

Methodische Möglichkeiten zur quantitativen Bestimmung der Proteinurie*

L. Thomas

Zentrallabor Krankenhaus Nordwest, Frankfurt

Zusammenfassung:

Die Diagnostik der pathologischen Proteinurie ist im Wandel begriffen. Während zur Zeit noch der Streifentest und die Gesamteiweißbestimmung in der Proteindiagnostik von Nierenerkrankungen im Vordergrund stehen, gewinnt die quantitative Bestimmung von Plasmaproteinen im Harn eine gewisse Bedeutung. Ursachen sind, neben einer mangelnden diagnostischen und analytischen Sensitivität und Spezifität des Streifentests und der Gesamteiweißbestimmungsmethoden, der technische Fortschritt in der mechanisierten immunonephelometrischen oder immunturbidimetrischen Analytik der Plasmaproteine im Harn.

Schlüsselwörter:

Proteinurie – Plasmaproteinbestimmung im Harn – Gesamteiweißbestimmung im Harn

Summary:

The diagnostic procedures to analyze a pathologic proteinuria as an indicator of kidney diseases are changing.

Traditional methods used momentary are the test strip for the semiquantitative determination of albumin and the Biuret-reaction for the quantitation of total protein excretion. However the quantitation and differentiation of proteinuria by plasma protein determination in urine will be a valuable supplement or alternative in near future. The reasons are a limited diagnostic and analytical sensitivity and specificity of the traditional tests and the advance in the mechanized immunonephelometric or immunturbidimetric determination of plasma proteins in urine.

Keywords:

Proteinuria – plasma protein determination in urine – total protein determination in urine

Einleitung

Die pathologische Eiweiß-Ausscheidung ist ein wichtiges Leitsymptom zur Diagnostik primärer und sekundärer Nierenerkrankungen (1, 2).

Pathologisch kann die Eiweiß-Ausscheidung sein in Form

– Einer erhöhten Gesamteiweiß-Ausscheidung im 24 Std.-Sammelurin. Der Trennwert normal/pathologisch ist dabei abhängig von der Eiweißbestimmungsmethode.

– Eines pathologischen Proteinmusters bei schon erhöhter oder noch normaler Gesamteiweiß-Ausscheidung, z. B. pathologisches Harnproteinmuster in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei einer tubulären Nierenerkrankung.

– Der vermehrten Ausscheidung von Einzelprotein, bei noch normaler oder erhöhter Gesamteiweiß-Ausscheidung, z. B. Mikroalbuminurie bei diabetischer Nephropathie oder die Bence-Jones-Proteinurie und die Myoglobinurie als Überlaufproteinurien.

Der Endharn des Gesunden enthält etwa 500 verschiedene Proteine, von denen über 90% nicht identifiziert sind. Nur etwa 10% der physiologischen Gesamteiweiß-

Ausscheidung sind Plasmaproteine. Die restlichen Proteine, auch als postglomeruläre Proteine bezeichnet, entstammen der Niere selbst oder den ableitenden Harnwegen. Das Verhältnis von Plasmaproteinen zu postglomerulären Proteinen ist deshalb im zweiten morgendlichen Spontanurin wesentlich höher als im ersten.

Albumin ist mit im Mittel 8 mg/24 Std. (Bereich 2 – 15 mg/24 Std.) das konzentrationsmäßig am stärksten ausgeschiedene Plasmaprotein, das tubuläre Tamm-Horsfall-Glykoprotein mit 25 – 40 mg/24 Std. das am stärksten ausgeschiedene postglomeruläre Protein.

Zur Diagnostik einer Proteinurie stehen verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung, deren Einsatz von der klinischen Fragestellung abhängt.

Streifentest

Als Screeninguntersuchung bei nephrologisch asymptomatischen Patienten kann der Streifentest eingesetzt werden. Er erfährt, aufgrund der hohen Affinität des im Testfeld eingesetzten Indikators für Aminogruppen, Albumin besser als die anderen Harnproteine. Die praktische Empfindlichkeit (E 90) für Albumin beträgt 60 mg/l. Für andere Plasmaproteine, die niereneigenen Proteine und die Proteine der ableitenden Harnwege ist die praktische Empfindlichkeit weitaus geringer. Präglomeruläre Überlaufproteinurien (Bence-Jones-Proteinurie, Myoglobinurie) werden nur unregelmäßig erfährt. Falsch positive Ergebnisse treten auf bei Medikamenten, die quartäre

* Vortrag auf dem Symposium „Proteinurie: Aktueller Stand der Labordiagnostik“, Düsseldorf, den 21. 11. 1987.

Ammoniumbasen enthalten, falsch negative bei pH-Werten unter 4 und über 8 (3).

Trotz gewisser Nachteile des Streifen-tests ist er aufgrund der einfachen Handhabung als Screeninguntersuchung auf Proteinurie unverzichtbar. Im Vergleich zur Gesamteiweiß-Ausscheidung werden mit einem Streifen-test zuvor geschilderter analytischer Sensitivität 9% falsch positive und 6% falsch negative Ergebnisse erhalten (4). Wird als Referenzmethode die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese herangezogen, so erfaßt der Streifen-test 100% der glomerulären, 77% der gemischten und nur 50% der tubulären Proteinurien (5).

Streifen-test-Untersuchungen auf Gesamteiweiß sind nur sinnvoll im Spontanharn, der als Mittelstrahlurin gewonnen wird. Zur nephrologischen Diagnostik ist die Auswahl eines Streifen-tests empfehlenswert, der Testfelder für Hämoglobin/Erythrozytenzahl, Leukozytenzahl, Albumin, pH-Wert und spez. Gewicht enthält.

Gesamteiweiß-Ausscheidung

Die Gesamteiweiß-Ausscheidung wird im 24 Std.-Sammelharn bestimmt, gesammelt werden sollte in eine 2-l-Sammelflasche mit Volumenmaßstab, die 1 g Natriumazid enthält.

Indiziert ist die quantitative Bestimmung der Gesamteiweiß-Ausscheidung primär bei Patienten mit der Vermutungsdiagnose Nierenerkrankung und als Folgeuntersuchung bei Vorliegen eines positiven Streifen-testergebnisses.

Zur quantitativen Gesamteiweißbestimmung im Harn eingesetzt werden die Biuret-Methode, die Coomassie-Methode, die Streulichtmethode, die Ponceau S-Methode und die Folin-Lowry-Methode.

Biuret-Methode

Die Durchführung erfolgt nach der in Tab. 1 angegebenen Arbeitsanweisung. Die Harneiweiße werden mit Perchlorsäure gefällt, abzentrifugiert und in Biuret-Reagenz wieder gelöst. Zur Fällung wird Perchlorsäure der Trichloressigsäure vorgezogen. Mit Trichloressigsäure sind 4–20% der Urinproteine nicht fällbar, der Wirkungsgrad der Fällung nimmt mit sinkender Proteinkonzentration ab (6, 7). Perchlorsäure in einer Endkonzentration im Fällungsansatz von 5–10% fällt Proteine bis zu einem Molekulargewicht von etwa 10000 Dalton. Die Berechnung der Proteinkonzentration kann vermittels des prozentualen Absorptionskoeffizienten (A_{RSA}) bezugnehmend auf Rinderserumalbumin als Referenzprotein erfolgen. Die praktikable untere Nachweisgrenze für Urin-Gesamteiweiß liegt bei einem ΔE von 0,03 bei 546 nm zwischen Analysen- und Analysenblindwert, was einer Gesamteiweißkonzentration von 120 mg/l bezogen auf Rinderserumalbumin entspricht. Die Entscheidungsgrenze normal/pathologisch der Gesamteiweiß-Ausscheidung liegt bei 150 mg/24 Std.

Die Biuret-Reaktion erfaßt alle Proteine und nahezu mit dem gleichen prozentualen Absorptionskoeffizienten, da sie auf der Komplexbildung eines Kupfer-II-Ions mit 4 Peptid-N-Atomen bei alkalischer Bedingung beruht. Die kommerziell verfügbaren Biuret-Reagenzien entsprechen meist nicht der Candidate Reference Method for Determination of Total Protein in Serum (8). Das Biuret-Reagenz der Candidate Reference Method ist auch emp-

Tab. 1: Ansatz zur Harnproteinbestimmung mit Biuret-Reagenz

	Analyse	Analysenblindwert	Standard	Standardblindwert
Harn	10,0	10,0	—	—
RSA (0,5 g/l)	—	—	10,0	10,0
Perchlorsäure (30% w/v)	2,0	2,0	2,0	2,0

10 min stehen lassen, 10 min bei 3000 Upm mit Tischzentrifuge

Präzipitat (Überstand wurde abgegossen)

Biuret-Reagenz	5,0	—	5,0	—
Vergleichsreagenz	—	5,0	—	5,0

Reaktionszeit 30 min. Messen bei 546 nm, Analyse gegen Analysenblindwert, Standard gegen Standardblindwert.

$$\text{Berechnung über Standard: g/l} = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} \times 0,5}{\Delta E_{\text{Standard}}}$$

Berechnung über prozentualen Absorptionskoeffizienten, wenn z. B. für obigen Ansatz $A_{(546)} = 4,70$ für RSA, bei $d = 1$ cm:

$$\text{g/l} = \frac{\Delta E \times 10}{4,70}$$

fehlenswert für die Gesamteiweißbestimmung im Harn, da

- die NaOH-Konzentration hoch ist (0,6 mol/l); das ist für das in Lösung bringen der präzipitierten Proteine günstig.
- die CuSO_4 -Konzentration ebenfalls hoch ist, wodurch auch noch eine Linearität gegeben ist, wenn die Proteinkonzentration im Ansatz 1,4 g/l überschreitet.
- Penicilline und Cephalosporine die Bestimmung nicht stören.

Coomassie-Methode (9)

Die Durchführung erfolgt nach der in Tab. 2 angegebenen Arbeitsanweisung. Da eine Fällung der Eiweiße nicht erforderlich ist, ist die Methode einfach durchführbar. Erfaßt werden Peptide mit einem Molekulargewicht größer als 3000 Dalton. Die analytische Sensitivität für Gesamteiweiß im Harn beträgt 30 mg/l bezogen auf Rinderserumalbumin, der Trennwert normale/pathologische Proteinausscheidung liegt bei 120 mg/24 Std. Wesentlicher Nachteil der Methode ist ein unterschiedlicher prozentualer Absorptionskoeffizient für die einzelnen Proteine. Gegenüber glomerulären Proteinurien werden bei tubulären zu niedrige Gesamteiweißwerte ermittelt. Das ist auch

Tab. 2: Ansatz zur Harnproteinbestimmung mit Coomassie Brilliant Blau G250 (CBB-G250)

	Analyse	Standard	Reagenzwert
Harn	0,1	—	—
RSA (0,5 g/l)	—	0,1	—
A. bidest.	—	—	0,1
CBB-Reagenz	5,0	5,0	5,0

Mischen, messen nach 5 bis 60 min bei 595 oder 578 nm gegen Reagenzwert.

$$\text{Berechnung: g/l} = \frac{\Delta E_{\text{Probe}} \times 0,5}{\Delta E_{\text{Standard}}}$$

der Fall bei selektiven Proteinurien, z. B. Bence-Jones-Proteinurie und den diabetischen Proteinurien. Bei Dialysepatienten werden zu hohe Gesamteiweißwerte im Harn gemessen.

Empfehlenswert ist die Coomassie-Methode zur Verlaufsbeurteilung milder Proteinurien (< 2 g/24 Std.), z. B. bei Schwangeren; in der Pädiatrie, wo nur wenig Harn gewonnen werden kann, zur Verlaufsbeurteilung bei Verdacht auf therapiebedingte toxische Tubulusschädigung und zur Verlaufsbeurteilung nach Nierentransplantation.

Ponceau S-Methode (10)

Sie ist etwa gleich empfindlich (~ 20 mg Gesamteiweiß/l Urin) wie die Coomassie-Methode und hat als Farbstoffbindungsmethode viele Nachteile mit dieser gemeinsam. Grundsätzlich kann mit der Ponceau S-Methode aufgrund einer nicht unerheblichen analytischen Unspezifität im Harn immer „etwas“ gemessen werden.

Streulichtmethode (11)

In einer Rundküvette mit Rührer werden bei laufender Registrierung 50 µl Urin zu 550 µl Trichloressigsäure pipettiert und das maximale Streulichtsignal an einem Analyzer abgelesen. Praktische Empfindlichkeit 5 mg/l, Trennwert normal/pathologisch 60 mg/24 Std.

Vorteilhaft ist die gute Empfindlichkeit, nachteilig die Verdünnung des Urins auf bestimmte Konzentrationsbereiche wegen der geringen Linearität der Methode.

Folin-Lowry-Methode

Sie wird noch in einigen Labors angewandt, ist aber zur Gesamteiweißbestimmung im Harn weniger geeignet. Die Methode erbringt viele falsch erhöhte Meßwerte, da Urinpigmente und alle Substanzen, die das Folin-Reagenz reduzieren, in die Reaktion mit eingehen. Empfindlichkeit für Gesamteiweiß im Harn 20 mg/l, Trennwert normal/pathologisch 300 mg/24 Std.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Durchgeführt wird eine molekulargewichtsbezogene Auftrennung der Urinproteine, und das Proteinurienmuster beurteilt nach der Präsenz bestimmter Proteinurieelemente, die auf eine Schädigung bestimmter Strukturen des Nephrons hinweisen (12). Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese erlaubt somit zwar eine Etagediagnostik der Niere, nicht aber die Diagnosestellung einer Nierenerkrankung.

Die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ist die empfindlichste Methode zum Nachweis einer pathologischen Proteinurie. Es werden jedoch in erheblicher Anzahl pathologische Proteinurie-Muster erkannt, denen ein klinischer Befund nicht oder noch nicht zugeordnet werden kann.

Bestimmung von Einzelproteinen

Seitdem die empfindliche Bestimmung von Harnproteinen manuell durch die Immundiffusion oder mechanisiert mit der Immunnephelometrie oder Immunturbidimetrie möglich ist, wird ihre Bedeutung zur Diagnostik von Nierenerkrankungen untersucht (13). Eine gewisse Wertigkeit hat die quantitative Bestimmung von Albumin im morgendlichen Spontanurin zur Erkennung der Mikroalbuminurie als Zeichen einer diabetischen Nephropathie erlangt (14).

Diskutiert wird ebenfalls der Ersatz des Streifen-tests und/oder der Gesamteiweißbestimmung im Harn durch die quantitative Bestimmung zweier Plasmaproteine im Harn. Als Kandidat zur Diagnostik einer glomerulär bedingten Proteinurie wird das Albumin angesehen, als Kandidat zur Diagnostik einer tubulär verursachten Proteinurie das α_1 -Mikroglobulin (15).

Studien zur diagnostischen Sensitivität und Spezifität und über die Vorhersagewerte eines solchen Plasmaproteinprofils im Harn werden zeigen, ob der Harnprotein-diagnostik, die in vielen Laboratorien noch ein Stiefkind ist, ein neuer Stellenwert zukommt.

Schrifttum:

1. THOMAS, L., WALB, D.: Urineiweiß-Ausscheidung. In: Thomas, L., Labor und Diagnose, S. 426. Med. Verlagsges. Marburg (1988).
2. KUHLMANN, U., WALB, D.: Nephrologie. Thieme, Stuttgart (1987).
3. GUNTENSOHN, G., BOESKEN, W., WEISSHAAR, D. et al.: Vergleichsuntersuchungen mit einem neuen Eiweiß-Teststreifen. Med. Labor. 31, 181 (1978)
4. VONDERSCHMITT, D., SCHOLER, A.: Teststreifen für Screening-Untersuchungen zum semiquantitativen Nachweis von Proteinurien. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 997 (1981).
5. ALT, J., HACKE, M., HEYDE, M. et al.: Urinary protein excretion in intestinal and tubular kidney diseases as characterized by gradient electrophoresis. Klin. Wschr. 61, 641 (1983).
6. BECKMAN, W. W., HILLER, A., SHEDLOWSKI, T., ARCHIBALD, R. M.: The occurrence in urine of a protein soluble in trichloroacetic acid. J. Biol. Chem. 148, 247 (1943).
7. ANDERSON, A. J., MACLAGAN, N. F.: The isolation and estimation of urinary proteins. Biochem. J. 59, 638 (1955).
8. DOUMAS, B. T., BAYSE, D. D., CARTER, R. J. et al.: A candidate reference method for determination of total protein in serum. I. Development and validation. Clin. Chem. 27, 1642 (1981).
9. THOMAS, L., WINKELMANN, M., MICHAELIS, H. C., WALB, D.: Quantitative Proteinbestimmung im Harn mit dem Proteinbindungsfarbstoff Coomassie Brilliant Blau G250. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 19, 203 (1981).
10. WEBER, M. H., BITTNER, T., SCHELER, F.: Quantitative Proteinbestimmung im Urin. Lab. Med. 7, 155 (1983).
11. KIRCHHERR, H., SCHIWARA, H. W.: Quantitative Proteinbestimmung im Harn mit der Streulichtmethode. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 23, 57 (1985).
12. BOESKEN, W. H., MAMIER, A.: Molekulargewichtsbezogene Urinprotein-Elektrophorese in der Diagnostik von Nierenerkrankungen. Lab. med. 9, 285 (1985).
13. DATI, F., LAMMERS, M.: Nierenschädigungen: Früherkennung durch neue Methoden zum Nachweis einer Proteinurie. Diagnose + Labor 38, 24 (1988).
14. HASSLACHER, Ch.: Frühdiagnostik der diabetischen Nephropathie. Diagnose + Labor 38, 19 (1988).
15. WEBER, M. H.: Diagnostik der tubulären Proteinurie. Diagnose + Labor 38, 9 (1988).

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Lothar Thomas
Krankenhaus Nordwest
— Zentrallabor —
Steinbacher Hohl 2—26
6000 Frankfurt 90

□