

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 23, 1985, pp. 57–62

Quantitative Proteinbestimmung im Harn mit einer empfindlichen Streulichtmethode

Von H. Kirchherr und H.-W. Schiwara

Aus dem Labor Dr. Schiwara, Dr. von Winterfeld, Dr. Pfanzelt, Bremen

(Eingegangen am 26. Juli/12. Oktober 1984)

Zusammenfassung: Die von Reiber ((1980) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 123–127) beschriebene Streulichtmethode für die Proteinbestimmung im Liquor eignet sich auch zur Messung des Gesamteiweißes im Harn. Die Meßbereiche sind 50–500 mg/l (Methode A) und 5–70 mg/l (Methode B). Konzentrationen > 150 mg/l korrelieren gut mit der Biuret- und der Coomassie-Methode ($r = 0,9804$ bzw. $0,9925$). Proteinkonzentrationen < 150 mg/l weisen nur mit dem empfindlichen Albumin-Enzymimmunoassay eine gute Korrelation auf ($r = 0,9342$). Medikamenteneinflüsse konnten für Penicillin, Gentamycinsulfat, Dihydralazinsulfat, Amoxicillin und Furosemid nicht nachgewiesen werden. Bei 52 offensichtlich gesunden Personen wurde eine Proteinausscheidung von 7–56 mg/24 h (90%-Vertrauensbereich) gefunden.

Quantitation of urinary protein by a sensitive nephelometric method

Summary: The nephelometric method of Reiber ((1980) J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 123–127) for quantitation of proteins in cerebrospinal fluid was modified for urine. Protein concentrations between 50 and 500 mg/l (method A) or between 5 and 70 mg/l (method B) can be measured. Values > 150 mg/l correlate well with the Biuret- and the Coomassie method ($r = 0.9804$ and $r = 0.9925$, respectively). For lower concentrations, only albumin, determined by an enzyme-immuno-assay, gave a good correlation ($r = 0.9342$). The following pharmaceuticals did not influence the results: penicillin, gentamycin sulphate, dihydralazine sulphate, amoxicillin and furosemide. A reference range of 7–56 mg/24 h was established ($n = 52$, 90% confidence interval).

Einführung

Die Gesamtproteinbestimmung im Harn wird hauptsächlich mit der Biuret- (1) oder der Coomassie-Reaktion (2), seltener mit turbidimetrischen Methoden (3) durchgeführt. Keines dieser Verfahren ist ausreichend empfindlich für die zuverlässige Messung der Harnproteine im Normalbereich. Dieses ist jedoch eine wichtige Voraussetzung, um bei der diskelektrophoretischen Differenzierung von Proteinurien sehr unterschiedlicher Konzentration (Gesamteiweiß im Harn 10 bis > 10.000 mg/l) die Gele gleichmäßig beladen und vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können. Wir haben daher die von Reiber (4) für die Liquorproteinbestimmung beschriebene Streulichtmethode auf ihre Eignung für unsere Problemstellung untersucht. Die bekannten turbidimetrischen

Methoden sind relativ ungenaue Meßverfahren ohne stabilen Streulichtendwert. Bei der Methode von Reiber dagegen durchläuft die Streulichtintensität je nach Proteinkonzentration nach wenigen Sekunden bis Minuten ein gut definierbares Maximum. Dieses maximale Streulichtsignal ist linear proportional zur Proteinkonzentration.

Material und Methode

Reagenzien

Trichloressigsäure p. A. (Merck, Darmstadt), Humanserumalbumin (Behringwerke, Marburg), Saures α_1 -Glykoprotein (Sigma, St. Louis), Myoglobin (Serva, Heidelberg), IgG (Cutter, Berkeley), Kontrollserum Precinorm U (Boehringer, Mannheim), Albustix (Ames, Paris).

Folgende *Medikamente* wurden uns freundlicherweise kostenlos zur Verfügung gestellt:

Penicillin (Heyl, Berlin) Gentamycinsulfat (Merck, Darmstadt), Dihydralazinsulfat (Henning, Berlin), Amoxicillin und Furosemid (Ratiopharm, Blaubeuren).

Streulichtmethode

Etwa 1 ml Urin wird zentrifugiert (2 min bei 9600 g, Eppendorf-Zentrifuge). Die Proteinkonzentration wird durch Screening-Test (Albustix®) geschätzt und der Urin gegebenenfalls entsprechend verdünnt. Die Trichloressigsäurelösung und das verwendete dest. Wasser werden durch 0,45 µm Filter (Millipore, Bedford) filtriert. Die Messung erfolgt am Beckman Immunochemistry Analyzer (70° Vorwärtsstreuung, 400–550 nm) im Scatter Mode mit angeschlossenem Schreiber.

A) Meßbereich 50–500 mg/l

In einer Rundküvette mit Rührer werden bei laufender Registrierung und eingeschaltetem Rührwerk 50 µl Urin zu 550 µl 2,4 mol/l Trichloressigsäure pipettiert. Das maximale Streulichtsignal wird abgelesen. Der Leerwert für die Trichloressigsäure wird subtrahiert. Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe einer Humanserumalbuminlösung (200 mg/l) als Standard ermittelt.

B) Meßbereich 5–70 mg/l

350 µl Urin werden in einer Rundküvette mit Rührer vorgelegt. Man pipettiert bei laufender Registrierung und eingeschaltetem Rührwerk 250 µl 5,28 mol/l Trichloressigsäure hinzu und be-

stimmt das maximale Streulichtsignal. Der Leerwert wird gesondert ermittelt durch Zugabe von 250 µl dest. Wasser zu 350 µl Urin. Als Standard dient eine Humanserumalbuminlösung (25 mg/l). Falls sich Gasblasen bilden (erkennbar an stark schwankenden Scatterwerten), nimmt man die Küvette kurz aus der Halterung und entfernt die Blasen durch leichtes Klopfen gegen die Küvettenwand. Die Bildung von Gasblasen läßt sich vermeiden, wenn alkalische Urine zuvor neutralisiert werden.

Vergleichsmethoden

Proteinbestimmungen im Harn wurden außerdem mit der Buretmethode (Testkombination Boehringer Mannheim) und mit Coomassie Brilliant Blue G250 (5) durchgeführt. Als Standards dienen bei der Coomassie-Methode Humanserumalbuminlösungen der Konzentrationen 10–800 mg/l.

Die quantitative Bestimmung von Albumin im Harn erfolgte mit einem Doppel-Antikörper-Sandwich ELISA (6).

Ergebnisse

Linearität

Im gesamten Meßbereich besteht lineare Abhängigkeit zwischen maximaler Streulichtintensität und Proteinkonzentration (Abb. 1).

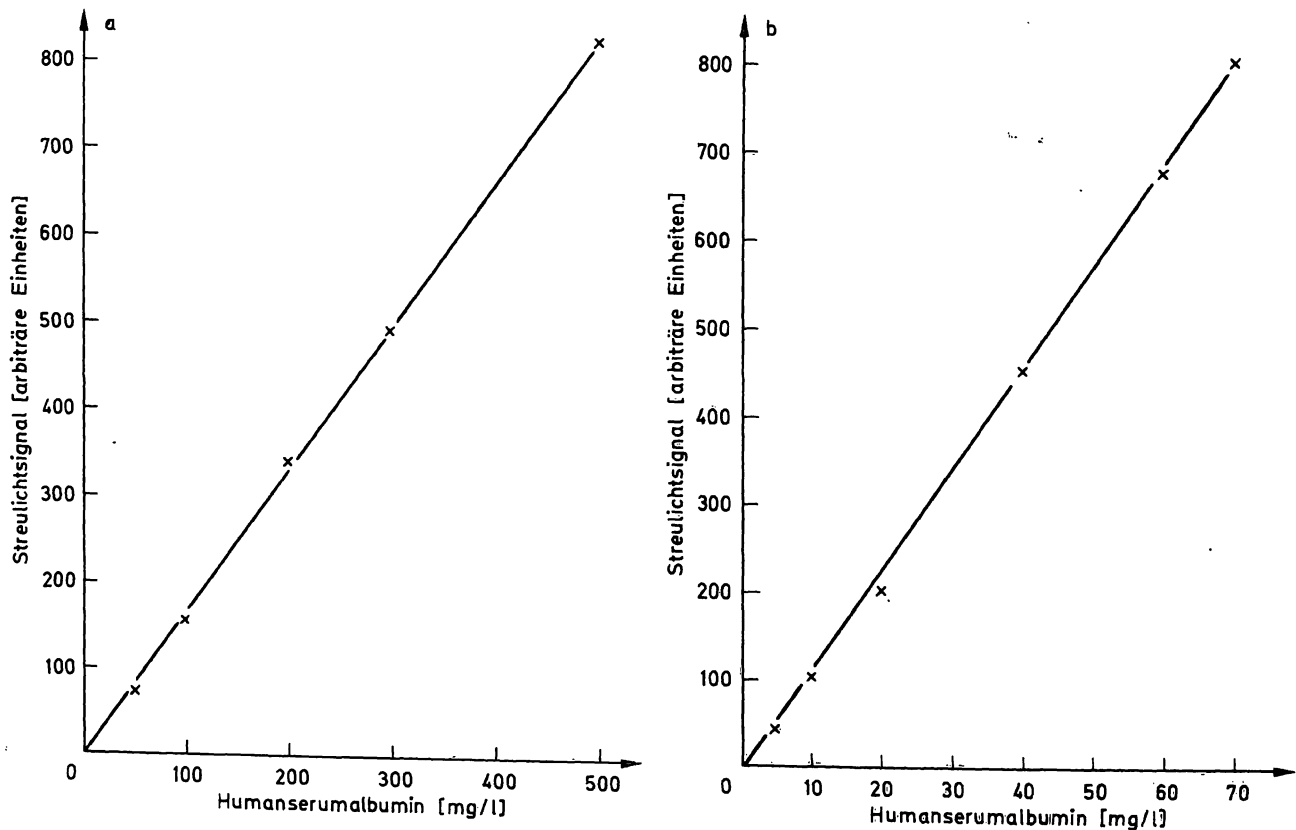


Abb. 1. Standardreihe Humanserumalbumin.

a) Methode A (Meßbereich 50–500 mg/l), $y = 1,66x - 4,76$, $r = 0,9997$,
 b) Methode B (Meßbereich 5–70 mg/l), $y = 11,66x - 19,2$, $r = 0,9999$.

Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit der Methode läßt sich durch Ermittlung des Diskriminierungsvermögens (7) beurteilen. Es wurden 4 Urine mit einer Proteinkonzentration von 10–15 mg/l je 11mal vermessen und der Mittelwert berechnet. Ein Unterschied von 1 mg/l konnte noch eindeutig diskriminiert werden. Die sich daraus ergebende Nachweisgrenze von 1 mg/l erscheint jedoch wegen der langen Meßzeiten unrealistisch. Dagegen ist eine Nachweisgrenze von 5 mg/l praktikabel (Abb. 6).

Spezifität

Verschiedene Reinproteine wurden mit der Methode untersucht. Bezogen auf Humanalbumin betragen die maximalen Streulichtintensitäten bei einer Konzentration von 400 mg/l für IgG 100%, Transferrin 81% und Myoglobin 92% (Abb. 2). Der Korrelationskoeffizient der Standardgeraden war in allen Fällen größer als 0,996. Saures α_1 -Glykoprotein wird wie bei der Biuret-Methode nicht erfaßt. Der Einfluß von 5 gängigen Medikamenten wurde untersucht (8). Penicillin (15 Mio. i. E./l), Amoxicillin (3 g/l), Gentamycinsulfat (0,3 g/l), Furosemid (0,25 g/l) und Dihydralazinsulfat (0,1 g/l) wurden einer Humanserumalbuminlösung (200 mg/l) und je 5 Patientenurinen (Konzentrationsbereich 25–6000 mg/l) zugemischt. Ein Einfluß konnte nicht nachgewiesen werden. Die gefundene mittlere Abweichung von 2–3% kann als statistische Streuung gewertet werden.

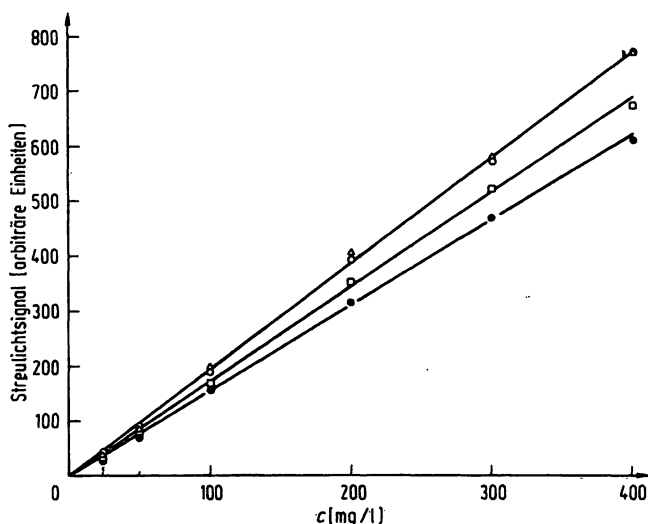


Abb. 2. Vergleich verschiedener Reinproteine im Konzentrationsbereich 25–400 mg/l.

- Humanalbumin,
- △—△ IgG,
- Myoglobin,
- Transferrin.

Vergleich mit anderen Methoden

116 bzw. 105 Patientenurine wurden mit der Streulicht-, der Biuret- und Coomassie-Methode untersucht (Abb. 3 und 4). Außerdem wurden in 52 Normalurinen das Gesamteiweiß mit der Streulicht- und

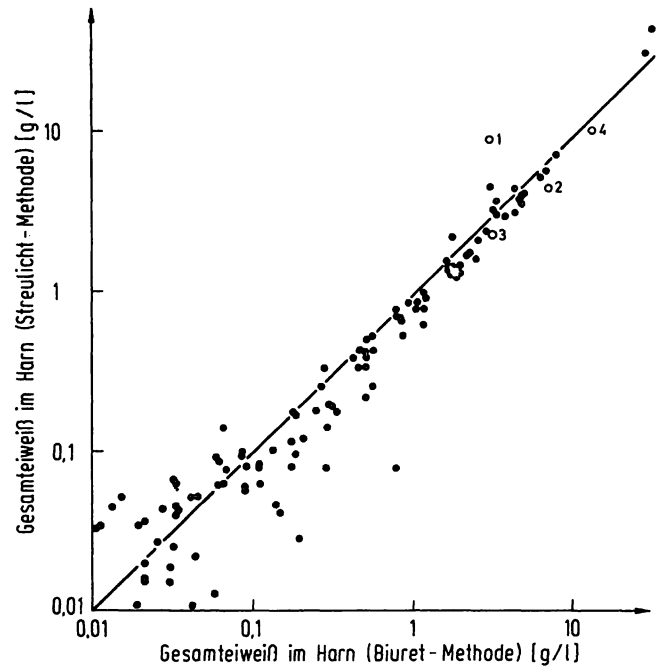


Abb. 3. Gesamteiweiß im Harn. Methodenvergleich: Streulichtmethode/Biuret.

116 Patientenurine. Die Urine mit *Bence-Jones*-Proteinen sind besonders gekennzeichnet (°).

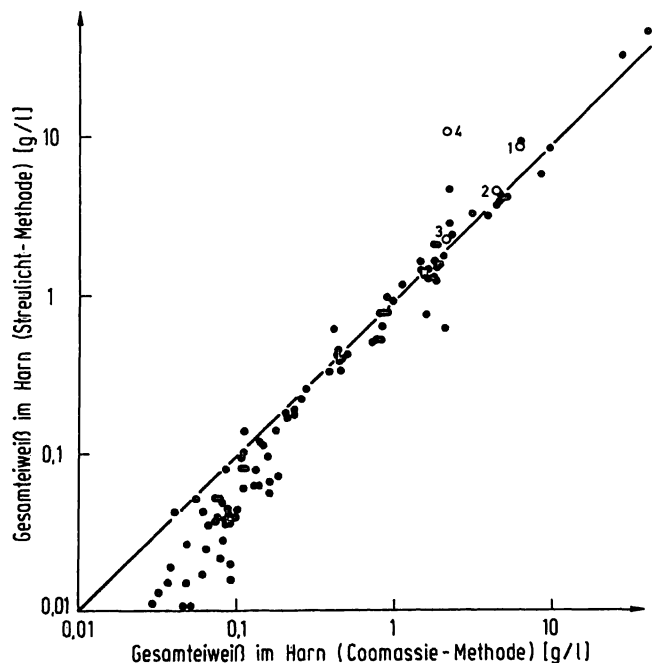


Abb. 4. Gesamteiweiß im Harn. Methodenvergleich: Streulichtmethode/Coomassie.

105 Patientenurine. Die Urine mit *Bence-Jones*-Proteinen sind besonders gekennzeichnet (°).

der Coomassie-Methode sowie das Albumin enzymimmunologisch gemessen. Die gefundenen Werte wurden korreliert (Tab. 1). Eine gute Korrelation fand sich zwischen Streulicht- und Coomassie- sowie Streulicht- und Biuretmethode bei Proteinkonzentrationen > 150 mg/l. Bei Proteinkonzentrationen < 150 mg/l war die Korrelation deutlich schlechter. Besser dagegen korrelierten Streulichtmethode und Albumin in diesem Konzentrationsbereich.

Richtigkeit

Die Richtigkeit wurde mit 1:200 verdünntem Precinorm U (Sollwert 51 g/l) ermittelt. Die mittlere Abweichung vom Sollwert an 3 Tagen (n = 3) betrug 2,0%. Mit 3 Urinen (2, 9 und 94 mg/l) wurde eine Aufstockung von Humanserumalbumin (25, 50, 100, 200 und 400 mg/l) durchgeführt. Die Wiederfindung betrug 91–105%. Der Korrelationskoeffizient der ermittelten Geraden lag über 0,999.

Referenzbereich

Bei 52 klinisch offensichtlich gesunden Personen wurden im 24 h Sammelurin die in Tabelle 2 dargestellten Protein- bzw. Albuminausscheidungen gefunden. Die Histogramme der Referenzwertverteilungen sind in Abbildung 5 dargestellt.

Präzision

Die Präzision in Serie (n = 21) wurde an jeweils drei Patientenurinen mit Methode A und B ermittelt und mit der Coomassie- und Biuretmethode verglichen (Tab. 3). Die Urine 5 und 6 wurden nicht mit der Coomassie- und Biuretmethode untersucht, da die Proteinkonzentrationen nahe oder unterhalb der in der Literatur angegebenen Nachweisgrenzen von 30 bzw. 90 mg/l liegen (5). Für die Präzision von Tag zu Tag betrug bei Verwendung von 1:200 verdünntem Precinorm U der VK = 6,5% (n = 20, \bar{x} = 277 mg/l).

Zeitbedarf

Der Zeitaufwand für die einzelne Messung ist abhängig von der Proteinkonzentration in der Probe. In Abbildung 6 sind die Meßzeiten für Humanserumalbuminlösungen dargestellt. Bei einer Konzentration von 400 mg/l beträgt die Meßzeit etwa 30 s, bei 20 mg/l dagegen schon 600 s (Methode A). Wird die Albuminlösung mit der Konzentration 20 mg/l mit der Methode B gemessen, erreicht die Streulichtintensität schon nach etwa 60 s ihr Maximum.

Tab. 1. Lineare Regression und Korrelationskoeffizienten für Gesamtprotein (Streulicht-, Coomassie- und Biuretmethode) sowie Albumin (Enzymimmunoassay) im Harn.

| Methodenvergleich | Regressionsgerade | Korr.-koeff. | n |
|----------------------------------|----------------------|--------------|-----|
| <i>Patientenurine</i> | | | |
| Streulicht (y), Coomassie (x) | | | |
| alle Werte | $y = 1,31x - 288,4$ | 0,9901 | 105 |
| > 150 mg/l | $y = 1,32x - 512,3$ | 0,9925 | 56 |
| < 150 mg/l | $y = 0,68x - 9,05$ | 0,7503 | 49 |
| Streulicht (y), Biuret (x) | | | |
| alle Werte | $y = 1,25x - 353,0$ | 0,9758 | 116 |
| > 150 mg/l | $y = 1,29x - 417,4$ | 0,9804 | 67 |
| < 150 mg/l | $y = 0,58x + 18,9$ | 0,7792 | 49 |
| <i>Normalurine</i> | | | |
| Streulicht (x), Albumin (y) | | | |
| | $y = 0,349x - 1,95$ | 0,9342 | 50 |
| Streulicht (y), Coomassie (x) | | | |
| | $y = 0,388x + 3,01$ | 0,6368 | 52 |
| Coomassie (x), Albumin (y) | | | |
| | $y = 0,1887x - 3,06$ | 0,5752 | 50 |

Tab. 2. Referenzbereich und Mittelwerte von 52 offensichtlich gesunden Personen für Gesamtprotein (Streulicht- und Coomassiemethode) und Albumin (Enzymimmunoassay) (Ausscheidung in mg/24 h).

| Methode | Bereich | \bar{x} | Median | 90% Vertrauensbereich |
|------------|----------|-----------|--------|-----------------------|
| Streulicht | 5–70 | 23,2 | 20,5 | 7–56 |
| Coomassie | 14–101 | 53,8 | 49,5 | 23–97 |
| Albumin | 1,9–20,5 | 7,61 | 5,4 | 2,1–16,0 |

Diskussion

Die Streulichtmethode von Reiber (4) ist ein einfaches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Gesamteiweißes im Harn. Im Gegensatz zu der Biuret- und der Coomassie-Methode sind auch im Normalbereich zuverlässige Messungen möglich, eine wichtige Voraussetzung für die diskelektrophoretische Differenzierung von Harnproteinen. Bei Proteinurien von unter 150 mg/l findet sich eine gute Korrelation zwischen den mit der Streulichtmethode gemessenen Protein- und den enzymimmunologisch bestimmten Albuminkonzentrationen. Die Mittelwerte verhalten sich wie 3:1 (Tab. 2). Dieses Verhältnis stimmt gut mit den Angaben aus der Literatur überein, wonach der Anteil von Albumin am Gesamteiweiß in Normalurinen etwa 30% betragen soll (9). Im Konzentrationsbereich über 150 mg/l ist die Übereinstimmung mit der Biuret- und der Coomassiemethode gut. Mit unterschiedlichen Proteinen (Albumin, Immunglobu-

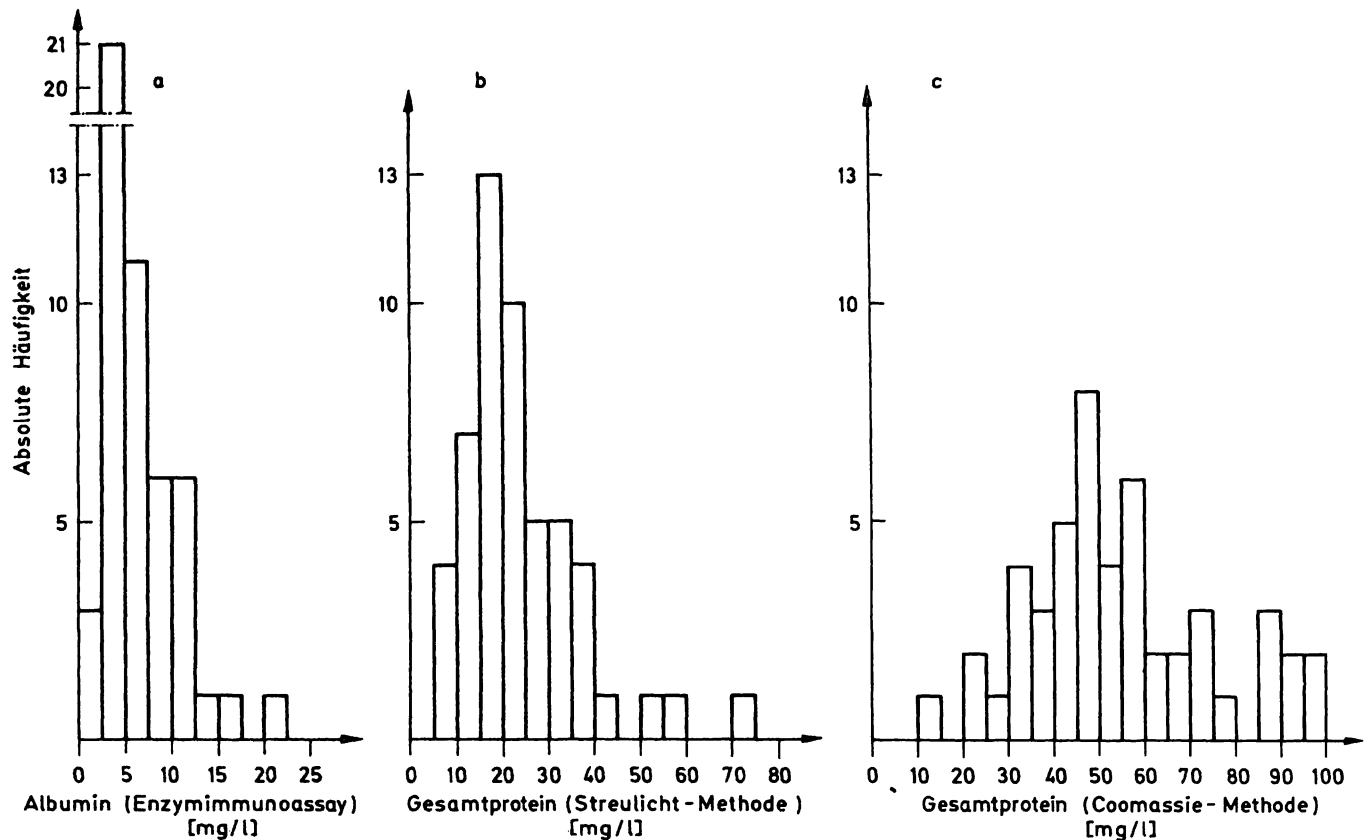


Abb. 5. Histogramm der Tabelle 2 zugrundeliegenden Einzelwerte.

a) Albumin (n = 50), b) Gesamtprotein, Streulichtmethode (n = 52), c) Gesamtprotein, Coomassie-Methode (n = 52).

Tab. 3. Präzision in Serie. Vergleich von Streulicht-, Coomassie- und Biuretmethode.

 \bar{x} = Mittelwert

s = Standardabweichung

VK = Variationskoeffizient

| Methode | Probe Nr. | \bar{x} (mg/l) | x_{\min} (mg/l) | x_{\max} (mg/l) | s (mg/l) | VK (%) |
|--------------|-----------|------------------|-------------------|-------------------|----------|--------|
| Streulicht A | 1 | 447 | 438 | 458 | 6,42 | 1,4 |
| | 2 | 187 | 182 | 194 | 3,59 | 1,9 |
| | 3 | 124 | 120 | 128 | 2,86 | 2,3 |
| Streulicht B | 4 | 59 | 58 | 61 | 0,665 | 1,1 |
| | 5 | 36 | 35 | 37 | 0,914 | 2,5 |
| | 6 | 11 | 10 | 11 | 0,291 | 2,8 |
| Coomassie | 1 | 413 | 404 | 421 | 4,64 | 1,1 |
| | 2 | 200 | 195 | 205 | 3,04 | 1,5 |
| | 3 | 136 | 130 | 140 | 2,46 | 1,8 |
| | 4 | 68 | 64 | 70 | 1,72 | 2,5 |
| Biuret | 1 | 645 | 597 | 676 | 19,40 | 3,0 |
| | 2 | 242 | 209 | 294 | 22,64 | 9,3 |
| | 3 | 116 | 92 | 150 | 16,06 | 13,9 |
| | 4 | 73 | 51 | 90 | 9,37 | 12,8 |

lin G, Transferrin und Myoglobin) werden vergleichbare Streulichtintensitäten gemessen. Bei *Bence-Jones*-Proteinurien sind die mit der Streulicht- und der Biuretmethode erhaltenen Werte gut vergleichbar. Mit der Coomassie-Methode lagen die Konzentrationen z. T. viel niedriger. Medikamenteneinflüsse konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Methode hat sich in der Routinediagnostik bewährt. Nachteilig ist der relativ kleine Meßbereich, der bei den sehr unterschiedlich hohen Proteinurien (10–>10000 mg/l) Wiederholungen der Messung nach Methode B oder nach entsprechender Probenverdünnung erforderlich machen kann. Das Verfahren kann zur Zeit nicht mechanisiert werden.

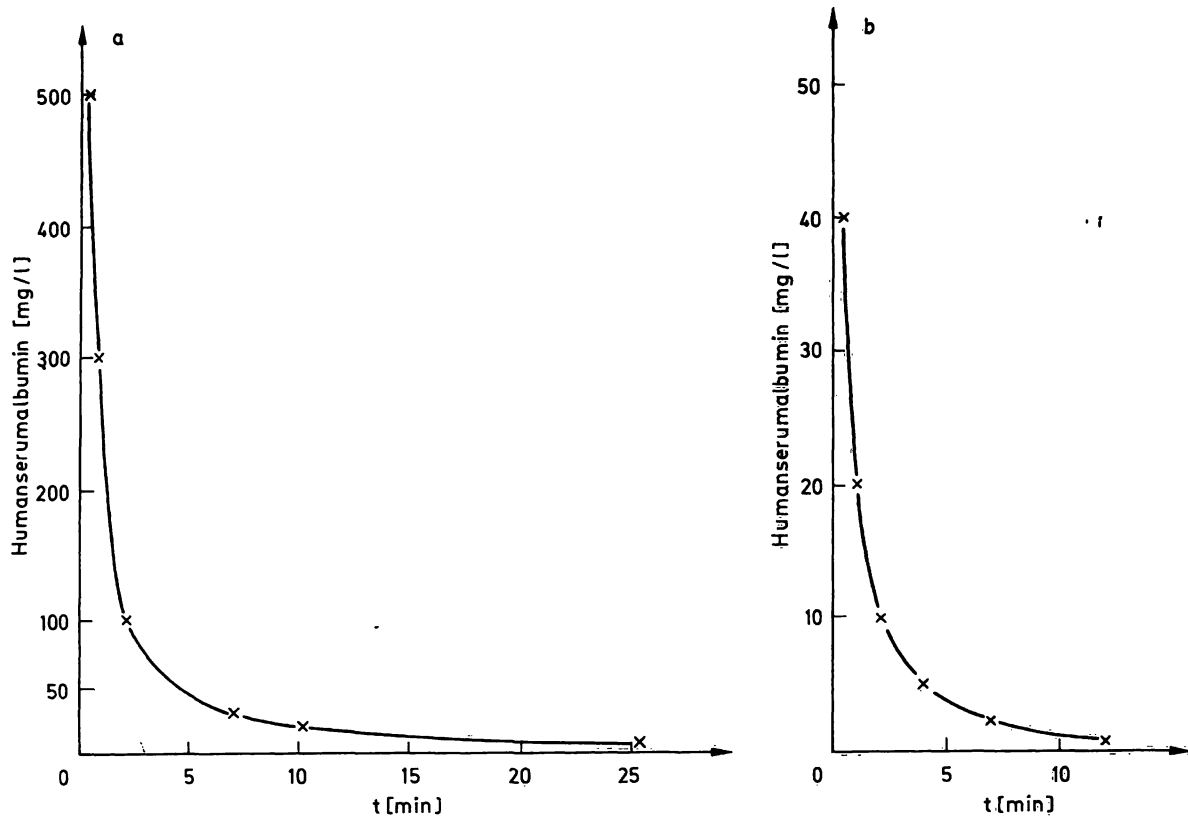


Abb. 6. Zeitbedarf für die Proteinbestimmung mit der Streulichtmethode, untersucht an Humanserumalbuminlösungen.

- a) Methode A (10–500 mg/l),
b) Methode B (1–40 mg/l).

Literatur

1. Weichselbaum, T.E. (1946) *Amer. J. Clin. Pathol.* 16, 40–49.
2. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
3. Henry, R.J., Cannon, D.C. & Winkelman, J.W. (1974) *Clinical Chemistry, Principles and Technics*, S. 430–431, Harper and Row, New York.
4. Reiber, H. (1980) *diese Z.* 18, 123–127.
5. Thomas, L., Winkelmann, M., Michaelis, H.C. & Walb, D. (1981) *diese Z.* 19, 203–208.
6. Hebell, Th. & Schiwara, H.W., Publikation in Vorbereitung.
7. Markowetz, D. & Munz, E. (1981) In: *Methodische Fortschritte im Laboratorium. Kurzreferate* (Rösler-Engelhardt, A. Hrsg.), S. 114, Verlag Kirchheim, Mainz.
8. Weber, M.N., Bitter, T. & Scheler, F. (1983) *Lab. Med.* 7, 155–163.
9. Thomas, L. (1984) *Labor und Diagnose*, 2. Aufl., S. 334, Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn.

Dipl.-Chem. H. Kirchherr
Dr. med. H.-W. Schiwara
Straßburger Straße 19
D-2800 Bremen 1