо пересчет на содержание креатинина (отношение белок/креатинин) позволяет приблизить результаты определения белка в случайной пробе мочи к результатам определения белка в суточном количестве [25].

Определенные успехи были достигнуты в автоматизации количественных методов определения состава мочи, в том числе содержания белка. По мнению ряда авторов, она существенно повышает качество исследований [18]. В то же время следует помнить, что процесс адаптации метода к анализатору не затрагивает физико-химические основы метода, поэтому в нем практически полностью сохраняются особенности и недостатки, присущие ручному исходному варианту.

Референтные значения.

Вопрос относительно «нормальных» значений концентрации белка в моче, в том числе и в утренней пробе, до сих пор остается открытым, поскольку результаты напрямую зависят от используемого метода. Всем хорошо известные значения 0,033 г/л справедливы только для полуколичественного метода Робертса - Стольниковца с использованием азотной кислоты либо реактива Ларионовой.

Что же касается другого унифицированного метода, основанного на использовании сульфосалициловой кислоты, то в большинстве руководств или методических пособий этот вопрос остается без ответа [26, 27].

По мнению большинства исследователей, за сутки здоровый человек выделяет не более 150 мг белка. В исследовании, проведенном J. Leman и B. Dumas, были представлены определенные значения: здоровый человек за сутки выделяет с мочой 44 ± 7 мг белка (колебания от 11 до 115 мг). Различий в величине суточной протеинурии у мужчин ($n=39$; 42 ± 26 мг/сут) и женщин ($n=21$; 46 ± 26 мг/сут) не

было выявлено [25].

Для того чтобы понять суть рекомендации большинства современных публикаций о верхней границе «нормы» в 150 мг, следует учитывать два важных обстоятельства.

1. Экскреция белка с мочой меняется в течение суток и зависит от множества факторов: физической активности, приема жидкости, пищи, стрессовых ситуаций, нагрузки и т.д. В связи с этим достаточно часто у практически здорового человека без указаний на заболевания почек в анамнезе в первой утренней порции мочи концентрация белка может быть достаточно высокой, но величина суточной протеинурии может укладываться в пределы 150 мг.

2. Величина «нормы» зависит от конкретного метода, белкового состава мочи и калибровочного раствора. Указанная величина 150 мг/сут справедлива для пирогаллолового метода. При этом должна быть исключена возможность попадания белка в мочу в результате ошибок при сборе мочи на преаналитическом этапе.

Список литературы

1. Козлов А. В. Протеинурия. Методы ее выявления / А. В. Козлов. - Тверь: ООО "Издательство "Триада", 2008.?- 60 с
2. Pesce A. J. Proteinuria: an integrative revue / A. J. Pesce, M. R. Furst. - N.Y., 1979.
3. Koller A. Total urinary protein / A. Koller // Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation / eds.: L. A. Kaplan, A. S. Pesce, 1984. - P. 1319-1325.
4. Whelton A. Nitrogen metabolites and renal function / A. Whelton, A. J. Watson, R. C. Rock // Textbook of clinical chemistry / ed. N. W. Tietz. - Philadelphia: WB Saunders Co., 1986. - P. 1513-1568.
5. Chambers R. E. Urinary total protein estimation-fact or fiction / R. E. Chambers, D. G. Bullock, J. T. Whicher // Nephron. - 1989. - Vol. 53, № 1. - P. 33-36.
6. Shumann G. B. Examination of urine / G. B. Shumann // Clinical Chemistry. Theory, analysis and correlation / eds. N. O. Kaplan, A. J. Pesce. - C. V. Mosby Company, 1984. - P. 996-1031.
7. Shriever H. Protein turbidity produced by trichloroacetic acid and sulfosalicylic acid at varying temperatures and varying rates of albumin and globulin / H. Shriever, S. P. Gambino // Am. J. Clin. Pathol. - 1965. - Vol. 44. - P. 667-672.
8. Pesce M. A. A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine / M. A. Pesce, C. S. Strande // Clin. Chem. - 1973. - Vol. 19, № 11. - P. 1265-1273.
9. Dilena B. A. Six methods for determination urinary protein compared / B. A. Dilena, L. A. Penberty, C. G. Fraser // Clin. Chem. - 1983. - Vol. 29, № 3. - P. 553-557.
10. Ramakers J. M. Coumassie Blue: an alternative procedure for proteins / J. M. Ramakers // Clin. Chem. - 1984. - Vol. 20, № 8. - P. 1433-1434.
11. Bowie L. Characteristics of binding between reagent strip indicator and urinary proteins / L. Bowie, S. T. Smith, N. Gochman // Clin. Chem. - 1977. - Vol. 23, № 1. - P. 128-130.
12. Карягина И. Ю. Экспресс-метод количественного определения белка в моче / И. Ю. Карягина, В. В. Слепышева, А. В. Козлов // Клини. лаб. диагностика. - 1996. - № 6. - С. 27-28.

13. *Schosinsky K. H.* Simple spectrophotometric determination of urinary albumin by dye binding with use of bromphenol blue / K. H. Schosinsky, M. Vargas, A. L. Esquivel, M. A. Chavarria // *Clin. Chem.* - 1987. - Vol. 33, № 2. - P. 223-226.
14. *Jung K.* Nonprotein components of urine interfere with colorimetry of urinary albumin with bromphenol Blue / K. Jung, E. Niskel // *Clin. Chem.* - 1989. - Vol. 35, № 2. - P. 336-337.
15. *Швецова Д. Г.* Применение тест-полосок для определения состава мочи / Д. Г. Швецова, А. В. Козлов // *Лабораторная диагностика.* - 2006. - № 2. - С. 21-27.
16. *Fujita Y.* Color reaction between Pyrogallol Red-molybdenum (VI) complex and protein / Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano // *Bunseki Kagaku.* - 1983. - Vol. 32. - E379-E386.
17. *Шварценбах Г.* Комплексонометрическое титрование / Г. Шварценбах, Г. Флашка : пер. с нем. - М. : Химия, 1970. - 360 с.
18. *Watanabe N.* Urinary protein as measured with a Pyrogallol-Red-Molybdate complex manually and in a Hitachi 726 automated analyzer / N. Watanabe, S. Kamel, A. Ohkubo [et al.] // *Clin. Chem.* - 1986. - Vol. 32. - P. 1551-1554.
19. *Пупкова В. И.* Определение белка в моче и спинномозговой жидкости : информационно-методическое пособие / В. И. Пупкова, Л. М. Прасолова; ЗАО "ВЕКТОР-БЕСТ". - Кольцово, 2005.
20. *Koerbin G.* Aminoglycoside interference with the Dade Behring Pyrogallol red-molybdate method for the measurement of total urine protein [Letter] / G. Koerbin, L. Taylor, J. Dutton [et al.] // *Clin. Chem.* - 2000. - Vol. 47. - P. 2183-2184.
21. *Orsonneau J. L.* An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein / J. L. Orsonneau, P. Douet, C. Massoubre [et al.] // *Clin. Chem.* - 1989. - Vol. 35. - P. 2233-2235.
22. *Marshall T.* Aminoglycoside interference in the Pyrogallol red-molybdate protein assay is increased by the addition of sodium dodecyl sulfate to the dye reagent [Letter] / T. Marshall, K. M. Williams // *Clin. Chem.* - 2003. - Vol. 49. - P. 2111-2112.
23. *Marshall T.* Extent of aminoglycoside interference in the pyrogallol red-molybdate assay depends on the concentration of sodium oxalate in the dye reagent / T. Marshall, K. M. Williams // *Clin. Chem.* - 2004, Vol.50, P.934-935.
24. *A manual of laboratory & diagnostic tests / eds.: F. Fischbach, M. Dunning.* - 7th ed. - Philadelphia, 2004. - 1291 p.
25. *Leman J., Doumas B. T.* Proteinuria in health and disease assessed by measuring the urinary protein/creatinine ratio // *Clin. Chem.* - 1987. - Vol. 33, № 2. - P. 297-299.
26. *Морозова В. Т.* Исследование мочи / В. Т. Морозова, И. М. Миронова, Р. Л. Марцишевская. - М. : РМАПО, 2006.
27. *Методические указания по применению унифицированных клинических лабораторных методов исследований / под ред. В. В. Меньшикова.* - М., 1973.