

Stanovení albuminurie – porovnání imunoturbidimetrické metody a vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Fořtová M.^{1,2}, Klappková E.¹, Průša R.¹

¹Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Klinika nefrologie 1. LF UK a VFN, Praha

SOUHRN

Cíl studie: Cílem studie bylo zavést HPLC metodu pro stanovení albuminurie, potvrdit či vyvrátit tvrzení, že HPLC poskytuje falešně vyšší koncentrace albuminu v moči díky interferenci s dalšími bílkoviny, porovnat koncentrace albuminu v moči stanovené HPLC a imunoturbidimetricky.

Materiál a metody: Metodu HPLC jsme zavedli za následujících podmínek: složení mobilní fáze: složka A) voda, složka B) acetonitril, složka C) 100 mM NaH₂PO₄ a složka D) 1 % trifluoroctová kyselina; kontinuální gradient mobilní fáze; průtok mobilní fáze 2 ml/min; teplota analýzy 22 °C; UV detekce při 280 nm; kolona Zorbax 300 SB-C3, kapalinový chromatograf Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). Analyzovali jsme 2 směsné moči. Do směsi 1 připravené ze vzorků 30 imunoturbidimetricky negativních močí byl přidán standard albuminu. Směs 2 byla připravena z 30 imunoturbidimetricky „mikroalbuminurických“ vzorků. Soubor tvořilo 301 pacientů (161 diabetiků a 140 nediatetiků, 182 mužů a 119 žen, věk 44,1 ± 25,3 let).

Výsledky: Za uvedených analytických podmínek transferin, α-1-kyselý glykoprotein, α-1-antitrypsin, α-1-antichymotrypsin a hemopexin neinterferují s albuminem, zatímco eluční křivka prealbuminu se štěpí na několik píků, z nichž některé z nich s albuminem koeluují. Vzhledem k nízkým sérovým i močovým koncentracím prealbuminu lze usuzovat, že je tato interference klinicky nevýznamná. Ve směsi 1 jsme nezaznamenali významný rozdíl v hodnotách albuminurie mezi metodami (79,1 mg/l imunoturbidimetricky vs. 82,5 mg/l HPLC), oproti tomu, ve směsi 2 byla HPLC zjištěná hodnota o 26 % vyšší (79,5 mg/l imunoturbidimetricky vs. 99,9 mg/l HPLC). Tyto výsledky nasvědčují na existenci imunonereaktivního albuminu. Zjistili jsme statisticky významný rozdíl mezi metodami v případě patientských vzorků moči (soubor všech pacientů [medián ± SEM]: 21,1 ± 38,2 mg/l imunoturbidimetricky vs. 30,4 ± 42,2 mg/l HPLC, p < 0,0001, Mann-Whitneyův test), nejmarkantnější u imunoturbidimetricky „normoalbuminurických“ diabetiků.

Závěr: Naše výsledky svědčí pro vyšší senzitivitu HPLC metody pro zachycení „mikroalbuminurie“ (ve srovnání s imunoturbidimetrií). Uvedená HPLC metoda je dostatečně specifická pro stanovení albuminu v moči, nedochází k významným interferencím s dalšími bílkoviny.

Klíčová slova: albuminurie, HPLC, imunoturbidimetrie, imunonereaktivní albumin, diabetes

SUMMARY

Fořtová M., Klappková E., Průša R.: Assessment of albuminuria – Comparison between immunoturbidimetric and high performance liquid chromatographic methods

Objective: The aim of our study was the implementation of HPLC method for assessing albuminuria, confirming or refusing the hypothesis about the existence of co-eluting proteins, and comparison of urine albumin concentrations assessed using HPLC and immunoturbidimetric methods in patient samples.

Material and Methods: We developed the HPLC method under these chromatographic conditions: multilinear gradient of mobile phase consisting of water (solvent A), acetonitrile (solvent B), 100 mM NaH₂PO₄ (solvent C), 1 % trifluoroacetic acid (solvent D), flow rate 2 mL/min, temperature 22 °C, UV detection in the wavelength 280 nm, chromatographic column Zorbax 300 SB-C3, liquid chromatograph Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA). We analyzed two mixtures of urine. The first one was prepared from 30 patient urine samples with immunoturbidimetrically physiological albuminuria, to which we added albumin standard. The second mixture was prepared from 30 patient urine samples with mild albuminuria. We analyzed and compared albuminuria in a group of 301 patients (161 diabetics and 140 nondiabetics, 182 males and 119 females, age 44.1 ± 25.3 years).

Results: Transferrin, α-1-acid glycoprotein, α-1-antitrypsin, α-1-antichymotrypsin and hemopexin do not interfere with albumin in the presented HPLC method, whereas the elution curve of prealbumin splits into several peaks, of which a few interfere with albumin. With regard to very low prealbumin concentrations in serum and in urine, we can assume that this interference is not of clinical importance. In mixture 1 we did not find a significant difference between the albuminuria assessed using both methods (79.1 mg/L immunoturbidimetrically vs. 82.5 mg/L HPLC), while in mixture 2 we measured over 26 % greater albuminuria using HPLC (79.5 mg/L immunoturbidimetrically vs. 99.9 mg/L HPLC). These results suggest that immunoreactive albumin really exists. We found a statistically significant difference between the methods in patient urine samples (entire patients' group: [median ± SEM]: 21.1 ± 38.2 mg/L immunoturbidimetrically vs. 30.4 ± 42.2 mg/L HPLC, p < 0.0001, Mann-Whitney test), which was most remarkable in the group of diabetic patients with immunoturbidimetrically physiological albuminuria.

Conclusion: Our results prove that the HPLC method for albumin detection is more sensitive than immunoturbidimetry and sufficiently specific and there are no significant interferences with other proteins.

Key words: albuminuria, HPLC, immunoturbidimetry, immunoreactive albumin, diabetes

Úvod

Vyšetření albuminurie je dosud považováno za nejdůležitější indikátor rozvoje diabetické nefropatie. Rozvoj nefropatie predikuje též u hypertoniků, je významným markerem i u jiných nefropatií či v patologickém těhotenství a, v neposlední řadě, je rizikovým faktorem pro vznik kardiovaskulárních onemocnění a souvisí se zvýšením mortality obecně. Nízké hodnoty albuminurie (< 8 mg/mmol kreatininu) jsou popisovány jako reverzibilní, a proto vyžadují maximální úsilí o kompenzaci případného diabetu a kontrolu krevního tlaku. Snížení albuminurie brání progresi diabetických a některých nediabetických onemocnění ledvin, je známkou úspěšného léčení hypertenze [1–4].

Nález albuminu v moči byl dlouhou dobu vysvětlován poškozením glomerulární membrány resp. ztrátou její negativity při poškození povrchových proteoglykanů (koncepce na náboji závislé selektivní filtrace bílkovin). Novější studie distribuce povrchových nábojů albuminu však prokazují, že jejich prostorová distribuce se při elektrostatické repulzi může uplatnit jen málo. Navíc bylo prokázáno, že k odštěpování náboje dochází již na úrovni glomerulárních kapilár a filtrovány jsou tudíž již molekuly bez náboje. Koncentrace plazmatických bílkovin v glomerulárním filtrátu je podle těchto studií až o dva řády vyšší, než bylo dosud uváděno, a exkreci profiltrovaných bílkovin do moče ovlivňuje rozhodujícím způsobem jejich resorpce v tubulárních buňkách. Většina molekul albuminu z filtrátu se váže na receptorovou molekulu megalinu, která zprostředkuje rychlý transtubulární transport do extracelulární tekutiny. Receptorová molekula cubulinu uskutečňuje transport albuminu z ultrafiltrátu do lyzozomů, kde dochází k jeho rychlé degradaci s následnou exkrecí degradačních produktů do moče [5–7].

Albuminurii vyšetřujeme buď ve vzorku moči sbírané za 24 hodin, v tzv. časovaném vzorku moči (tak označujeme čtyř a vícehodinový nebo noční sběr moči) či v náhodném vzorku moči (nejlépe v 1. ranním vzorku, jenž údajně nejlépe koreluje s 24hodinovým vylučováním albuminu do moči). V náhodném vzorku užíváme poměr koncentrací albumin/kreatinin (albumin/creatinine ratio, ACR, jednotky mg/mmol, g/mol, mg/g nebo µg/mg), což eliminuje faktor nepřesného sběru moči. Tento poměr se doporučuje používat pouze do koncentrace kreatininu v séru 250 µmol/l [8–10].

V literatuře i v běžné praxi se často setkáváme s termíny odvozenými podle tíže albuminurie – „normoalbuminurie“, „mikroalbuminurie“ a „makroalbuminurie“. Ačkoliv jsou konkrétnější než souhrnné označení „albuminurie“ (a tím umožňují rychlejší orientaci v problematice), odborné společnosti je označují jako zavádějící a nedoporučují je používat [8, 9].

Při hodnocení albuminurie je nutné zohlednit situace spojené se zvýšeným rizikem nálezu buď falešně pozitivního (tělesná námaha, dehydratace, zvýšený příjem bílkovin v dietě, těhotenství, hematurie, horečnatý a jiný akutní stav, infekce močových cest, extrémně alkalická moč s pH > 8, např. v důsledku užívání některých léků) nebo falešně negativního (zvýšený příjem

hypotonických tekutin spojený se zvýšenou diurézou) a cirkadiánní rytmy (ve dne je albuminurie cca o 25 % vyšší než v noci, rozdíly mezi jednotlivými dny mohou být až 40 %). U diabetiků pravděpodobně cirkadiánní variabilita chybí [11].

Albuminurii běžně stanovujeme imunochemickými metodami, nejčastěji imunoturbidimetricky či imunonefelometricky, méně často metodami RIA či ELISA. Dalšími možnostmi stanovení jsou elektroforetické metody (v polyakrylamidovém gelu či kapilární), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), za referenční metodu bude v budoucnu pravděpodobně považována tandemová kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) [12, 13].

V poslední době je však správnost výsledků zjištěných imunochemicky zpochybňována. Mnohými studiemi bylo totiž zjištěno, že albuminurie (hlavně v pásmu tzv. mikroalbuminurie) stanovená vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií je až čtyřikrát vyšší, než albuminurie stanovená imunochemicky. Rozdíl mezi metodami se vysvětluje dvěma zcela odlišnými způsoby:

1. existencí imunonereaktivního albuminu v moči (který imunochemickým metodám uniká)
2. nespecifičností HPLC metody pro vyšetření albuminurie [14–18].

Ke ztrátě imunoreaktivity některých molekul albuminu údajně dochází působením fragmentů albuminu na jeho intaktní molekuly v tubulární tekutině. Dojde ke ztrátě disulfidových můstků, k navazujícím konformačním změnám a vzniku imunonereaktivního „nicked albuminu“. Potvrzení této hypotézy by mělo dopad i na klinickou praxi, v některých studiích se uvádí, že HPLC umožní identifikovat jedince s přítomnou albuminurií o cca 2 až 4 roky dříve než imunochemické metody. Pozitivní bias HPLC stanovené albuminurie klesá se zvyšující se koncentrací albuminu [14–16].

Na opačném pólu stojí zjištění Sviridova a Shaikh a spolupracovníků. Podle nich nejsou vyšší hodnoty albuminurie zjištěné pomocí HPLC způsobeny imunochemicky nereaktivním albuminem, ale společnou elucí některých proteinů ze separační kolony s albuminem (údajně koeluuje např. α-1-kyselý glykoprotein neboli orosomukoid, α-1-antitrypsin, α-1-antichymotrypsin, transferin, hemopexin, transthyretin neboli prealbumin, α-2-HS glykoprotein, Gc-globulin). Tím by HPLC poskytovala hodnoty falešně vyšší [17, 18].

Tyto kontroverzní hypotézy se staly východiskem i pro náš výzkum. Naším cílem bylo zavedení HPLC metody pro stanovení albuminurie, analýza některých proteinů označených jako interferující (a tím zpochybnění či podpoření tvrzení, že HPLC poskytuje falešně vyšší hodnoty albuminurie) a porovnání hodnot albuminurie stanovených imunoturbidimetricky a chromatograficky v patientských vzorcích.

Metodika a soubor pacientů

Po opakované optimalizaci podmínek chromatografické analýzy (teploty analýzy, složení mobilní fáze, detekční vlnové délky, typu chromatografické kolony

atd.) jsme zavedli následující HPLC metodu pro stanovení albuminurie:

- složení mobilní fáze: složka A) voda, složka B) acetonitril, složka C) 100 mM NaH₂PO₄ a složka D) 1% trifluoroctová kyselina,
- kontinuální gradient mobilní fáze (průběh v čase analýzy viz Tabulka 1),
- průtok mobilní fáze 2 ml/min,
- teplota analýzy 22 °C,
- UV detekce při 280 nm,
- trvání analýzy 8 minut,
- kolona Zorbax 300 SB-C3, 3,5 μm, 4,6 mm x 50 mm (Agilent Technologies, USA),
- kapalinový chromatograf Agilent 1200 (Agilent Technologies, USA).

Table 1: Gradient elution

| Time [min] | A [%] | B [%] | C [%] | D [%] |
|------------|-------|-------|-------|-------|
| 0 | 44.0 | 36.0 | 0 | 20 |
| 2 | 41.6 | 38.4 | 0 | 20 |
| 4 | 51.0 | 39.0 | 10 | 0 |
| 6 | 35.0 | 60.0 | 0 | 5 |
| 8 | 44.0 | 36.0 | 0 | 20 |

Zavedená HPLC metoda splnila požadavky úspěšné validace. Mez detekce pro stanovení albuminu v moči uvedenou HPLC metodou je 8,4 mg/l. Opakovatelnost nepřesáhla 5 %, reprodukovatelnost nepřesáhla hodnotu 4 % a hodnota bias nepřesáhla 5 %.

Po zavedení metody jsme zjišťovali separovatelnost α-1-kyselého glykoproteinu, transferinu, α-1-antitrypsinu, α-1-antichymotrypsinu, hemopexinu a prealbuminu od albuminu.

V rámci testování hypotézy o existenci imunochemicky nereaktivního albuminu jsme analyzovali imunoturbidimetricky (IT) a HPLC vzorky dvou směsných močí. První směsná moč byla připravena ze vzorků 30 imunoturbidimetricky negativních močí (průměrná koncentrace albuminu stanovená IT byla 4,4 mg/l). Do této směsi byl přidán standard albuminu, výsledná koncentrace stanovená imunoturbidimetricky byla 79,1 mg/l (směs 1). Druhá směsná moč byla připravena z 30 imunoturbidimetricky „mikroalbuminurických“ vzorků, výsledná imunoturbidimetricky stanovená koncentrace byla 79,5 mg/l (směs 2).

Hodnoty albuminurie stanovené HPLC jsme porovnávali s hodnotami stanovenými imunoturbidimetricky v souboru 340 pacientů. 39 pacientů, jejichž hodnoty albuminurie se nacházely pod detekčním limitem zavedené HPLC metody (8,4 mg/l), jsme z dalšího statistického zpracování vyloučili. Soubor poté tvořilo 301 pacientů (věk 44,1 ± 25,3 let, 182 mužů a 119 žen, 161 diabetiků a 140 nedietiků).

Albuminurie byla imunoturbidimetricky vyšetřována automatickým analyzátozem Cobas Integra 400 (Roche Diagnostics GmbH). Zároveň se stanovením albuminurie byla v patientských vzorcích moči vyšetřována koncentrace kreatininu (enzymová kolorimetrická metoda, automatický biochemický analyzátoz Advia 1800, Siemens) a byl hodnocen poměr albumin/kreatinin v moči.

Pro jednotlivé soubory dat byly vypočteny mediány a střední chyby průměru (standard errors of the mean, SEM). Normalita rozdělení dat byla testována testem normality D'Agostina a Pearsona, významnost rozdílů mezi metodami byla stanovena Mann-Whitneyovým testem na hladině významnosti α = 0,05.

Výsledky

Zavedenou metodou dochází k eluci albuminu přibližně ve třetí minutě analýzy (obr. 1A). α-1-kyselý glykoprotein, transferin a hemopexin jsou od albuminu účinně separovatelné. Za testovaných podmínek nedošlo k eluci α-1-antitrypsinu ani α-1-antichymotrypsinu, tyto bílkoviny tedy s albuminem neinterferují. Analýza směsného vzorku standardů všech těchto bílkovin je uvedena na obr. 2.

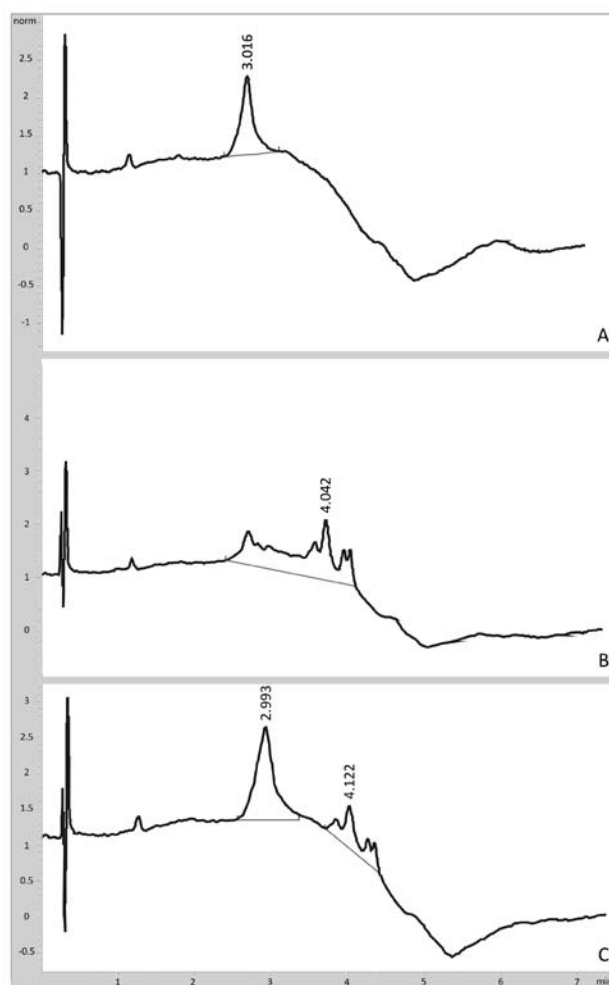


Fig. 1. Analysis of albumin standard sample (A), prealbumin standard sample (B) and mixture sample of albumin (in concentration 100 mg/L) and prealbumin (in concentration 50 mg/L) (C)

Eluční křivka prealbuminu se štěpí na několik píků, z nichž část z nich s albuminem koeluuje (obr. 1B). Eluční čas prealbuminu se pohybuje v rozmezí 2,5 a 4,5 minuty. Obrázek 1C znázorňuje výsledek analýzy směsného vzorku standardů albuminu o koncentraci 100 mg/l a prealbuminu o koncentraci 50 mg/l. Kon-

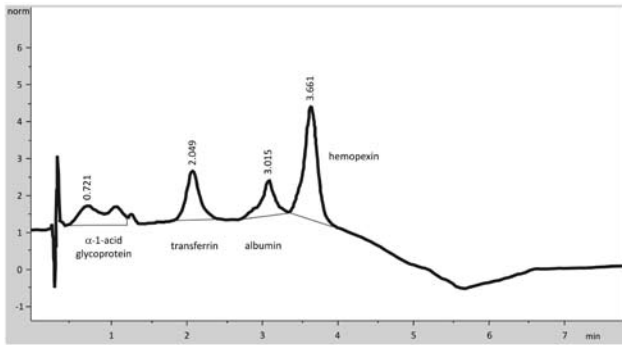


Fig. 2. Analysis of mixture sample of albumin, α -1-acid glycoprotein, transferrin, hemopexin, α -1-antitrypsin, α -1-antichymotrypsin standards

centrace albuminu se zvýšila na 125 mg/l, z čehož je zřejmé, že došlo k významnému ovlivnění analýzy albuminu prealbuminem.

Ve směsi 1 (získané po přidání standardu albuminu do imunoturbidimetricky „normoalbuminurické“ směsi) byla koncentrace albuminu stanovená vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pouze o 4 % vyšší než koncentrace albuminu stanovená imunoturbidimetricky (79,1 mg/l IT vs. 82,5 mg/l HPLC [průměrná koncentrace 16 analýz]). Oproti tomu, ve směsi 2 (připravené z imunoturbidimetricky „mikroalbuminurických“ vzorků) byla HPLC zjištěná hodnota o 26 % vyšší (79,5 mg/l IT vs. 99,9 mg/l HPLC [průměrná koncentrace 16 analýz]).

V souboru 301 pacientů byl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi metodami. Po rozdělení souboru na diabetiky a nediatetiky byl rozdíl mezi metodami významnější v souboru pacientů s diabetem (Tabulka 2).

Soubor všech pacientů jsme dále rozdělili podle imunoturbidimetricky stanovené albuminurie hodnocené poměrem albumin/kreatinin v moči. Statisticky významný rozdíl mezi metodami byl nalezen u pacientů s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií (Tabulka 3), rozdíl byl opět významnější u pacientů s diabetem. Po tomto rozdělení bylo zjištěno, že 30 % pacientů s imunoturbidimetricky zjištěnou „normoalbuminurií“ se posunulo do oblasti HPLC zjištěné „mikroalbuminurie“ (44 pacientů ze 146). Porovnání hodnot poměrů albumin/kreatinin v případě pacientů s imunoturbidimetricky fyziologickou albuminurií je znázorněno na obr. 3. V případě pacientů imunoturbidimetricky v pásmu „mikroalbuminurie“ nastal posun do „makroalbuminurie“ (neboli proteinurie) pouze u 6 % z nich (5 pacientů z 82).

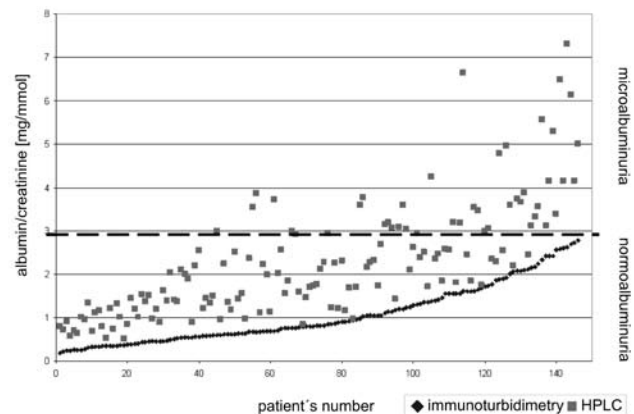


Fig. 3. Comparison between immunoturbidimetric and HPLC assessment of albuminuria (expressed as albumin/creatinine ratio) in patients' group with immunoturbidimetricky physiological albuminuria

Table 2: Albuminuria assessed using immunoturbidimetry (IT) and high performance liquid chromatography (HPLC) in the entire patients' group and after dividing into two groups: diabetics and nondiabetics, SEM = standard error of the mean

| | N | Albuminuria [mg/L] | | | | P |
|--------------|-----|--------------------|------|--------|------|----------|
| | | IT | | HPLC | | |
| | | median | SEM | median | SEM | |
| Entire group | 301 | 21.1 | 38.2 | 30.4 | 42.2 | < 0.0001 |
| Diabetics | 161 | 12.0 | 63.1 | 22.8 | 68.9 | < 0.0001 |
| Nondiabetics | 140 | 37.1 | 39.0 | 42.3 | 44.7 | 0.0448 |

Table 3: Comparison between immunoturbidimetric (IT) and high performance liquid chromatographic (HPLC) assessment of albuminuria after dividing the original group of patients into three groups in accordance with immunoturbidimetric assessed albuminuria (expressed as albumin/creatinine ratio), SEM = standard error of the mean

| Dividing of entire patients' group | N | alb./creat. [mg/mmol] | | | | P | AU [mg/L] | | | | P |
|--|-----|-----------------------|------|--------|------|---------|-----------|-------|--------|-------|---------|
| | | IT | | HPLC | | | IT | | HPLC | | |
| | | median | SEM | median | SEM | | median | SEM | median | SEM | |
| „normoalbuminurics“ (alb./creat. over 2.8 mg/mmol) | 146 | 0.8 | 0.1 | 2.1 | 0.1 | <0.0001 | 6.4 | 0.6 | 15.6 | 0.7 | <0.0001 |
| „microalbuminurics“ (alb./creat. 2.8-28 mg/mmol) | 82 | 7.3 | 0.7 | 8.5 | 0.8 | 0.0312 | 43.1 | 5.0 | 49.0 | 5.9 | NS |
| „macroalbuminurics“ (alb./creat. over 28 mg/mmol) | 73 | 85.7 | 25.7 | 93.4 | 28.5 | NS | 495.2 | 138.1 | 529.9 | 151.9 | NS |

Diskuse

Při zavedené HPLC metodě nedochází k interferenci α -1-kyselého glykoproteinu, transferinu, hemopexinu, α -1-antitrypsinu a α -1-antichymotrypsinu s albuminem. Právě tyto bílkoviny byly některými autory označovány jako „s albuminem koeluuující“ a výsledky albuminurie zjištěné HPLC metodou pak díky tomu jako falešně pozitivní [17, 18].

Eluční křivka prealbuminu se štěpí na několik píků, část z nich s albuminem skutečně koeluuje. Z velmi nízkých fyziologických močových koncentrací prealbuminu (do 150 μ g/l) lze usuzovat, že je tato interference klinicky nevýznamná. Významné ovlivnění analýzy jsme našli při vysokých koncentracích prealbuminu ve vzorku (při více než 300násobku horní hranice normálního rozmezí v moči), které se v moči (ani v krvi) nevyskytují ani za patologických okolností. Prealbumin v moči běžně nevyšetřujeme, v literatuře jsou uváděny imunochemické možnosti detekce (RIA, ELISA), vyšetření bývá prováděno spíše z výzkumných důvodů (diagnostickou výpovědní hodnotu pravděpodobně nemá).

Za uvedených analytických podmínek tedy k významným interferencím nedochází. Tato skutečnost a výsledky analýz směsných močí (ve směsi připravené z imunoturbidimetricky „mikroalbuminurických“ vzorků byla chromatograficky stanovena o 26 % vyšší hodnota albuminurie než imunoturbidimetricky, ve směsi s imunoturbidimetricky „arteficiální mikroalbuminurií“ byly zjištěny prakticky stejné koncentrace oběma metodami) nasvědčují na existenci imunonereaktivního albuminu (jenž ztratil svoji imunoreaktivitu při průchodu renálními tubuly a nelze jej zachytit imunochemickými metodami). Vyhodnocení analýz směsných močí též prakticky vylučuje možnost systematického nadhodnocování hodnot albuminurie metodou HPLC.

Rozdíl mezi metodami byl nejvýznamnější u pacientů s diabetem a dosud fyziologickou albuminurií. Do oblasti HPLC zjištěné „mikroalbuminurie“ se posunulo 30 % pacientů s imunoturbidimetricky zjištěnou „normoalbuminurií“.

Naše výsledky svědčí pro vyšší senzitivitu HPLC metody pro stanovení albuminurie ve srovnání s imunoturbidimetrií. Nepotvrdili jsme nespecifičnost metody, výsledky naopak vypovídají o přítomnosti imunonereaktivního albuminu. Pro zavedení do rutinní praxe však tato metoda hlavně pro svoji časovou náročnost a nutnost obsluhy pouze vysoce proškoleným personálem s dostatečnou praxí nepřichází v úvahu. U vybraných rizikových skupin pacientů (v našem případě tedy např. u imunoturbidimetricky „normoalbuminurických“ diabetiků) by však v budoucnu své opodstatnění najít mohla.

Literatura

1. **McQueen, M. J., Gerstein, H. C., Pogue, J., Mann, J. F. E., Yusuf, S.** Reevaluation by high-performance liquid chromatography: Clinical significance of microalbuminuria in individuals at high risk of cardiovascular disease in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Am. J. Kidney Dis.* 2006, 48 (6), p. 889-896.
2. **Redon, J.** Measurement of microalbuminuria – what the nephrologist should know. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2006, 21 (3), p. 573-576.
3. **Magliano, D. J., Polkinghorne, K. R., Barr, E. L. M. et al.** HPLC-detected albuminuria predicts mortality. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2007, 18 (12), p. 3171-3176.
4. **Greenland, P., Alpert, J. S., Beller, G. A. et al.** 2010 ACCF/AHA guideline for assessment of cardiovascular risk in asymptomatic adults. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2010, 56 (25), p. 50-103.
5. **Russo, L. M., Bakris, G. L., Comper, W. D.** Renal handling of albumin: a critical review of basic concepts and perspective. *Am. J. Kidney Dis.* 2002, 39 (5), p. 899-915.
6. **Russo, L. M., Comper, W. D., Osicka, T. M.** Mechanism of albuminuria associated with cardiovascular disease and kidney disease. *Kidney Int.* 2004, 92, p. 67-68.
7. **Schúck, O., Engliš, M., Horáčková M., Tesař, V.** Vyšetřovací metody. In Tesař, V., Schúck, O. et al. *Klinická nefrologie*. Praha: Grada Publishing, 2006, s. 63-104.
8. **Miller, W. G., Bruns, D. E., Hortin, G. L. et al.** Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin. Chem.* 2009, 55 (1), p. 24-38.
9. **Miller, W. G., Bruns, D. E.** Laboratory issues in measuring and reporting urine albumin. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2009, 24 (3), p. 717-718.
10. **Tesař, V., Zima, T., Racek, J. et al.** Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie. Návrh doporučení 2010. Dostupné na WWW: <<http://www.cskb.cz/res/file/doporučení/dop-proteinurie.pdf>>
11. **Friedecký, B., Buryška, J., Franeková, J. et al.** Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. *Klin. Biochem. Metab.* 2006, 1, p. 54-65.
12. **Babic, N., Larson, T. S., Grebe, S. K., Turner, S. T., Kumar, R., Singh, R. J.** Application of liquid chromatography-mass spectrometry technology for early detection of microalbuminuria in patients with kidney disease. *Clin. Chem.* 2006, 52 (11), p. 2155-2157.
13. **Seegmiller, J. C., Barnidge, D. R., Burns, B. E., Larson, T. S., Lieske, J. C., Kumar, R.** Quantification of urinary albumin by using protein cleavage and LC-MS/MS. *Clin. Chem.* 2009, 55 (6), p. 1100-1107.
14. **Comper, W. D., Osicka, T. M., Jerums, G.** High prevalence of immuno-unreactive albumin in urine of diabetic patients. *Am. J. Kidney Dis.* 2003, 41 (2), p. 336-342.
15. **Comper, W. D., Osicka, T. M., Clark, M., MacIsaac, R. J., Jerums, G.** Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int.* 2004, 65 (5), p. 1850-1855.

16. **Osicka, T. M., Comper, W. D.** Characterization of immunochemically nonreactive urinary albumin. *Clin. Chem.* 2004, 50 (12), p. 2286-2291.
17. **Sviridov, D., Meilinger, B., Drake, S. K., Hoehn, G. T., Hortin, G. L.** Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin. Chem.* 2006, 52 (3), p. 389-397.
18. **Shaikh, A., Seegmiller, J., Borland, T. et al.** Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography, and LC-MS to quantify urinary albumin. *Clin. Chem.* 2008, 54 (9), p. 1504-1510.

Do redakce došlo 29. 2. 2012

Adresa pro korespondenci:
MUDr. Ing. Magdaléna Fořtová
Ústav lékařské chemie a klinické biochemie
2. LF UK a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
Klinika nefrologie UK 1. LF a VFN
U Nemocnice 2, 128 08 Praha 2
e-mail: MagdalenaFortova@seznam.cz