

# Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování proteinurie

Autorský kolektiv: Tesař Vladimír, Zima Tomáš, Racek Jaroslav, Teplan Vladimír, Friedecký Bedřich, Kratochvíla Josef, Granátová Jana, Kubíček Zdeněk

## 1. Souhrn

Vyšetření močových bílkovin stále zůstává jedním ze základních vyšetření v nefrologii. Nezastupitelné místo má jak v časně diagnostice nemocí ledvin, tak v monitoraci jejich aktivity, odpovědi na léčbu a odhadu rizika vývoje selhání ledvin i kardiovaskulárního rizika. Současná diagnostika je založena na vyšetření celkové bílkoviny a albuminu v moči, méně často je vyšetřována močová exkrece jednotlivých dalších močových proteinů. V poslední době se doporučuje stanovovat poměr bílkovina/kreatinin (PCR) nebo častěji albumin/kreatinin (ACR) v náhodných vzorcích ranní moči (v prvním ranním vzorku). Pro včasné odhalení počínajícího postižení ledvin u diabetiků a hypertoniků má význam stanovení mírně zvýšeného odpadu albuminu, tzv. mikroalbuminurie. Pro diagnostiku tubulární a prerenální proteinurie musí být v moči kvantitativně stanoven vhodný mikroprotein, nejlépe  $\alpha_1$ -mikroglobulin nebo cystatin C, nebo prokázán kvalitativně protein způsobující prerenální proteinurii – myoglobin, hemoglobin, volné lehké řetězce imunoglobulinů.

## 2. Fyziologie vylučování bílkovin do moči

Glomerulární kapilární stěna (zejména glomerulární bazální membrána) efektivně brání průniku bílkovin v závislosti na jejich molekulové hmotnosti (velikosti), náboji (usnadňuje vylučování kationických a znesnadňuje vylučování anionických bílkovin) a tvaru. Bílkoviny s molekulovou hmotností větší než albumin (69 kD, efektivní průměr 3,6 nm) pronikají do moči velmi omezeně, zatímco se snižující se molekulovou hmotností a efektivním průměrem se filtrace dané makromolekuly progresivně zvyšuje (selektivita podle velikosti event. tvaru molekuly).

Vzhledem k bohaté přítomnosti proteoglykanů (zejména heparansulfátu) v glomerulární bazální membráně, které fungují jako polyanionty, pronikají do moči nejnáze bílkoviny s převahou bazických aminokyselin (chovají se jako polykationty). Většina plazmatických bílkovin (např. albumin) se za fyziologického pH chová jako polyanionty.

Nízkomolekulární bílkoviny, které jsou volně filtrovány v glomerulech, jsou účinně resorbovány a následně katabolizovány v proximálním tubulu a jejich koncentrace v moči jsou minimální. Zdravými ledvinami při běžném průtoku krve 1,2 l/min proteče cca 40 – 45 kg albuminu denně, z tohoto množství se do ultrafiltrátu dostává asi 2 – 3 g albuminu; většina profiltrovaného albuminu (99 %) je ale katabolizována v tubulech, takže močí se fyziologicky vyloučí méně než 30 mg albuminu denně. Nejvýznamnější součástí tzv. **fyziologické proteinurie** je tzv. Tamm-Horsfallův protein (uromodulin) – mukoprotein, který je secernován tubulárními buňkami v tlusté části vzestupného raménka Henleho kličky (cca 30 – 50 mg/24 h). Dalšími složkami jsou albumin (do 10 mg/24 h), IgG a sekreční IgA (do 10 – 15 mg/24 h) a volné lehké řetězce imunoglobulinů (do 10 – 15 mg/24 h).

Při běžné svalové aktivitě nepřesáhne fyziologická proteinurie 50 – 80 mg/24 h, při větší svalové aktivitě, prolongované ortostáze a sníženém příjmu tekutin může být vyšší – horní hranice fyziologické proteinurie je arbitrárně definována na 150 mg/24 h.

Podle posledních prací je permeabilita glomerulární kapilární stěny podstatně vyšší, než se obecně předpokládá, a minimální množství albuminu v moči zdravých osob je způsobeno zejména jeho velmi efektivní tubulární resorpcí.

### 3. Klasifikace zvýšeného vylučování bílkovin do moči

Z hlediska etiologie lze proteinurii dělit do několika základních skupin (Engliš, 2007; Žabka, 2007):

- a. **Funkční proteinurie** je přechodná proteinurie, která se může vyskytnout u osob se zdravými ledvinami, např. při těžší práci nebo cvičení, při emočním stresu. Mechanismus této glomerulární proteinurie je pravděpodobně hemodynamický, je tedy nejspíše glomerulárního původu. Hemodynamickou příčinu má zřejmě také tzv. **ortostatická proteinurie**, která se vyskytuje u asi 2 – 5 % mladých, jinak zdravých jedinců, častěji mužů, a je charakterizována malou proteinurií (zpravidla menší než 1 g/24 h) vstoje a nezvýšenou proteinurií vleže. Je-li zvýšena i proteinurie v nočním vzorku (tj. z doby, kdy pacient ležel), je nutno vyloučit organické onemocnění ledvin.
- b. **Prerenální proteinurie** je vyvolána zvýšenou plazmatickou koncentrací zejména nízkomolekulárních, snadno filtrovatelných proteinů, jejichž filtrace překročí resorpční kapacitu proximálního tubulu, např. vylučováním lehkých řetězců imunoglobulinů u některých monoklonálních gamapatií, myoglobinu u rhabdomyolýzy, hemoglobinu u akutní hemolýzy, lysozymu u některých typů leukémie či  $\beta_2$ -mikroglobulinu u některých malignit (zejména hematologických), také tkáňových katabolitů, event. proteinů akutní fáze.
- c. **Glomerulární proteinurie** může být způsobena: a) ztrátou negativního náboje glomerulární bazální membrány (ztráta selektivity podle náboje); důsledkem je zejména albuminurie, jde tedy o tzv. **selektivní proteinurii**, typicky u tzv. nefrotického syndromu s minimálními změnami glomerulů; b) těžším poškozením glomerulární membrány se vznikem rozsáhlejších defektů, kterými procházejí i proteiny s velkou molekulovou hmotností (ztráta selektivity podle velikosti), např. IgG (tzv. **neselektivní proteinurie**).
- d. **Tubulární proteinurie** vzniká a) při porušené zpětné resorpci profiltrovaných nízkomolekulárních bílkovin v proximálním tubulu; může být projevem tubulointersticiální nefropatie (např. při pyelonefritidě), při toxickém poškození (gentamicin, NSAID, rtuť, kadmium), ischemii, metabolických dysbalancích (hypokalémie, hyperkalcémie, hyperurikémie) nebo jako součást tzv. Fanconiho syndromu např. u mnohočetného myelomu, Wilsonovy choroby; b) funkční tubulární proteinurie vzniká při překročení maximální tubulární resorpční kapacity buněk proximálních tubulů při zvýšené nabídce jiných resorbovatelných bílkovin (nejčastěji monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulinů, event. myoglobinu či hemoglobinu); c) na podkladě metabolického poškození – hyperurikémie, hyperoxalurie, při obstrukční uropatii).
- e. **Postrenální proteinurie** je způsobena sekrecí bílkovin do moči ve vývodných močových cestách (krvácení, zánět); typická je přítomnost  $\alpha_2$ -makroglobulinu a IgM.
- f. **Artifciální proteinurie** je charakterizována přítomností cizorodé bílkoviny, kterou z nějakého důvodu pacient do moči přidal. Nejčastěji se jedná pro snadnou dostupnost o vaječný bílek. Průkaz se provádí elektroforeticky, případně imunochemicky.

Podle velikosti (ztrát bílkovin do moči za 24 h) se proteinurie dělí na malou (0,15 – 1,5 g/24 h), střední (1,5 – 3,5 g/24 h) a velkou (> 3,5 g/24 h).

## 4. Metody vyšetření proteinurie

### 4.1. Orientační vyšetření moči na bílkovinu testovacím proužkem

Pro **screening** mohou být použity **orientační vyšetření proteinurie nebo albuminurie pomocí testovacích proužků**. Vzhledem k nízké senzitivitě, nízké specifitě a nízké negativní predikční hodnotě se rutinní screeningové vyšetřování proteinurie testovacími proužky přestává v běžné populaci doporučovat (Lamb et al., 2009).

Při orientačním vyšetření proteinurie testovacími proužky detekujeme bílkovinu v moči pouze, je-li její koncentrace vyšší než 0,2 až 0,3 g/l, přičemž jsou výsledky velmi závislé na výrobci diagnostického proužku. Rozmezí 0 až 4+ při kvalitativní analýze zhruba odpovídá rozmezí 0 až 5 g/l při analýze kvantitativní. Výsledky kvalitativního stanovení vyšetření testovacím proužkem závisí nejen na koncentraci proteinu, ale i na stupni zahuštění moči, změna z 4+ na 2+ tedy vůbec nemusí znamenat pokles proteinurie, ale jen např. zvýšený příjem tekutin a/nebo polyurii; vyšetření moči testovacím proužkem se proto rozhodně nehodí k monitorování vývoje proteinurie.

U pacientů s pozitivním nálezem při vyšetření diagnostickým proužkem (1+ a více) má být přítomnost proteinurie potvrzena vyšetřením kvantitativním (stanovením poměru protein/kreatinin nebo albumin/kreatinin v moči).

### 4.2. Vyšetření celkové bílkoviny/albuminu v moči

Při **detekci i monitorování proteinurie** je doporučováno její **vyšetření ve vzorku** (nejlépe první ranní, pokud není dostupná, i jiné) **nesbírané moči**. Kvantitativní proteinurie je v tomto případě vyjadřována jako **poměr protein/kreatinin v moči (PCR – protein creatinine ratio)**. Noční nebo 24-hodinový sběr se nedoporučuje. Protože nejčastějšími příčinami chronického onemocnění ledvin u dospělých jsou diabetes mellitus, hypertenze a chronické glomerulonefritidy, které jsou spojeny s někdy jen mírně zvýšenou exkrecí albuminu, je vhodnější stanovit místo koncentrace celkové bílkoviny albumin a výsledek vyjadřovat jako poměr **albumin/kreatinin v moči (ACR - albumin creatinine ratio)**.

Důraz kladený na použití poměru celková bílkovina nebo albumin/kreatinin v moči má několik důvodů, zejména nepohodlnost sběru moči pro pacienta a nepřesnost sběru moči.

Hodnota poměru albumin/kreatinin má nejvyšší výpovědní hodnotu a nejnižší intraindividuální biologickou variabilitu.

**Vzorek první ranní moči je nejvhodnější**, neboť v něm poměr albumin/kreatinin koreluje s 24-hodinovým vylučováním albuminu nejlépe. Pokud není možný první ranní vzorek, je použitelný i jiný náhodný vzorek nesbírané moči (Keane et al., 1999).

#### 4.2.1. Preanalytické podmínky

Pro rutinní měření proteinurie/albuminurie je nejvhodnější skladování vzorků před analýzou v lednici při 2 – 8 °C a temperování vzorků před měřením na pokojovou teplotu k odstranění případných precipitací. Stabilita při této teplotě je minimálně 7 dní. Zamrazování se nedoporučuje, protože není dostatečně prostudovaná případná sorpce na stěny odběrových zkumavek ani jiné ovlivňující faktory.

Vyšetření proteinurie není doporučeno v akutním horečnatém stavu (není-li předpokládáno akutní onemocnění ledvin), krátce po zvýšené fyzické námaze, při menses, infekci vývodných močových cest. Při vyšetření močovým proužkem může být **falešně pozitivní výsledek** při dehydrataci, hematurii, extrémně alkalické moči s pH > 8, při kontaminaci dezinfekčními roztoky, naopak **falešně negativní výsledek** při vylučování jiných bílkovin než albumin, které omezeně reagují s testovacími proužky).

Kvalitativní vyšetření bílkoviny v moči je doporučeno doplnit o zkoušku 20 % kyselinou sulfosalicylovou, která reaguje stejně se všemi vylučovanými proteiny. Pozitivní zkouška kyselinou sulfosalicylovou při negativní zkoušce na přítomnost bílkoviny močovým proužkem ukazuje na přítomnost jiných bílkovin (nejčastěji volných lehkých řetězců imunoglobulinů nebo tubulárních proteinů).

#### **4.2.2. Rutinní metody stanovení celkové bílkoviny v moči**

Za nejspecifičtější metodu pro stanovení celkové proteinurie se pokládá biuretová metoda, která měří všechny močové proteiny a glykoproteiny se srovnatelnou senzitivitou. Zásadní nevýhodou této metody je její nízká citlivost pro koncentrace běžně nacházené v moči a s tím spojená nízká přesnost měření. K automatizaci je nutné použít metody stanovující nefelometricky nebo turbidimetricky protein precipitovaný kyselinou trichloroctovou nebo benzethoniumchloridem nebo alternativně spektrofotometrické metody založené na barevných reakcích, zejména pak metodu s pyrogallolovou červení. Tyto metody detekují se srovnatelnou citlivostí albumin a imunoglobulin G, ale mají nízkou citlivost pro stanovení některých močových glykoproteinů, např. Tamm-Horsfallova proteinu, a zejména volných lehkých řetězců imunoglobulinů. Reprodukovatelnost měření v programech externího hodnocení kvality se v případě programu SEKK typicky pohybuje pro koncentraci 0,24 g/l v intervalu 4 – 17 %; v programu NEQAS 5 – 14 % pro koncentraci 0,28 g/l a 3 – 10 % pro koncentraci 1,45 g/l.

#### **4.2.3. Rutinní metody stanovení albuminu v moči**

Imunochemické metody (imunoturbidimetrie/imunonefelometrie) vykazují mez detekce 2 až 10 mg/l (pro srovnání: mez detekce celkového proteinu v moči pomocí stanovení testovacími proužky je asi 150 mg/l). Mezilaboratorní reprodukovatelnost ( $CV_{\text{mezilab}}$ ) v systémech EHK se pohybovala v intervalu 5 % až 16,5 % pro koncentrace nižší než 30 mg/l a v intervalu 3,1 % až 12,1 % pro koncentrace vyšší než 30 mg/l albuminu.

#### ***Referenční materiál***

V současné době není k dispozici certifikovaný referenční materiál a není uveden ani na seznamu JCTLM. Rutinní pracovní kalibrátory mají hodnoty odvozené srovnáním s ředěným sérovým referenčním materiálem ERM DA470. Způsob ředění při přenosu hodnot není definovaný, ani dokumentovaný. Pracovní kalibrátory obsahují různá množství interferujících polymerovaných albuminů.

Japonská společnost klinické chemie a Japonská společnost pro standardy v klinické chemii vyvinula prototyp certifikovaného referenčního materiálu s maticí, tvořenou chloridem sodným, fosfátovým pufrům a sacharosou a bez obsahu albuminových polymerů. Certifikovaná hodnota byla při absenci referenční metody ustanovena mezilaboratorními pokusy s použitím rutinních imunochemických metod. Kontrolní materiál je postoupen k schválení a uvedení na seznam JCTLM. Referenční metoda používaná k odvození návazných hodnot albuminu v pracovních kalibrátorech bude pravděpodobně založena na principu tandemové hmotnostní spektrometrie LC/MS-MS (Shaikh A. et al., 2008).

HPLC metody poskytují systematicky vyšší výsledky než metody imunochemické. Příčinou je buď částečné snížení imunoreaktivity albuminu v moči po exkreci anebo nespecifická eluce albuminu ze separační kolony. Poslední výzkumy nasvědčují vyšší správnosti imunochemického měření.

#### 4.2.4. Závěry

Vyšetření odpadů proteinů moči za 24 hod zůstává významným základním parametrem proteinurie. Pro zpřesnění vyšetření kvantitativní proteinurie/albuminurie se doporučuje měření **poměru koncentrace celkové bílkoviny v moči (PCR) nebo albuminu (ACR) a kreatininu v moči v prvním ranním vzorku** moči. Vhodné je vydávat výsledek v měření mg/mmol (Miller et al., 2009). Poměr koncentrace albuminu a kreatininu v moči nelze použít při koncentraci kreatininu v séru > 250  $\mu$ mol/l.

**Klasifikace proteinurie** (upraveno dle Lamb, 2009)

Stav	PCR (mg/mmol)	ACR (mg/mmol)
fyziologický	< 15	< 2,5 (muži) < 3,5 (ženy)
mikroalbuminurie	–	2,6 – 29,9 (muži) 3,6 – 29,9 (ženy)
proteinurie	15 – 99	30 – 69
těžká proteinurie	$\geq$ 100	$\geq$ 70

U pacientů s dvěma nebo více pozitivními nálezy proteinurie při kvantitativním vyšetření má být diagnostikována perzistentní proteinurie a tyto pacienti mají podstoupit další vyšetření (a event. léčbu) chronického onemocnění ledvin. Při monitorování proteinurie mají být používány kvantitativní metody.

#### 4.3. Vyšetření mikroalbuminurie

Zvýšené vylučování albuminu moči, které není detekovatelné kvalitativními metodami realizovanými běžnými testovacími proužky pro průkaz proteinů v moči, se označuje jako *mikroalbuminurie*.

Mikroalbuminurii lze semikvantitativně detekovat speciálními testovacími proužky, které mají diagnostickou senzitivitu cca 30 – 40 mg/l albuminu. Kvantitativně je měřena obvykle imunonefelogricky nebo imunoturbidimetricky (Friedecký et al., 2006; Miller et al., 2009).

#### Kritéria detekce mikroalbuminurie

Typ vzorku	Mikroalbuminurie
Náhodný vzorek	2,6 – 29,9 mg/mmol kreatininu (muži) 3,6 – 29,9 mg/mmol kreatininu (ženy)
Sběr moči	30 – 299 mg/24 h 20 – 199 $\mu$ g/min

*Preferovaným kritériem je hodnota ACR (mg/mmol kreatininu)*

Hodnota cut-off pro ACR je prozatímni a bude velmi pravděpodobně upřesňována diferenciací podle věku a pohlaví probandů. Hodnoty přesahující horní intervaly uvedených kritérií jsou již považovány za *proteinurii*. Analýza vzorků s vysokou celkovou proteinurií je zcela nevhodná ke stanovení mikroalbuminurie imunochemickými metodami (nebezpečí „hook efektu“).

Měření koncentrace albuminu v moči je důležité u nemocných s diabetem, s arteriální hypertenzí a ICHS.

U diabetiků vykazuje vyšetření **mikroalbuminurie** významnou schopnost časně predikce diabetické nefropatie. Pacienti s diabetem by měli být testováni na přítomnost diabetického onemocnění ledvin jednou ročně. Screening by měl začít u pacientů s diabetem 1. typu 5 let po stanovení diagnózy diabetu a u pacientů s diabetem 2. typu ihned po stanovení diagnózy. **Screening** zahrnuje stanovení poměru albumin/kreatinin v prvním ranním vzorku moči. Vyšetření albuminu v moči sbírané 24 hodin se nedoporučuje, je však možné vyšetřit albuminurii ve vzorku moči sbíraném během klidu na lůžku v noci; výsledek je pak vydáván v  $\mu\text{g}/\text{min}$ . V praxi se však dává přednost vyšetření v jednorázovém vzorku moči, výsledek se vztahuje ke koncentraci kreatininu v moči ( $\text{mg}/\text{mmol}$  kreatininu). Vzhledem k vysoké intraindividuální variabilitě (až 30 %) by pro diagnózu mikroalbuminurie měly být pozitivní alespoň 2 ze 3 vzorků moče vyšetřených v průběhu 3 – 6 měsíců; vyšetření by nemělo být prováděno při současné infekci močových cest, po zvýšené fyzické námaze a při menses.

**Diabetické onemocnění ledvin** je přítomno ve formě incipientní diabetické nefropatie vždy, je-li prokázána mikroalbuminurie. Zlepšení metabolické kompenzace diabetu, uspokojivá korekce hypertenze a léčba inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) výrazně snižuje riziko progresu poškození ledvin. Pacienti s mikroalbuminurií (i nediabetici) mají výrazně zvýšené kardiovaskulární riziko. Mikroalbuminurie je u těchto nemocných zřejmě markerem generalizované endotelové dysfunkce. V poslední době se ukazuje, že zvýšené renální i kardiovaskulární riziko mají i osoby s tzv. vysokou normální albuminurií.

Na **jiné než diabetické onemocnění ledvin** by mělo být pomýšleno, pokud není přítomna diabetická retinopatie, je výrazně snižena nebo rychle klesající glomerulární filtrace, rychle roste proteinurie a/nebo se rozvíjí nefrotický syndrom, u refrakterní hypertenze, patologického močového sedimentu, při známkách systémového onemocnění a při poklesu glomerulární filtrace o více než 30 % do 3 měsíců po zahájení léčby inhibitory ACE.

Podrobněji viz společné doporučení České společnosti klinické biochemie a České diabetologické společnosti „**Diagnostika a sledování diabetes mellitus**“.

#### 4.3.1. Preanalytické podmínky

Albumin je v moči stabilní minimálně 1 týden při teplotě 4 – 20 °C. Zatímco během skladování při -20 °C lze pozorovat mírné snižování koncentrace albuminu v moči, při teplotě -70 °C a nižší k poklesu koncentrace nedochází ani po 6 měsících uskladnění.

Koncentrace albuminu v moči jsou ovlivňovány akutními chorobnými stavy, infekcí močových cest, zvýšenou fyzickou námahou, zvýšenou koncentrací glukózy v krvi.

#### 4.3.2. Rutinní metody stanovení mikroalbuminurie

Imunoturbidimetrie a imunonefelometrie jsou nejrozšířenější metody; mohou však určitým způsobem podhodnocovat výslednou koncentraci albuminu v moči vzhledem k fragmentaci albuminu v moči a ztrátě části imunoreaktivity.

Požadovaná reprodukovatelnost měření je  $\text{CV} < 15 \%$ .

Akceptovatelné hodnoty bias musí být zabezpečeny realizací návaznosti rutinní metody na mezinárodní referenční materiál CRM 470, tedy odvozením hodnoty pracovního kalibrátoru porovnáním s materiálem CRM 470.

Mez detekce musí dosahovat minimálně hodnoty 20  $\text{mg}/\text{l}$  albuminu, nebo lépe nižší.

Při pozitivitě celkového proteinu v moči diagnostickým proužkem se stanovení mikroalbuminurie neprovádí (je překročen pracovní rozsah měření).

#### 4.4. Vyšetření dalších proteinů v moči

##### 4.4.1. Kvantitativní analýza

Pro hodnocení složení proteinurie je třeba vyšetřit i exkreci dalších proteinů v moči:  $\alpha_1$ -mikroglobulinu (dále jen a1m), IgG,  $\alpha_2$ -makroglobulinu (A2M), event. transferinu, cystatinu C, pro diferenciální diagnostiku tubulárního poškození může být cenným i stanovení N-acetyl- $\beta$ -D-glukosaminidázy (NAG) v moči.

Zatímco a1m je možné vyšetřovat imunoturbidimetricky nebo imunonefelometricky, IgG, transferin a A2M v moči vzhledem k nízkým koncentracím pouze imunonefelometricky. V moči jsou a1m, IgG, transferin i A2M stabilní minimálně 1 týden při teplotě 2 – 8 °C, není doporučeno vzorky mrazit – po následném rozmražení klesá koncentrace IgG v moči až o 30 %. Stanovení  $\beta_2$ -mikroglobulinu (b2m) v moči se nedoporučuje, neboť je nestabilní v kyselém prostředí.

Referenční hodnoty:

a1m:	2 – 12 mg/l, resp. < 14 mg/g kreatininu (1,58 mg/mmol kreatininu)
IgG:	2 – 10 mg/l, resp. < 10 mg/g kreatininu (1,13 mg/mmol kreatininu)
transferin:	0,2 – 1,2 mg/l, resp. < 2 mg/g kreatininu (0,23 mg/mmol kreatininu)
A2M:	< 7 mg/g kreatininu (0,79 mg/mmol kreatininu)
cystatin C:	< 0,30 mg/l, resp. < 100 mg/g kreatininu (< 11,3 mg/mmol kreatininu)
NAG:	< 0,105 $\mu$ kat/l, resp. < 0,083 $\mu$ kat/g kreatininu (< 9,4 nkat/mmol kreatininu)

##### 4.4.2. Kvalitativní analýza

Kvalitativní pohled na proteinurii poskytují **elektroseparační techniky**, většinou založené na principu **elektroforézy**, event. v kombinaci s monoklonálními protilátkami. Poskytují informaci o přítomnosti některých vylučovaných proteinů – albuminu, transferinu, IgG,  $\alpha_1$ -mikroglobulinu, hemoglobinu, event. monoklonálních volných lehkých řetězců imunoglobulinů (mFLC) – u mFLC v závislosti na jejich koncentraci v séru, maximální kapacitě tubulární resorpce a renálních funkcích (pozn.: negativní nález v elektroforéze a event. imunofixaci moče nevylučuje přítomnost mFLC v séru nemocného). Umožňují dále diferencovat proteinurii na glomerulární, prerenální, smíšenou glomerulo-tubulární, event. tubulární. Tubulární proteinurie vzhledem k fyzikálně-chemickému složení proteinů (většinou glykoproteiny s obtížnější barvitelností v elektroforéze) jsou u některých typů elektroforéz (zejména u prosté elektroforézy v agarózovém gelu) hůře detekovatelné, resp. neumožňují jejich časnou diagnostiku. Kvalitativní stanovení nezohledňuje míru koncentrace moče; hraniční nálezy mohou být u některých nemocných s koncentrovanou močí falešně pozitivní, naopak s velmi zředěnou močí falešně negativní. Hodnocení selektivity je velmi orientační, zejména u hraničních nálezů.

Je možné provádět elektroforézu moče v **nativní nezahuštěné moči** (rozdělení bílkovin podle jejich náboje) po barvení genciánovou violetí, elektroforézu močových proteinů v **polyakrylamidovém gelu s přidavkem laurylsíranu sodného** (sodium dodekasulfát, SDS), tzv. SDS-PAGE (rozdělení bílkovin podle jejich molekulové hmotnosti), v **agarózovém gelu s přidavkem SDS**, event. na alkalicky pufovaném agarózovém gelu **v kombinaci s monoklonálními protilátkami proti vybraným proteinům** – b2m, a1m, albuminu, A2M, IgG, těžkým řetězcům imunoglobulinů a lehkým řetězcům imunoglobulinů (volným i vázaným).

Stabilita moče pro vyšetření elektroforézy je minimálně 1 týden při teplotě 2 – 8 °C, není doporučeno vzorky mrazit.

Metodou budoucnosti by mohlo být **hodnocení proteomu v moči**, proteomika moče je v současné době předmětem výzkumu, zatím výsledky nejsou aplikovatelné v běžné praxi.

#### 4.5. Hodnocení proteinurie

**Kvalitativní** (elektroforetické) techniky hodnotí nález na podkladě porovnání s typickými obrazy glomerulární selektivní a neselektivní, tubulární a glomerulotubulární proteinurie; vyžadují značnou zkušenost. Je doporučeno hodnotit elektroforetický nález v kontextu klinickém a společně s dalšími nálezy. U elektroforezy kombinované s monoklonálními protilátkami jsou porovnávány proužky s imunoprecipitáty s odpovídajícími abnormálními frakcemi a typickými nálezy.

**Kvantitativní** hodnocení vychází z teorie tzv. „**indikátorových proteinů**“ (viz Hofmann et al., 1993 – 2000). Indikátorové proteiny jsou bílkoviny o různé velikosti molekuly, s různým chováním v ledvině, fyziologicky přítomné v definitivní moči ve velmi nízkých koncentracích (mg/l); jsou-li hodnoceny jako celek, jejich zvýšená exkrece močí ukazuje na určitý typ onemocnění ledvin a/nebo vývodných močových cest. Alfa<sub>1</sub>-mikroglobulin je ukazatelem poškození tubulů a/nebo tubulointercie ledviny, albumin je základním glomerulárním ukazatelem, IgG je ukazatelem glomerulárního poškození, zánětlivé syntézy v intersticiu ledviny nebo postrenální proteinurie; jako doplňkový ukazatel pro rozlišení mírné glomerulární a tubulární proteinurie slouží transferin v moči. Alfa<sub>2</sub>-makroglobulin jako postrenální ukazatel je fakultativně využíván při hodnocení hematurie.

Při hodnocení jsou vzájemně porovnávány koncentrace vybraných močových proteinů, vyjádřené jako poměr ke koncentraci kreatininu v moči (albumin k IgG a albumin k a1m) formou indexů, grafů, event. expertních systémů. Tento typ hodnocení na podkladě distribucí jejich exkrecí umožňuje rozlišit glomerulopatii primární (glomerulonefritidy), glomerulopatii sekundární (nejčastěji při diabetu a/nebo hypertenzi), pokročilé smíšené glomerulotubulární poškození, intersticiální poškození, čisté poškození tubulů, pre- a postrenální proteinurii.

Selektivitu glomerulární proteinurie hodnotí poměr IgG k albuminu (index  $\leq 0,03$  svědčí pro selektivní, vyšší pro neselektivní proteinurii). Albumin, IgG a a1m by měly tvořit alespoň 60 % celkové patologické proteinurie, při jejich nižším zastoupení tzv. proteinový gap ukazuje na prerenální proteinurii s přítomností nejčastěji volných lehkých řetězců imunoglobulinů, event. myoglobinu, hemoglobinu. Stanovení NAG v kombinaci s koncentrací albuminu v moči umožní rozlišit u tubulárního poškození, zda se jedná akutní nebo chronické poškození tubulů.

Kvantitativní stanovení jednotlivých proteinů a jejich vzájemné zhodnocení umožňuje diagnostiku patologického složení celkové proteinurie ještě v době, kdy nepřekračuje konsenzuální hodnotu 150 mg/24 h, monitorování vývoje postižení v čase i hodnocení terapeutické odezvy.

#### 4.6. Hodnocení hematurie

Stanovení typu hematurie, zejména rozlišení, zda se jedná o hematurii glomerulární nebo neglomerulární, pomáhá lékařům v diagnostice a diferenciální diagnostice onemocnění ledvin a/nebo vývodných močových cest (např. glomerulární hematurie může podpořit diagnózu glomerulonefritidy) nebo ho upozornit na event. rizika (např. neglomerulární hematurie u tubulointercie nefropatie může svědčit pro nádor vycházející z močového urotelu).

Jako tzv. „zlatý standard“ bylo považováno **vyšetření erytrocytů ve fázovém kontrastu** světelného mikroskopu. Pro glomerulární hematurii svědčí nález 80 a více % tzv. dysmorfních erytrocytů a/nebo 5 % akantocytů, event. erytrocytárních válců. Pro neglomerulární hematurii svědčí nález 80 a více % eumorfních erytrocytů. Hodnocení vyžaduje zkušenost, je vždy subjektivní a mezilaboratorní srovnatelnost výsledků je nízká.



Nález závisí na kvalitě moče, resp. její buněčnosti, je doporučeno hodnotit moč do 15 min po mikci. Mezi jednoznačně glomerulárním a neglomerulárním nálezem je široká šedá zóna, ve které mohou být i klinicky závažné nálezy. Diagnostická senzitivita pro glomerulární hematurii je při vyšetření erytrocytů ve fázovém kontrastu uváděna 53 – 74 % při specifičnosti 50 – 98 %.

Proteinové indexy mohou být metodou volby. Hodnocení **podle indexů indikátorových proteinů** (albuminu, IgG,  $\alpha_1$ -mikroglobulinu,  $\alpha_2$ -makroglobulinu) (Guder a Hofmann, 1993) umožňuje na podkladě kombinace tří indexů odlišit postrenální typ hematurie od renálního glomerulárního a tubulointersticiálního, včetně hodnocení smíšených hematurií, s diagnostickou senzitivitou vyšší než 90 % (93 – 97 %) při specifičnosti 80 – 85 % pro glomerulární hematurii. Hodnocení je limitováno koncentrací albuminu v moči alespoň 100 mg/l. Při nižší albuminurii může být metodou volby tzv. **albuminový index**, hodnotící koncentraci albuminu v moči k celkové proteinurii (Ohisa et al., 2007). Při zvolené hodnotě cut-off umožňuje rozlišit glomerulární typ hematurie (index  $\geq 0,59$ ) od neglomerulárního typu (index  $< 0,59$ ). U smíšených hematurií nebývá hodnocení jednoznačné, je doporučováno opakované vyšetření. Diagnostická senzitivita pro glomerulární hematurii je uváděna různými autory v rozmezí 71 – 97 % při specifičnosti 71 – 100 %.

**Hodnocení typu hematurie podle indexů indikátorových proteinů** (Guder a Hofmann, 1993)

Typ HU	A2M/A	a1m/A	IgG/A
postrenální	> 0,02	< 0,1	> 0,2
renální	< 0,02	< 0,1	< 0,2
- glomerulární			
- tubulointersticiální	< 0,02	> 0,1	> 0,2
smíšená	kombinace		

## 5. Význam vyšetření proteinurie u chronických onemocnění ledvin

Velikost proteinurie resp. albuminurie má těsný vztah k riziku renálnímu (tj. riziku vývoje selhání ledvin) i kardiovaskulárnímu (tj. riziku kardiovaskulárních komplikací) (Ibsen et al., 2005). Redukce proteinurie léky inhibujícími systém renin-angiotenzin-aldosteron snižuje u pacientů s chronickým onemocněním ledvin obě rizika, opakované vyšetřování proteinurie je u těchto pacientů důležité pro monitorování efektu léčby a odhad prognózy a rychlosti vývoje selhání ledvin i rizika kardiovaskulárních komplikací.

Tzv. mikroalbuminurie má význam pro včasnou diagnostiku poškození ledvin u nemocných s diabetem a arteriální hypertenzí.

Nemocní s proteinurií vyšší než 3,5 g/24 h (tzv. **nefrotická proteinurie**) jsou ohroženi vznikem nefrotického syndromu (s hypoproteinémií, hypoalbuminémií, hyperlipidémií – zejm. hypercholesterolémií, u těžších forem i hypertriacylglycerolémií, tendencí k trombotickým komplikacím) a otoky; dochází také ke ztrátám transportních plazmatických bílkovin s klinickými projevy. Hypoalbuminémie nekoreluje s velikostí albuminurie.

## 6. Přehled charakteru doporučení o proteinurii u nemocí ledvin a diabetu mellitu

Bylo stručně vyhodnoceno 10 doporučení z USA, Velké Británie a Austrálie.

Použití testovacích proužků k sledování celkové proteinurie doporučují čtyři z nich, použití testovacích proužků k detekci albuminu pouze jedno. Tři doporučení jednoznačně preferují stanovení albuminu v moči před stanovením celkového proteinu. Sedm zbývajících doporučuje alternativně hodnotit ACR nebo PCR, žádné z nich nedoporučuje hodnotit koncentraci albuminu/proteinu ve sběru moči. Z uvedených sedmi doporučení vyžadují tři z nich vyšetření albuminu v moči u diabetiků, zatímco u nefrotických pacientů připouštějí alternativně ACR nebo PCR.

Všech deset doporučení navrhuje použití náhodných vzorků ranní (nejlépe první ranní) moče.

## 7. Doporučení pro vyšetření proteinurie tubulární a prerenální

Metoda vyšetření proteinurie diagnostickými proužky, založená na proteinové chybě acidobazického indikátoru, ale i většina metod pro stanovení proteinurie na podkladě měření zákalu po denuraci proteinů stanovuje hlavně albumin. Při tubulární a prerenální proteinurii je nález často negativní. Tubulární a prerenální proteinurie bývají často kvantitativně nízké, i nižší než 150 mg/24 h (tedy v oblasti kvantitativně fyziologické proteinurie), proto nebývají někdy diagnostikovány.

Při podezření na **prerenální proteinurii** je třeba podle klinického stavu hledat příslušný protein (myoglobin, hemoglobin – oba dávají pozitivní reakci na krev pomocí diagnostického proužku; volné lehké řetězce imunoglobulinů – imunofixační elektroforézou v moči, současně v séru hledáme M-protein a vyšetříme poměr volných lehkých řetězců kappa/lambda).

Při podezření na **tubulární proteinurii** je třeba v moči kvantitativně stanovit některý z tubulárních proteinů, nejlépe  $\alpha_1$ -mikroglobulin nebo cystatin C.

## 8. Literatura

Brinkman, J.W., Bakker, S.J.L., Gansevoort, R.T.: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome?. *Kidney Int.*, 2004, 66 (Suppl. 92): S69 – S72.

Comper, W.D., Jerums, O., Osicka, T.M.: Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin. Biochem.*, 2004, 37: 105 – 111.

Comper, W.D., Osicka, T.M.: Albumin-like material in urine. *Kidney Int.*, 2004, 66 (Suppl. 92): S65 – S66.

Engliš, M.: Současné možnosti vyšetřování proteinurií. In: Viklický, O., Dusilová-Sulková, S., Rychlík, I.: *Vyšetřovací metody v nefrologii a jejich klinická aplikace*, s. 13 – 15. Tigis, Praha, 2007.

Fliser, D., Novak, J., Thongboonkerd, V., et al.: Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007, 18: 1057 – 1071.

Friedecký, B. et al.: *Laboratorní diagnostika a sledování stavu diabetes mellitus. Klinická biochemie a metabolismus*, 2006, 14: 54 – 65.

Guder, W., Hofmann, W.G.: Differentiation of proteinuria and hematuria by single protein analysis in urine. *Clin. Biochem.* 1993, 26: 277 – 282.

- Hofmann, W.G., Rossmüller, B., Guder, W.G.: A new strategy for characterizing proteinuria and hematuria from a single pattern of defined proteins in urine. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1992, 30: 707 – 712.
- Ibsen, H., Olsen, M.H., Wachtell, K., et al.: Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension*, 2005, 45: 198 – 202.
- Ivandi, M., Hofmann, W., Guder, W.G.: The use of knowledge-based systems to improve medical knowledge about urine analysis; *Clin. Chim. Acta* 2000, 297: 251 – 260
- Julian, B.A., Suzuki, H., Suzuki, Y., et al.: Sources of urinary proteins and their analysis by urinary proteomics for the detection of biomarkers of disease. *Proteomics Clin. Appl.* 2009, 3, 1029 - 1043
- K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, classification, and stratification. *Am. J. Kidney Dis.*, 2002, 39: S1 – S266 (Suppl. 1)
- KDOQI Clinical Practice Guidelines and Clinical Practice Recommendations for Diabetes and Chronic Kidney Disease, *Am. J. Kidney Dis.*, 2007, 49: S1 – S180 (Suppl. 2).
- Keane, W.F., Eknoyan, G.: Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): A position paper of the National Kidney Foundation. *Am. J. Kidney Dis.*, 1999, 33: 1004 – 1010.
- Kouri, T., Fogazzi, G., Gant, V., et al.: European Urinalysis Guidelines. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2000, 60 (Suppl. 231): 1 – 96.
- Lamb, E.J., MacKenzie, F., Stevens, P.E.: How should proteinuria be detected and measured? *Ann. Clin. Biochem.*, 2009, 46: 205 – 217.
- McQueen, M.J., Gerstein, H.C., Pogue, J., et al.: 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: 889 – 896.
- Miller, G., Bruns, D.E., Hortin, G.L., et al.: Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin. Chem.*, 2009, 55: 24 – 38.
- Ohisa, N., Kanemitsu, K., Matsuki, R., et al.: Evaluation of hematuria using the urinary albumin-to-total-protein ratio to differentiate glomerular and nonglomerular bleeding. *Clin Exp. Nephrol.* 2007, 11: 61 – 65.
- Redon, J.: Measurement of albuminuria – what the nephrologist should know. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2006, 21: 573 – 576.
- Rodby, R.A., Rohde, R.D., Sharon, Z., et al.: The urine protein to creatinine ratio as a predictor of 24-hour urine protein excretion in type 1 diabetic patients with nephropathy. The Collaborative Study Group. *Am. J. Kidney Dis.*, 1995, 26: 904 – 909.
- Russo, L.M., Comper, W.D., Osicka, T.M.: Mechanism of albuminuria associated with cardiovascular disease and kidney disease. *Kidney Int.*, 2004, 66 (Suppl. 92): S67 – S68.
- Shaikh, A., Segmiller, J.C., Borland, T.M., et al.: Comparison between immunoturbidimetry, size-exclusion chromatography and LC-MS to quantify urinary albumin. *Clin. Chem.* 2008, 54: 1504 – 1510.
- Teplan, V.: *Praktická nefrologie*, Grada, Praha, 2. vydání, 2006, s. 34 – 38

Tesař, V., Vojtová, L., Zima, T.: Proteomika v diagnostice ledvin. *Klin. Biochem. Metab.* 2007, 15: 186 – 192.

Thomas, L.: *Clinical Laboratory Diagnostics*, TH Books, Frankfurt, 1998, S. 382 – 400

Thongboonkerd, V., McLeish, K.R., Arthur, J.M., Klein, J.B.: Proteomic analysis of human urinary proteins isolated by acetone precipitation or ultracentrifugation. *Kidney Int.*, 2002, 62: 1461 – 1469.

Wilson, D.M., Anderson, R.L.: Protein-osmolality ratio for the quantitative assessment of proteinuria from a random urinalysis sample. *Am. J. Clin. Pathol.*, 1993, 100: 419 – 424.

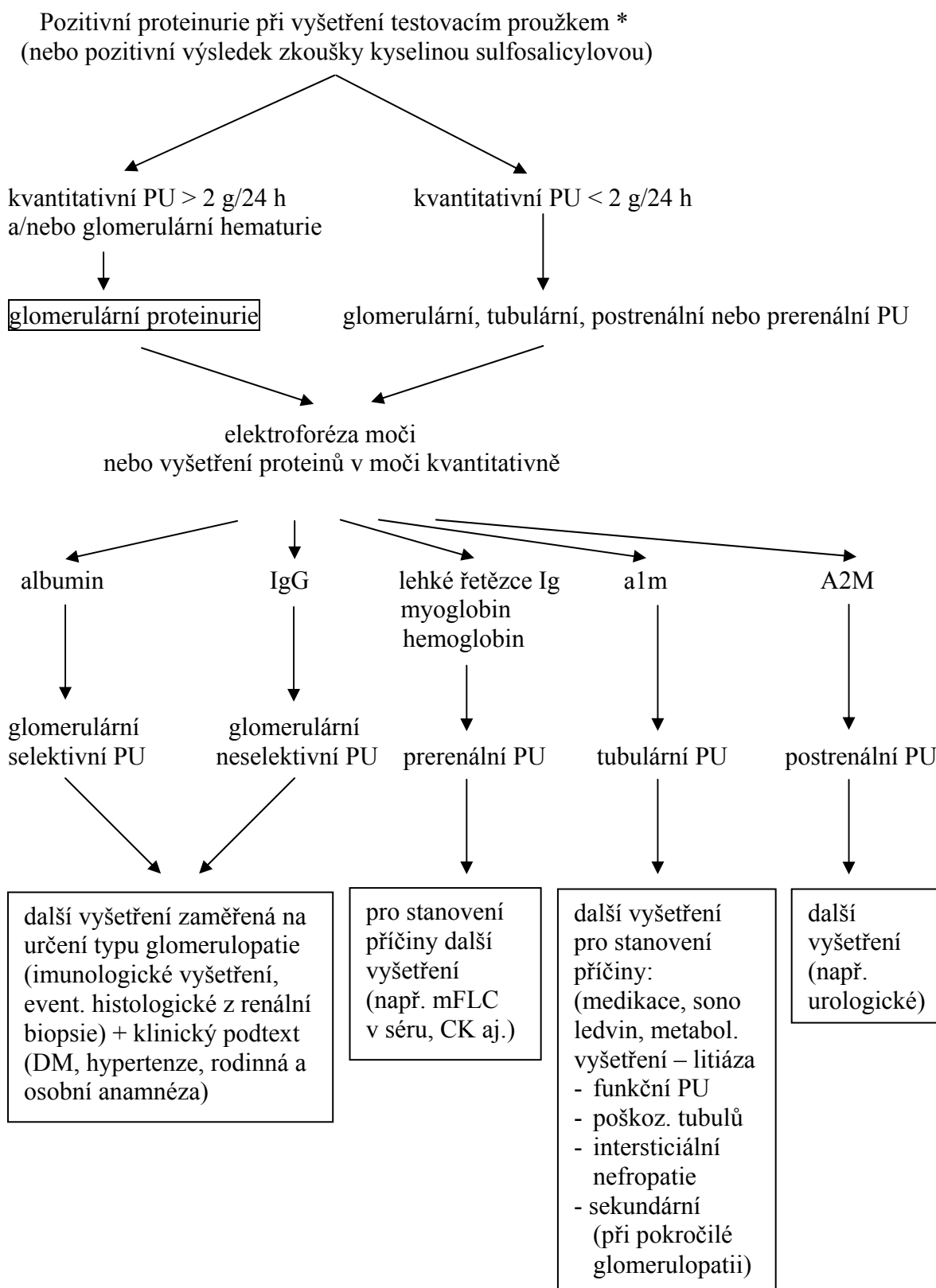
Žabka, J.: Diferenciální diagnostika proteinurie. In: Viklický, O., Dusilová-Sulková, S., Rychlík, I.: *Vyšetřovací metody v nefrologii a jejich klinická aplikace*, s. 17 – 22. Tigris, Praha, 2007.

doc. MUDr. Romana Ryšavá, CSc.  
předsedkyně ČNS

prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.  
předseda ČSKB ČLS JEP

V Praze dne 13.října 2010

**Obr. 1. Diagnostický postup u proteinurie (PU)**



\* některé stavy při prerenální nebo tubulární proteinurii nemusí být zachyceny testovacím proužkem