



GLP Planet

**GLP-planet III**  
*01 июля 2022 г.*

**Качественные реакции  
для определения патологических  
показателей в моче лабораторных  
животных как альтернатива  
тест-полоскам**

Кузнецова А.И.  
Младший научный сотрудник лаборатории  
фармацевтической разработки

# Анализ мочи в клинической практике

Осуществляется с помощью реагентных тест-полосок (метод «сухой химии»)

Результат определяется визуально в сравнении с цветовой шкалой или фиксируется с помощью мочевого анализатора

## При анализе мочи животных:

Возможны ложноположительные и/или ложноотрицательные результаты при использовании «человеческих» тест-полосок для анализа мочи лабораторных животных

Причины ошибок :

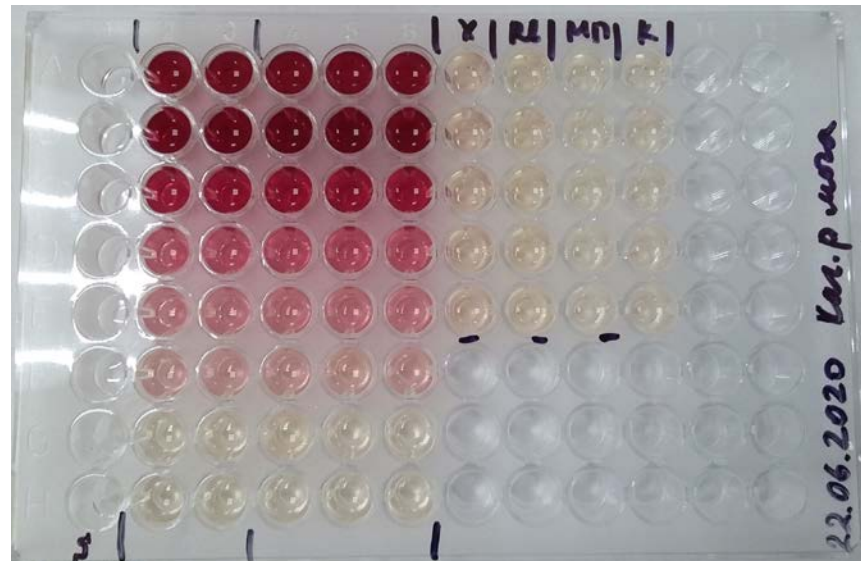
- разная рН мочи животных и человека;
- компоненты, отсутствующие в моче человека, но в больших количества присутствующие в моче животных (например, слизь и оксалаты у кроликов);
- высокая концентрация исследуемого компонента или концентрированность мочи (например, у дегу) сравнении с человеком.



# Качественные реакции для анализа мочи

Должны удовлетворять следующим требованиям:

- ▶ Селективность
- ▶ Чувствительность
- ▶ Диагностически значимые изменения показателей мочи должны вызывать визуально заметные изменения окраски для оценки результатов.



## Цель исследования

Целью данной работы было найти/разработать методики качественных и/или количественных методов определения патологических показателей мочи лабораторных животных, а также адаптировать выбранные методики для проведения реакции в 96-луночном планшете.

## Материал и методы

- ▶ Объектами исследования являлись образцы свежей и замороженной мочи здоровых половозрелых лабораторных животных: крыс, кроликов, хорьков, карликовых свиней.
- ▶ Мочу животных предварительно центрифугировали, щелочную мочу кроликов перед исследованием подкисляли 10-% уксусной кислотой до нейтрального значения pH.



# Определение белка в моче лабораторных животных

Вид животного	Норма содержания белка в моче
Крысы	до 0,3 мг/мл
Хорьки	до 1 мг/мл
Кролики	до 6 (по некоторым данным 16) мг/мл

- ▶ За границу отсечения норма/патология была взята концентрация белка в пробе 0,3 мг/мл.
- ▶ С помощью тест-полосок определяются следующие уровни белка в моче

Для человека	Норма	+	++	+++
мг/мл (мг/дл)	До 0,15 (15)	0,30 (30)	1,0 (100)	5,0 (500)

- ▶ Для определения белка в моче использовались реакции:
  - с сульфосалициловой кислотой 15%
  - с биуретовым реактивом
  - с реактивом Бредфорда
  - с пирогаллоловым красным



# Определение белка по реакции с сульфосалициловой кислотой

- ▶ Этот классический метод определения белка в моче человека основан на коагуляции белка 15% раствором сульфосалициловой кислоты

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
50 мкл мочи + 50 мкл H <sub>2</sub> O + 10 мкл 15% раствора ССК	Выпадение белого осадка или помутнение раствора

## Недостатки метода при анализе мочи животных:






- ▶ На результат влияет собственная окраска мочи;
- ▶ При визуальной оценке невозможно достоверно определить границу отсечения норма/патология;
- ▶ При высоких концентрациях белка в моче выпадает белый осадок в виде сгустка, что исключает возможность количественного измерения методом спектрофотометрии

## Чувствительность метода (при границе отсечения норма/патология 0,3мг/мл)

В моче крыс реакция положительна вплоть до концентрации белка 0,098 мг/мл, в моче хорьков до хорьков 0,08 мг/мл, у кроликов белок в моче определялся от концентрации 0,16 мг/мл и выше, либо не определяется даже в концентрациях до 0,6 мг/мл.



# Реакция на белок с 15% сульфосалициловой кислотой

Концентрация белка (мг/мл)	Разведения стандарта общего белка	Модельные смеси стандарта общего белка			Вид модельных смесей до добавления ССК (Справа налево: крысы, кролики, хорьки)
		С мочой крыс	С мочой кроликов	С мочой хорьков	
0,625					
0,3125					
0,1563					
0,0781					
0,0391					
0,0195					
0,0098					
Бланк (негативный контроль)					

# Определение белка по реакции с биуретовым реактивом

- ▶ Реакция основана на образовании комплексных соединений солей меди (II) синего и фиолетового цвета с белками и продуктами их неполного гидролиза, которые содержат не менее двух пептидных связей.

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
50 мкл мочи + 200 мкл биуретового реактива	Сине-фиолетовое окрашивание

























## Недостатки метода при анализе мочи животных:

- ▶ Значительное влияние собственной окраски мочи;
- ▶ Большой объем биоматериала – не менее 50 мкл, что не всегда является возможным в рутинном анализе мочи мелких животных (крыс, дегу и др.)
- ▶ Согласно ГФ, метод непригоден для анализа мутных растворов, содержащих соли аммония или осадок;
- ▶ При визуальной оценке (в водном растворе белка) достоверно определяется только уровень белка выше 1,25 мг/мл (низкая чувствительность метода)





# Реакция на белок с биуретовым реактивом

Концентрация СО белка в разведениях, мг/мл	Разведения стандарта общего белка (калибровочные растворы)	Моча крыс до и после добавления биуретового реактива	
20			
10			
5			
2,5			
1,25			
0,625			
0,3125			
Бланк (негативный контроль)			

## Определение белка по реакции с реактивом Бредфорда















- ▶ Метод основан на связывании белка с красителем кислотный синий 90 (Кумасси бриллиантовый синий R-250, реактив Бредфорда), при этом наблюдается переход окраски от голубого к синему через коричневый цвет.

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
5 мкл мочи + 295 мкл реактива Бредфорда	Синее/коричневое окрашивание

### Недостатки метода при анализе мочи животных:

- ▶ Изменение окраски происходит от бледно-голубого цвета самого реактива до темно-синего через коричневый цвет, что сильно затрудняет визуальную оценку в моче яркого цвета (кролики, хорьки), так как при добавлении бледно-голубого реактива Бредфорда цвет смеси изменяется даже при отсутствии белка;
- ▶ При визуальной оценке эффекта реакции в моче животных невозможно достоверно определить границу отсечения норма/патология;
- ▶ В моче кроликов реакция положительна вплоть до концентрации белка 0,005 мг/мл, у крыс до 0,016 мг/мл, хорьков 0,039 мг/мл.

**Реакция на белок с реактивом Бредфорда**

Концентрация СО белка мг/мл	Разведения стандарта общего белка (калибровочные растворы)	Модельные смеси с образцами мочи лабораторных животных (крыса/кролик/хорек)
0,625		
0,313		
0,156		
0,039		
0,0195		
0,0098		
Бланк (негативный контроль)		

# Определение белка по реакции с пирогаллоловым красным

















- ▶ В основе метода лежит взаимодействие реактива для биохимического анализатора для определения белка в моче «Пирогаллоловый красный» (Proteine (urine) BioSystem, Испания) с белками мочи, с образованием окрашенных соединений.

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
5 мкл мочи + 295 мкл пирогаллолового красного	Вишневое/фиолетовое окрашивание

## Преимущества метода

- ▶ Собственный цвет мочи не влияет на окраску раствора;
- ▶ Требуется минимальное количество биоматериала (5 мкл);
- ▶ Готовый реактив, что исключает возможные ошибки в процессе приготовления;
- ▶ Окрашивание отчетливо определяется визуально при постановке реакции в планшете и стабильно в течение 40 минут.
- ▶ Возможно количественное определение белка в моче спектрофотометрическим методом.

# Реакция на белок с пирогаллоловым красным

Концентрация СО белка, мг/мл	Разведения стандарта общего белка (калибровочные растворы)	Моча крыс ( 18 животных, в двух повторностях)
5,0		
2,5		
1,25		
0,625		
0,313		
0,156		
0,078		
Бланк (негативный контроль)		



# Определение крови (гемоглобина) в моче лабораторных ЖИВОТНЫХ

## Амидопириновая (пираминоновая) проба

- ▶ Химическое обнаружение крови сводится к нахождению пигмента гемоглобина, который обладает «пероксидазной» активностью и способен окислять пирамидон в присутствии перекиси водорода


Условия проведения	Наблюдаемый эффект
25 мкл спиртового р-ра пирамидона+25 мкл уксусной кислоты ледяной+25 мкл 3% р-ра $H_2O_2$ , перемешивание+ 25 мкл мочи	Сине-фиолетовое окрашивание

Интенсивность и время появления окраски зависят от количества крови. Отрицательный ответ дается через 2—3 мин. В отсутствии крови цвет пробы не изменяется. Через 10 минут окрашивание полностью исчезает.

В норме крови в моче обнаруживаться не должно.

Минимально определяемая концентрация гемоглобина (крови) в моче животных составляет 0,039 г/л. Так как данная методика по минимальной определяемой концентрации выше, чем с помощью тест-полосок, то в норме с помощью данной методики не должно проявляться окрашивание.

## Амидопириновая проба

Концентрация гемоглобина г/л	Обозначение уровня	Модельные смеси гемоглобина с мочой кроликов
0,31	3+	
0,16		
0,078	2+	
0,039	1+	
0,020	+/-	
0,010	Отриц. результат	
0,005		
бланк	-	

# Определение глюкозы в моче лабораторных животных

В норме в моче человека и животных глюкозы нет или она присутствует в следовых количествах, ниже уровня чувствительности тест-полосок.

Для оценки наличия в моче глюкозы были использованы два известных метода:

- ▶ качественная реакция глюкозы с гидроксидом меди (II);
- ▶ определение глюкозы глюкозооксидазным методом, применяемым в клинической биохимии.

По тест-полоскам определяются следующие уровни глюкозы в моче:

Обозначение уровней	+	++	+++	++++
Мг/дл	50	150	500	1000
Ммоль/л	2,75	8,26	27,5	55



# Определение глюкозы по реакции с гидроксидом меди в щелочной среде

- ▶ Глюкоза, являясь многоатомным спиртом способна вступать в реакцию с гидроксидом меди (II), образуя устойчивое растворимое комплексное соединение синего цвета.

Условия проведения	Ожидаемый эффект
60 мкл натрия гидроксида 2Н+ 30 мкл раствора меди сульфата 0,2Н, перемешивали постукиванием по планшету → выпадение голубого осадка гидроксида меди (II) + 30 мкл пробы	В присутствии глюкозы - растворение голубого осадка меди гидроксида с образованием синего раствора.

При постановке реакции в микропланшетном варианте с разведениями глюкозы в воде в качестве СО, растворения осадка и изменения цвета раствора не происходило в диапазоне концентраций глюкозы до 20 мг/ мл (112,0 ммоль/л)

# Влияние примесей на определение глюкозы по реакции с гидроксидом меди в щелочной среде

Название соединения	Результат проведения реакции с гидроксидом меди (II) в щелочной среде	Результат реакции
Аскорбиновая кислота (2%)	Непрозрачный раствор оранжево-бурого цвета, выпадение осадка	
СО общего белка (4 г/л)	Фиолетовое окрашивание, осадок $\text{Cu}(\text{OH})_2$ растворяется	

## Недостатки метода при анализе мочи животных:

- ▶ Низкая чувствительность реакции ( посинение раствора только при большой концентрации глюкозы)
- ▶ Определению глюкозы мешает присутствие в пробе белка и аскорбиновой кислоты



## Глюкозооксидазный метод определения глюкозы

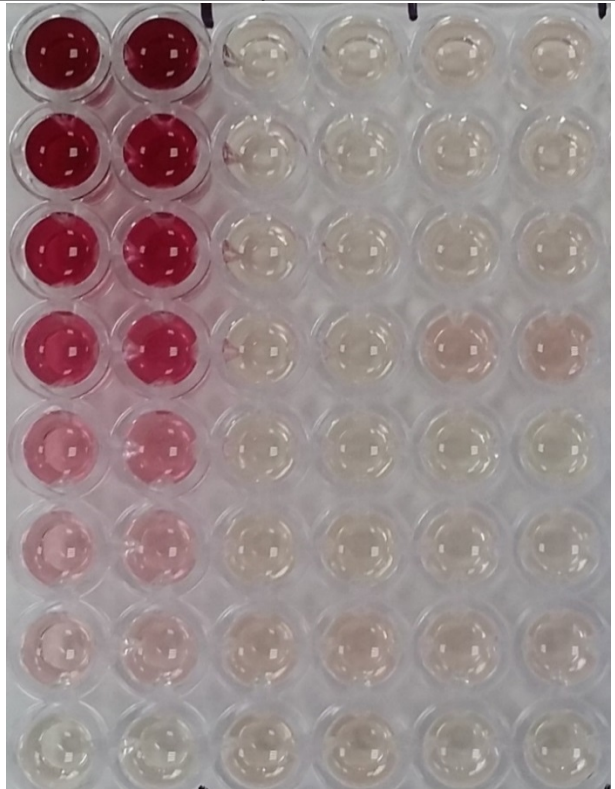
- ▶ Глюкоза в пробе под действием ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы вступает в реакцию с 4-аминоантипирином и фенолом, образуя цветной комплекс, который может быть измерен спектрофотометрически

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
5 мкл пробы + 295 мкл реактива глюкозооксидазы/пероксидазы, инкубация при температуре 37 °С и перемешивании при 650 об/мин в течение 10 минут в шейкере термостатированном Elmi «ST-3L»	Окрашивание от розового до малинового цвета.

### Преимущества метода

- ▶ Собственный цвет мочи не влияет на окраску раствора;
- ▶ Требуется минимальное количество биоматериала (5 мкл);
- ▶ Готовый реактив, что исключает возможные ошибки в процессе приготовления;
- ▶ Возможно количественное определение глюкозы в моче спектрофотометрическим методом.

# Глюкозооксидазный метод определения глюкозы

Мг/мл	Ммоль/л	Обозначение уровней	Обозначение уровней по тест-полоскам	Калибровочные растворы глюкозы в воде	Пробы с мочой крыс
10	55,5	3+	4+		
5	27,7		3+		
2,5	13,9	2+	2+		
1,5*	8,26				
0,5	2,75	1+	1+		
0,25	1,39	+/-	-		
0,125	0,69	+/-	-		
Бланк	0	0	0		

Полученная чувствительность ниже границы отсечения норма/патология (0,5 мг/мл или 2,8 мМ).

## Определение кетоновых тел в моче

К кетоновым телам, присутствующим в моче и свидетельствующих о патологических процессах в организме, относятся ацетоуксусная кислота,  $\beta$ -оксимасляная кислота и ацетон.

В норме кетоновых тел в моче человека и животных обнаруживаться не должно.

Уровни кетонов в моче, определяемые с помощью тест-полосок и их обозначение:

Единица измерения	Отрицательный тест/ норма (+/-)	+	++	+++
мг/мл	0,05	0,15	0,5	1,5

- ▶ Для определения кетоновых тел в моче в моче использовались реакции:
  - Проба Либена (йодоформная проба)
  - Проба Легалья (с нитропруссидом натрия)

## Проба Либена на ацетон (йодоформная проба)

- ▶ Проба Либена на ацетон считается наиболее специфичной, основана на образовании нерастворимого в воде йодоформа.

Условия проведения	Ожидаемый эффект
50 мкл мочи + 10 мкл 10% р-ра едкого натрия + 20-30 мкл раствора Люголя	Исчезновение окраски йода, появление хлопьевидного осадка, запах йодоформа



В пробах мочи с положительной реакцией на кетоновые тела по тест-полоскам, раствор Люголя осел на дно, желтого осадка не наблюдалось, запах мочи не изменился.

## Проба Легалья (с нитропруссидом натрия)













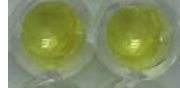







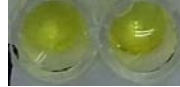


Проба более чувствительна к ацетоуксусной кислоте, чем к ацетону.

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
25 мкл мочи + 10 мкл нитропруссид натрия 1%, + 20 мкл раствора гидроксида натрия 2М, перемешиваются постукиванием по торцу планшета, + 50 мл уксусной кислоты концентрированной.	<ul style="list-style-type: none"><li>➤ После внесения в пробу раствора натрия нитропруссид и натрия гидроксида, реакционная смесь приобретает желто-оранжевую окраску,</li><li>➤ после добавления уксусной кислоты при наличии кетонов развивается вишнево-красное окрашивание,</li><li>➤ при отсутствии кетоновых тел раствор становится бледно-желтым.</li></ul>

- ▶ Проба визуально оценивается как положительная только при концентрации кетонов в моче выше 15 мг/мл.
- ▶ Таким образом, реакция с нитропруссидом натрия подходит для микропланшетного анализа для определения высокого уровня содержания кетонов в моче.



# Определение кетоновых тел в моче по реакции с нитропруссидом натрия

Разведения контроля мочи 2 уровня (КМ-2, патология) в контроле 1 уровня (КМ-1, норма)				Результаты определения кетонов в моче крыс
Разведения КМ-2 в КМ-1	Обозначение	До внесения уксусной кислоты	После внесения уксусной кислоты	После внесения уксусной кислоты
КМ-2 неразб.	3+			
k=2	2+			
k=4	1+			
k=8	+/-			
k=16	-			
k=32	-			
k=64	-			
КМ-1	-			

# Определение желчных пигментов в моче лабораторных ЖИВОТНЫХ

Из литературы известно несколько основных реакций на желчные пигменты

Реакция	Условия проведения	Ожидаемый эффект
<b>Проба Гмелина</b>	10 мкл азотной кислоты + по стенке аккуратно вносят 50 мкл мочи.	На границе двух жидкостей образуется зеленое, синее, фиолетовое, красное и желтое цветные кольца.
<b>Унифицированная проба Розина</b>	40 – 50 мкл мочи + осторожно по стенкам пробирки наслаивают 1% спиртовой раствор йода.	При наличии билирубина появление на границе между жидкостями зеленого кольца.

Методики не подходят для анализа мочи в микропланшетном варианте:

- сложность «наслаивания реагента» при большом количестве проб;
- в лунках планшета нет возможности оценить образование колец;
- малые количества желчных пигментов, что не дает яркого окрашивания колец.

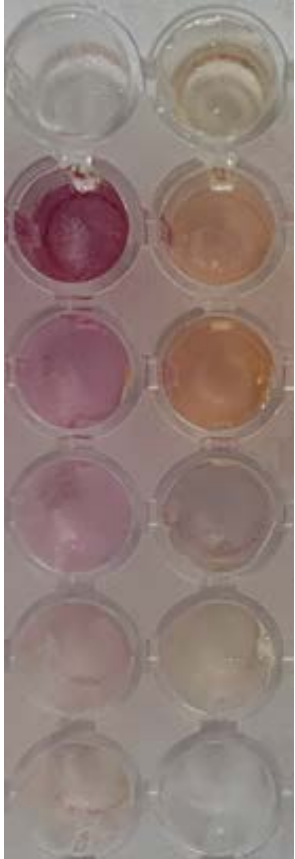
# Определение желчных пигментов в моче лабораторных животных по методу Маллой-Эвелина

- ▶ Глюкуронат билирубина напрямую реагирует с диазониевой солью сульфаниловой кислоты с образованием окрашенного соединения – азобилирубина..
- ▶ Набор Liquick Cor-BIL DIRECT MALLOY-EVELYN для определения прямого билирубина.

Условия проведения	Наблюдаемый эффект
80 мкл реагента 1, инкубация 3 мин при 37°C + 10 мкл мочи, инкубация 4 минуты при 37 °C и 650 об/мин, +10 мкл реагента 2, инкубация 2 минуты при 37 °C	Пурпурная (фиолетово-розовая) окраска в присутствии прямого билирубина или его производных выше 14 мкмоль/л

Положительную реакцию можно визуально увидеть для концентрации билирубина более 17-28 мкмоль/л.

## Оценка содержания желчных пигментов с помощью реагентов для определения прямого билирубина по методу Маллоя-Эвелина.

Концентрация билирубина (мкмоль/л) в разведениях контрольных образцов мочи	Моча крыс	Обозначение
0		-
224		2+
112		3+
56		-
28		-
14		бланк

Оцениваемый Параметр	Метод	Объём мочи	Чувствительность реакции	Признак положительной пробы
Кровь/Эритроциты	Амидопириновая проба	25мкл	0,156 г/л для мочи крыс; 0,039 г/л для мочи кроликов	Развитие сине-фиолетового окрашивания
Белок	С пирогалловым красным	5 мкл	0,16 мг/мл*	Переход оранжевого цвета в красно-вишнево-фиолетовый.
Желчные пигменты (билирубин, уробилиноген)	С diazotized солью сульфаниловой кислоты (метод Маллоя-Эвелина)	10 мкл	17 мкмоль/л (совпадает с границей отсечения норма / патология для всех животных)	Развитие розово-оранжевого окрашивания; для кроликов жёлто-оранжевого
Кетоновые тела	Реакция с нитропруссидом натрия и уксусной кислотой	25 мкл	6,8 мг/мл	Переход окраски из жёлто-оранжевого в вишнёво-красный при подкислении раствора
Глюкоза	Глюкозооксидазный метод	5 мкл	0,31 мг/мл (1,75 мМ); граница отсечения норма/патология 0,5 мг/мл или 2,8 мМ.	Развитие малинового окрашивания
<b>Итого:</b>	5 показателей	70 мкл		

# ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ ДЛЯ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Научно-практический журнал

<https://labanimalsjournal.ru/index.php/ru>

- ▶ Кузнецова А.И., Фаустова Н.М., Аргинтаева А.Е., Макарова М.Н. Качественные реакции для определения патологических показателей в моче лабораторных животных как альтернатива тест-полоскам. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2022; 3 (статья подана в печать)



# Спасибо за внимание!

