

32. Jakobs C, Michael T, Jaeger E, Jaeken J, Gibson KM. Further evaluation of Vigabatrin therapy in 4-hydroxybutyric aciduria. *Eur J Pediatr* 1992;151: 466-468.
33. Trettel F, Malaspina P, Jodice C, Novelletto A, Slaughter CA, Caudle D, Hinson DD et al, Human succinic semialdehyde dehydrogenase: molecular cloning and chromosomal localization *Adv Exp Med Biol* 1997; 414: 253-260.
34. Chambliss KL, Caudle DL, Hinson D, Moomaw CR, Slaughters CA, Jakobs C, Gibson KM. Molecular cloning of the mature NAD⁺ dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. *J Biol Chem* 1995; 270:461-467.
35. Chambliss KL, Caudle DL, Jakobs C, Jaeger E, Malaspina P, Novelletto A, Gibson KM. Localization and genomic structure of human succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and detection of an exon deletion in SSADH deficiency (4-hydroxybutyric aciduria). Abstract 143, 7th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Vienna May 21-25 1997.
36. Gibson KM, Nyhan WL, Jaeken J. Inborn errors of GABA metabolism. *BioEssays* 1986; 4: 24-27.
37. Scriver CR, Gibson KM, Disorders of β - and γ -amino acids in free and peptide-linked forms. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill (1995), 1349-1368.
38. Jakobs C, Jaeken J, Gibson KM. Inherited disorders of GABA metabolism, *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 704-715
39. Carchon HA, Jaeken J, Jansen E, Eggermont E. Reference values for free gamma-aminobutyric acid determined by ion-exchange chromatography and fluorescence detection in the cerebrospinal fluid of children. *Clin Chim Acta* 1991; 201: 83-88.
40. Kok RM, Howells DW, Heuvel CCM vd, Guérand WS, Thompson GN, Jakobs C. Stable isotope dilution analysis of GABA in CSF using simple solvent extraction and electron capture negative ion mass fragmentography. *J Inher Metab Dis* 1993; 16: 508-512.

Summary

Inherited disorders of GABA metabolism. Verhoeven NM, Gibson KM and Jakobs C. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 124-129.

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is an important inhibitory neurotransmitter, present in relatively high concentrations in the mammalian central nervous system. GABA acts on GABA A and GABA B receptors, resulting in a change in the transmembrane potential.

In both brain and extra-neuronal tissues, among which the pancreas and kidney, GABA plays a role in oxidative metabolism (1). GABA is mainly produced from glutamic acid in a reaction catalysed by glutamic acid decarboxylase (GAD). The catabolism of GABA involves sequential reactions catalysed by GABA transaminase (GABA-T), converting GABA into succinic semialdehyde (SSA) and succinic semialdehyde dehydrogenase, converting SSA into succinate. Succinate is further metabolised in the Krebs cycle. (See 2 for a review on GABA metabolism).

This review describes the inborn errors of GABA metabolism: pyridoxine dependent seizures (McKusick 26600), GABA-T deficiency (McKusick 137150; EC 2.6.1.19) and SSADH deficiency (McKusick 271980; EC 1.2.1.24).

Key words: GABA; pyridoxine dependent seizures; succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency; GABA transaminase deficiency; cerebrospinal fluid; diagnosis

Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 129-137

Screening op microalbuminurie: aanbevelingen voor urineverzameling, conservering en analyse

A. J. BAKKER

Maatregelen om complicaties bij diabetes mellitus te voorkomen of af te remmen, worden in toenemende mate beïnvloed door de uitkomst van laboratoriumbepalingen. Het aantonen van microalbuminurie is daarvan een belangrijke exponent die de laatste jaren flink aan populariteit heeft gewonnen. In dit overzicht zal kort worden ingegaan op de veranderingen bij diabetes mellitus, die leiden tot nefropathie en de daarmee samenhangende microalbuminurie, en aan de belangrijkste maatregelen, die het ontstaan van de complicaties kunnen afremmen. Vervolgens wordt aandacht geschonken aan de oorzaken van de grote intra-individuele variabiliteit, die de bepaling van microalbuminurie kenmerkt, en aan een aantal analytische aspecten, die de uitkomst van deze bepaling

kunnen beïnvloeden. Tot slot wordt stilgestaan bij de verschillende procedures voor het verzamelen en bewaren van urine voor de bepaling van deze licht verhoogde albumineconcentraties en de met de urineverzameling samenhangende wijze van rapportage.

Trefwoorden: Microalbuminurie; urineverzameling; diabetes mellitus, albumineconcentratie, albumine excretie snelheid; albumine-kreatinine ratio, intra-individuele variatie, bepalingmethoden, urineconservering; referentiewaarden

De belangrijkste complicaties bij diabetes mellitus (DM) zijn verlies van nierfunctie (nefropathie), gezichtsvermogen (retinopathie), atherosclerose (myocardinfarct en apoplexie) en zenuwbeschadiging (neuropathie). Van de patiënten met DM type I (insuline-afhankelijke diabetes mellitus: IDDM) krijgt 45% te maken met nefropathie; de incidentie hiervan neemt sterk toe vanaf het 10e jaar na het stellen van de diagnose (1-3). De progressie van het nierfunctie-

Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium Leeuwarden

Correspondentie: Dr. A.J. Bakker, Stichting Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 850, 8901 BR Leeuwarden.
Ingekomen: 08.10.97

verlies maakt, zonder behandeling, binnen 5 jaar nierfunctievervangende therapie (dialyse of transplantatie) noodzakelijk. In aanwezigheid van microalbuminurie, als vroegtijdige indicator voor verslechtering van nierfunctie (4-9) en verhoogd cardiovasculair risico (10-12), is de kans op nefropathie en cardiovasculaire ziekten respectievelijk 20 en 2,9 keer zo hoog als bij patiënten zonder microalbuminurie (9). Nadat intensivering van de behandeling - resulterend in een betere glycemische regulering (13-15) en/of bloed-drukverlaging (16) - de progressie van de microalbuminurie en nefropathie bleek te vertragen (17-19), screent men patiënten met IDDM routinematig op microalbuminurie. Omdat microalbuminurie zelden optreedt voor de puberteit of binnen 5 jaar na het begin van de ziekte, is daarna pas screening op microalbuminurie zinvol (20).

Bij patiënten met DM type II (niet-insuline-afhankelijke diabetes mellitus: NIDDM) ligt het begin van de ziekte 4-7 jaar voor de klinische diagnose; dit begin is dus niet goed vast te stellen (21, 22). Omdat deze patiënten vaak al bekend zijn met andere risicofactoren voor nefropathie, wordt de frequentie van nefropathie als gevolg van DM geschat op ca. 25% binnen 5-10 jaar na het stellen van de diagnose (23-26). Microalbuminurie blijkt bij deze patiënten eveneens geassocieerd te zijn met een verhoogde mortaliteit en morbiditeit ten gevolge van cardiovasculaire ziekten (relatief risico 4,0) en nierziekten, zelfs als de albumine excretie snelheid (AER) tussen 10 µg/min (bovengrens van referentiegebied) en 20 µg/min (ondergrens voor microalbuminurie) ligt (22, 27-37). Bij patiënten met NIDDM wordt de screening op microalbuminurie gestart vanaf het moment waarop de diagnose is gesteld (20). Onduidelijk is of interventies bij deze patiënten behalve de microalbuminurie, ook de prognose gunstig beïnvloeden.

Definitie

Tijdens de ontwikkeling van diabetische nefropathie neemt de uitscheiding van eiwit, met name albumine, in de urine toe naarmate de nierfunctie slechter wordt (38-40). Is de albumineconcentratie in urine >200 mg/l (komt overeen met AER van ca. 200 µg/min), dan is dit aantoonbaar met de teststrip voor eiwit in urine (albumine is de belangrijkste reactant) (41). Is de albumineconcentratie <200 mg/l - dit is alleen aantoonbaar met gevoelige immunochemische methoden - maar >20 mg/l (= AER van ca. 20 µg/min), dan spreken we van microalbuminurie (41, 42), hoewel deze term strikt genomen niet juist is (43). Microalbuminurie is daarmee gedefinieerd als de uitscheiding in urine van een verhoogde albumineconcentratie, die niet aantoonbaar is met een teststrip voor eiwit in urine.

Diabetische veranderingen leidend tot nefropathie

De factoren die bijdragen aan de ontwikkeling van nefropathie, waarvan de precieze pathogenese niet goed bekend is, omvatten naast hyperglycemie, hypertensie, dieet, hyperlipemie, geslacht en genetische predispositie (44). De samenhang bij DM tussen cardiovasculaire ziekten en nefropathie berust volgens de

Stenohypothese op het, door hyperglycemie, veranderd metabolisme van matrixbestanddelen (heparansulfaat-proteoglycaan) van de vaatwand (11, 26, 45, 46). Heparansulfaat-proteoglycaan heeft, als onderdeel van de basaalmembraan, invloed op de glomerulaire doorlaatbaarheid en speelt tevens een rol bij trombo-embolische processen en de verminderde klaring van triglyceriden en very low density lipoproteïnen (via binding aan lipoproteïnelypase). Verminderde synthese van heparansulfaat-proteoglycaan leidt tot toename van de glomerulaire doorlaatbaarheid en atherosclerotische complicaties.

Voordat bij patiënten met DM een nierinsufficiëntie ontstaat, is reeds verdikking van de glomerulaire basaalmembraan, toename van de albumine-excretie, de glomerulaire filtratiesnelheid en de niergrootte aantoonbaar (47-50). In gezonde nieren wordt passage van moleculen door de glomerulaire basaalmembraan beïnvloed door grootte, vorm, elektrische lading en transglomerulaire drukgradiënt (51-53). De tubulaire terugresorptie van eiwit (overwegend albumine) werkt op sub-maximale capaciteit. Door structuur- en ladingsveranderingen van de negatief geladen basaalmembraan zal de filtratie van plasma-eiwitten toenemen en leiden tot albuminurie (39). In het beginstadium van de diabetische nierziekte ontstaat hyperfiltratie (GFR is tot 40% hoger) met microalbuminurie tijdens lichamelijke inspanning (38-40, 54). Dit stadium wordt gevolgd door constante microalbuminurie met intacte tubulusfunctie en gaat vervolgens over in macroalbuminurie, waarbij uiteindelijk nierfunctievervangende therapie noodzakelijk is. In welk stadium de omkeerbaarheid van het nierfunctieverlies stopt, is onduidelijk.

Voor de preventie/vertraging van de progressie van de diabetische complicaties is het klinisch beleid gericht op (9, 15, 20, 44, 55):

- Een zo goed mogelijke instelling van het glucosemetabolisme, waardoor de glycosylering van eiwitten wordt beperkt. Hierdoor neemt de hyperfiltratie af en blijft de nierfunctie op peil. Als het stadium met microalbuminurie is gepasseerd, wordt de progressie naar nierinsufficiëntie niet verder vertraagd (13, 17).
- Verlaging (met ACE-remmers) van de hoog normale tot licht verhoogde bloeddruk die bij patiënten met DM vaak voorkomt, vermindert de hyperfiltratie en microalbuminurie (9, 56-58).
- Beperking van de eiwitname vermindert, ondanks een gering aantal studies, hyperfiltratie en microalbuminurie. Het mechanisme hierachter is echter onduidelijk. Evenmin is zeker of progressie van de nefropathie wordt vertraagd. Vermindering van nierschade lijkt ook te worden verkregen door dierlijk eiwit te vervangen door plantaardig eiwit (9, 21, 59, 60).

Intra-individuele variatie in de albumine uitscheiding

Behalve door regulering van de glucoseconcentratie wordt de albumine-excretie, als indicator van een verslechterende nierfunctie, beïnvloed door de volgende fysiologische factoren (21):

- Lichaamshouding. Omdat in liggende houding de albumine-excretie geringer is dan in staande houding, is de albumine-excretie in urine, die 's nachts wordt verzameld, lager dan in urine, die overdag wordt verzameld (48, 53, 54, 61-66).
- Lichamelijke inspanning. Bij gezonde proefpersonen neemt de albumine-excretie toe door maximale inspanning (64, 67-70) maar niet bij sub-maximale inspanning (63, 67, 71, 72). Bij patiënten (DM en hypertensie) daarentegen neemt de albumine-uitscheiding toe bij zowel maximale als sub-maximale inspanning, met name in de fase van hyperfiltratie als de basale albumine-excretie laag is (63, 67, 72-77). Deze inspanningsgerelateerde toename van de albumine-excretie wordt gebruikt als provocatie voor de screening op een verhoogd risico voor nefropathie bij patiënten met IDDM (63, 68, 72, 78). De albumine-excretie neemt na inspanning eveneens toe bij patiënten met NIDDM (76). Het effect van zo'n provocatie op de albumine-uitscheiding in 24-uurs urine is te verwaarlozen (64). Verbetering van de glucoseregulering blijkt, bij patiënten met IDDM, de toename van deze inspanningsgerelateerde albumine-excretie te corrigeren (79, 80).
- Bloeddruk. Behalve DM geeft ook hypertensie een toename van de albumine-excretie (81-85). Bij patiënten met een forse hypertensie is er meestal slechts een lichte microalbuminurie (86, 87), terwijl bij DM een forse microalbuminurie gepaard gaat met lichte hypertensie. Verlaging van de bloeddruk vermindert bij beide patiëntengroepen de microalbuminurie (82, 84, 88-91) en de inspanningsgerelateerde microalbuminurie (92).
- Geforceerde diurese doet de albumine-excretie eerst kortdurend stijgen om daarna te stabiliseren (93). Om bij een provocatietest te zorgen voor adequate diurese moet elke 20 min 250 ml water gedronken worden en als na ca. 1½ uur de excretiesnelheid gestabiliseerd is, start de inspanning en de urineverzameling.

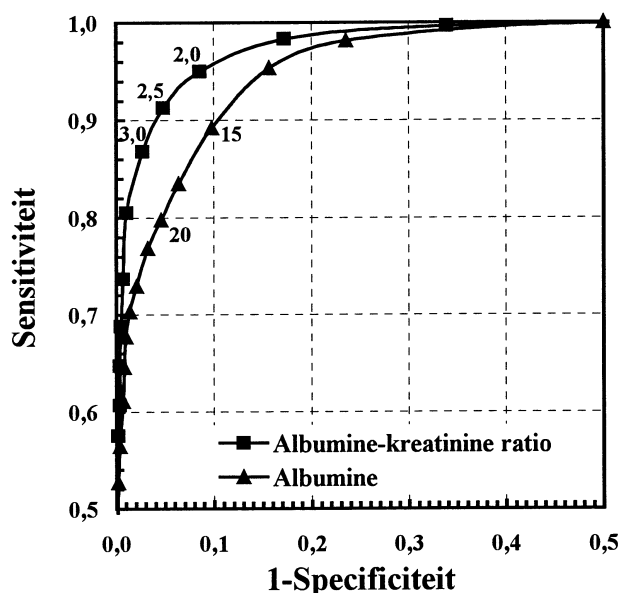
Door bovengenoemde factoren kunnen de verschillen in albumine-excretie tussen 24-uursurine, nachtelijke (ochtend) urine en overdag verzamelde urine en de grote intra-individuele variabiliteit worden verklaard (63, 94, 95). De gemiddelde intra-individuele variatie voor de albumine-excretie ligt in de verschillende studies op 30-50% (63, 96-105). Bij individuele proefpersonen daarentegen wordt een zeer grote spreiding met uitschieters tot boven de 100% gezien, met name in het belangrijke gebied van 10-30 µg/min. Deze variatie is ook aanwezig als er wordt gecorrigeerd voor de geconcentreerdheid van de urine via de albumine-kreatinine ratio (ACR). De consequentie is dat er een aanzienlijk verschil in albumine-excretie tussen twee opeenvolgende urines moet bestaan, wil het verschil significant zijn. Door Howey et al. (63) is dit berekend op 100% (diabeten 170%) voor een eerste ochtendurine, op 200% voor een 24-uurs urine en op 250% voor een willekeurige overdag verzamelde urine. Uit andere studies blijkt het verschil in variabiliteit tussen de verschillende verzamelprocedures echter kleiner te zijn, maar om een betrouwbare indruk te krijgen over de mate van microalbuminurie, dient men meerdere keren urine te verzamelen.

Andere oorzaken voor microalbuminurie

Naast de minder goede regulering van de DM en hypertensie, zijn er nog andere oorzaken voor het ontstaan van microalbuminurie. Afgezien van niet-DM gerelateerde nierziekten geven allerlei acute ziektebeelden, immuuncomplexziekten, cardiale insufficiëntie (decompensatio cordis), koortsende ziekten en uiteraard urineweginfecties aanleiding tot albuminurie (52, 106, 107). Daarnaast wordt microalbuminurie gebruikt tijdens de zwangerschap bij zowel diabeten als niet-diabeten voor het vroegtijdig opsporen van pre-eclampsie (108-113). Bij het screenen van patiënten met DM op microalbuminurie dient uiteraard één van deze andere oorzaken voor een verhoogde albumine-uitscheiding te worden uitgesloten.

Procedures voor de verzameling van urine voor microalbuminurie

Voor detectie van microalbuminurie werd oorspronkelijk 24-uurs (4, 114) of getimede nachtelijke urine gebruikt (4, 5, 7, 114). Aangezien microalbuminurie gedefinieerd is via berekening van de AER moet de tijdsduur van de urineverzameling geregistreerd worden. De nauwkeurigheid van deze timing is kritischer naarmate de verzameltijd korter is (30 min. op een 24-uursverzameling betekent een fout van 2% en op een getimede nachtelijke urine ca. 6%) (115). Een 24-uursurine verzamelen wordt door patiënten als zeer belastend ervaren, omdat grote verzamelvaten overdag moeten worden meegenomen. Deze urineverzameling wordt vaak uitgesteld tot het weekend of zelfs helemaal niet gedaan. Ook wordt regelmatig een niet volledige 24-uursurine ingeleverd, hetgeen onjuiste resultaten veroorzaakt. Om deze problemen met de verzameling van een 24-uursurine te voorkomen, zijn getimede nachtelijke urines gepropageerd. Hoewel met deze kortere verzameltijd het effect van lichamelijke inspanning en lichaamshouding wordt geëlimineerd, is de invloed van fouten bij de timing groter. Theoretisch zou de intra-individuele variatie kleiner moeten worden (96), maar in de praktijk blijkt dit niet het geval. Bij de derde manier om getimede urine te verzamelen voor screening op microalbuminurie, laat men overdag in het ziekenhuis urine verzamelen onder omstandigheden van geforceerde diurese, waarbij de patiënt in rust is. Hierbij is de timing zeer nauwkeurig uit te voeren, maar de patiënt moet nogal wat tijd in het ziekenhuis vertoeven, zodat deze methode ongeschikt is voor grote aantallen patiënten. Bovengenoemde problemen bij de verzameling van getimede urine, hebben geleid tot het gebruik van niet-getimede urinemonsters voor de screening op microalbuminurie. Zowel de eerste ochtendurine als de urine, geloosd bij aankomst op de polikliniek, zijn hiervoor getest. Urinemonsters, geloosd bij aankomst op de polikliniek, zijn weliswaar het minst belastend voor de patiënt, maar de albumine-excretie wordt wel beïnvloed door lichaamshouding en lichamelijke inspanning (bijv. tegen de wind in naar het ziekenhuis fietsen). Deze invloed wordt geëlimineerd door de patiënt een eerste (tweede) ochtendurine te laten meenemen. Beide procedures zijn voor de patiënt plezieriger dan een getimede urineverzameling.

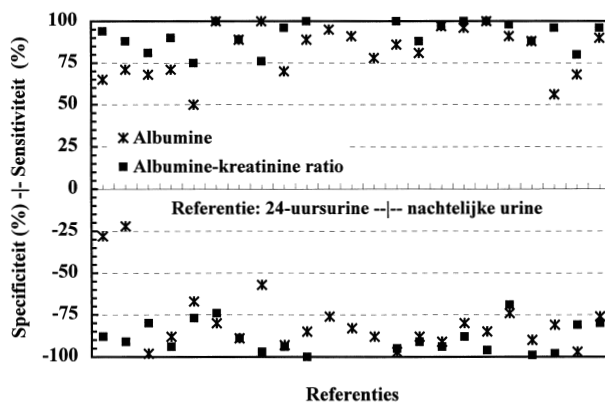


Figuur 1. Vergelijking van de ROC-curve voor de albumine concentratie en de albumine-kreatinine ratio in getimede nachtelijke urine (afkapping voor albumine excretie snelheid: 20 µg/min)

Bij gebruik van niet-getimede urine neemt men aan dat de albumineconcentratie een goede weerspiegeling is van de AER, maar er wordt niet gecorrigeerd voor variaties in de snelheid van urineproductie (116). Voor een efficiënte screening op microalbuminurie moet een relatief lage grenswaarde worden gehanteerd (gevolg: veel vals-positieve resultaten). Daarom is naar analogie van de schatting van de 24-uurs eiwitexcretie via de eiwit-kreatinine ratio (117) door verschillende onderzoekers de ACR voorgesteld als alternatief. Voor deze procedure zijn twee bepalingen nodig (kostenverhogend), terwijl de intra-individuele variatie (ca. 25%), de onnauwkeurigheid en de interferentiegevoeligheid van de Jaffé methode voor kreatinine (glucose en ketonen reageren met picrinezuur) een extra bijdrage leveren aan de totale onnauwkeurigheid (42, 118). Desondanks blijkt de intra-individuele variatie van de ACR en de albumineconcentratie in dezelfde orde van grootte te liggen als die van de AER (42). Uitgaande van het onderzoek van Howey et al. (63) zou correctie voor de "flow rate" via de ACR niet nodig zijn. Echter uit vele andere onderzoeken blijkt dat de ACR een betere sensitiviteit en specificiteit heeft dan de albumineconcentratie, hetgeen met resultaten uit het eigen laboratorium (n = 1696) geïllustreerd wordt in figuur 1.

Vergelijking van verschillende procedures voor verzameling van urine voor microalbuminurie

Hoewel bij wetenschappelijk onderzoek meting van de AER in een getimede 24-uurs of nachtelijke urine gebruikelijk is, blijkt in de dagelijkse praktijk de voorkeur uit te gaan naar het verzamelen van niet-getimede urineporties, waarin de albumineconcentratie of de ACR wordt gemeten. Welke correlatie bestaat tussen de albumineconcentratie of de ACR in niet-getimede urineporties en de AER, en welke tussen de verschillende AER procedures?



Figuur 2. Overzicht van de gepubliceerde sensitiviteiten en specificiteiten voor zowel de albumineconcentratie als de albumine-kreatinine ratio

- De correlatie tussen de AER berekend uit een 24-uurs, een nachtelijke of een getimede dagurine is goed, zoals blijkt uit de publicatie van Ellis et al. (119). Overdag blijkt de AER 25-50% hoger te zijn dan 's nachts (65, 66, 120). Ten opzichte van de AER uit een 24-uursurine, blijkt de AER uit een getimede dagurine een hoge sensitiviteit en specificiteit te scoren (65). De AER uit een getimede nachtelijke urine heeft een lagere sensitiviteit en hogere specificiteit (meer patiënten worden met een nachtelijke urine als normaal en met een 24-uursurine als microalbuminurisch geclassificeerd) (65, 66). De AER berekend uit een urine, verkregen na een geforceerde diurese overdag, scoort aanzienlijk slechter, waarbij veel resultaten als vals-positief worden aangemerkt (65). Dit wordt het meest gezien bij patiënten met lage AER (<20 µg/min). Hierbij rijst de vraag of deze resultaten inderdaad vals-positief zijn of dat de AER-resultaten uit een 24-uursurine, als vals-negatief moeten worden beschouwd. Immers deze, door geforceerde diurese, geprovoceerde microalbuminurie is mogelijk een eerste indicatie voor het ontstaan van nefropathie. Prospectief onderzoek om deze stelling te ondersteunen is echter nog niet gepubliceerd.
- De correlatie van de albumineconcentratie in een ochtendurine met de AER, berekend uit een 24-uurs of getimede nachtelijke urine, is over het algemeen goed; indien de albumineconcentratie gemeten is in een op een willekeurig tijdstip van de dag geproduceerd urinemonster, dan is de overeenstemming minder goed (65, 116, 121-132). Eigen ervaring met getimede nachtelijke urine: Albumine (mg/l) = 0,569xAER (µg/min) + 11,18; r = 0,8389; n = 1696. Beoordeling van de resultaten van de verschillende onderzoeken is lastig (133). Enerzijds worden de metingen soms in dezelfde en soms in verschillende urines gedaan. Anderzijds worden verschillende grenzen gebruikt om de onderzoekspopulatie op te splitsen; dit geldt voor zowel de AER (15, 20 en 30 µg/min) als de albumineconcentratie (10, 15, 17, 20, 26, 30 en 34 mg/l). Figuur 2 geeft een indruk van de voor de albumineconcentratie gepubliceerde sensitiviteiten en specificiteiten.

- De correlatie van de ACR met de AER is beter dan van de albumineconcentratie met de AER (42, 65, 116, 121-125, 127, 130-134). Eigen ervaring met getimede nachtelijke urine: $ACR \text{ (g/mol)} = 0,100 \times AER \text{ (}\mu\text{g/min)} + 1,29$; $r = 0,8945$; $n = 1696$. Ook hier is beoordeling van de resultaten van de verschillende onderzoeken lastig door genoemd verschil in onderzoeksopzet en de verschillende grenzen voor het opsplitsen van de populatie voor de AER (15, 20 en 30 $\mu\text{g/min}$) en de ACR (1,7, 2,0, 2,2, 2,5, 2,6, 3,0, 3,4, 3,5, 4,5 en 8,0 g/mol). Bovendien is de variabiliteit van de kreatinine-uitscheiding een complicerende factor (42). Desondanks is de overeenstemming van de ACR met de AER beter dan van de albumineconcentratie met de AER. Ook is de sensitiviteit en specificiteit van de ACR ten opzichte van de AER, gemeten in een getimede nachtelijke urine, beter dan wanneer beide in een 24-uursurine zijn gemeten. Figuur 2 geeft ook een indruk van de voor de ACR gepubliceerde sensitiviteiten en specificiteiten.

In de dagelijkse praktijk blijkt screening op microalbuminurie via de nachtelijke AER regelmatig problemen te geven, door niet of onjuist verstrekte gegevens omtrent de timing van de urineverzameling. Meting van de ACR in niet-getimede urine heeft de voorkeur boven meting van de albumineconcentratie (geen correctie voor fluctuaties in urineflowrate). Zowel eigen ervaring (figuur 1) als gepubliceerde resultaten (figuur 2) laten zien dat de specificiteit en sensitiviteit voor de ACR beter zijn dan voor de albumineconcentratie.

Bij de beoordeling of, voor de screening op microalbuminurie, meting van de ACR in een eerste ochtendurine of een overdag geloosde urine de voorkeur verdient, is enerzijds de invloed van lichamelijke activiteit van belang. Op theoretische gronden zou de eerste ochtendurine de voorkeur verdienen, omdat de variabiliteit tijdens de nacht kleiner zou zijn dan overdag wegens het ontbreken van lichamelijke activiteit. Dit blijkt echter niet uit de intra-individuele variabiliteit van de verschillende verzamelprocedures. Anderzijds zou een overdag verzamelde urine de voorkeur kunnen genieten, omdat de hogere albumine-excretie overdag eerder de ontwikkeling van nefropathie kan voorspellen. Zolang dit echter niet in prospectieve studies is aangetoond, wordt geadviseerd om via de ACR, gemeten in een eerste ochtendurine, te screenen op microalbuminurie, omdat in ochtendurine de beste correlatie wordt gevonden met de AER.

Referentiewaarden

De gepubliceerde referentiewaarden voor de AER vertonen weinig verschil. Oorzaken voor verschil liggen in de periode van de dag, waarin de urineverzameling heeft plaatsgevonden (nachtelijke waarden zijn 25-50% lager dan overdag door invloed van lichaamshouding en lichamelijke activiteit) en van de wijze van kalibratie (zie verderop). Uitgaande van nachtelijke urine wordt voor de AER een bovengrens van het referentiegebied van ca. 10 $\mu\text{g/min}$ gevonden;

voor een 24-uursurine is dit tussen 10-15 $\mu\text{g/min}$ (37, 102, 135-141). Bij een gemiddelde intra-individuele variabiliteit is er dan sprake van microalbuminurie boven 20 $\mu\text{g/min}$ (30 mg/24-uur); deze grens wordt in de praktijk meestal ook gebruikt; incidenteel wordt een andere grens (15 of 30 $\mu\text{g/min}$) gehanteerd. Overigens betekent dit niet, dat patiënten met een microalbuminurie van 10-20 $\mu\text{g/min}$ geen verhoogd risico hebben en niet intensiever behandeld zouden moeten worden (21, 27). Voor de ACR is, uitgaande van een nachtelijke of eerste ochtendurine, de bovengrens van het referentiegebied ca. 1,0 g/mol kreatinine (137-139), m.a.w. op basis van de intra-individuele variabiliteit spreken we van microalbuminurie als de ACR >2,0 g/mol kreatinine is. Omdat vrouwen een lagere spiermassa en kreatinine-excretie hebben, is de bovengrens van het referentiegebied bij vrouwen hoger dan bij mannen (42, 142). Op basis van ROC-curve analyse van eigen resultaten wordt 2,0 g/mol kreatinine voor mannen en 2,5 g/mol kreatinine voor vrouwen als grenswaarde voor microalbuminurie gebruikt. De algemene aanbeveling van de WHO is 2,5 g/mol (143). Voor de albumineconcentratie tenslotte geldt meestal een grens van 20 mg/l waarboven van microalbuminurie sprake is. Leeftijds- en geslachtsafhankelijkheid is hier niet aanwezig (141).

Stabiliteit/bewaarcondities van/voor microalbumine in urine

Voor het bewaren van urinemonsters voor de screening op microalbuminurie is uit de literatuur geen eenduidige procedure af te leiden. Bij 4°C kunnen urinemonsters zeker 1-2 weken worden bewaard zonder dat het resultaat van de albuminebepaling in urine veranderd (101, 144-156). Toevoegen van een conserveermiddel is niet vereist. Langer bewaren van urinemonsters bij 4°C (tot 8 weken) lijkt mogelijk (153). Ook bij 20°C kunnen urinemonsters 1 week bewaard worden zonder albumineverlies (144, 156). Voor het bij -20°C bewaren van urinemonsters is enerzijds beschreven dat de albumineconcentratie in urine na ontdooien lager is dan in verse monsters, waarbij verschillen tot 50-100 mg/l zijn gevonden (145, 147, 153, 157-159). Echter andere auteurs vonden dergelijk albumineverlies niet (101, 144, 146, 151, 152, 154, 160-162). Over de oorzaak voor dit al dan niet optredende albumineverlies bij ingevroren urinemonsters is in Clinical Chemistry gediscussieerd (163-166), maar ook na recente publicaties is dit probleem nog steeds niet voldoende opgehelderd (167-169).

Als mogelijke oorzaken voor deze daling van albumine in de urine door invriezen bij -20°C worden genoemd:

- Het effect van de urine pH op de albumineconcentratie na invriezen is controversieel. Er is beschreven dat de albumineprecipitatie samenhangt met de urine pH en dat neutraliseren van de pH deze precipitatie kan voorkomen (147, 148). Ook is beschreven dat albumineverlies optreedt na invriezen van urinemonsters met een neutrale pH (149). Verder bleek dat de pH van urines met en zonder precipitaat niet significant verschilt (156) en dat de urine pH door invriezen niet significant verandert

- (150). Over het pH-traject van 5-8 blijkt de albumineconcentratie na invriezen niet af te nemen, als de pH van urine voor invriezen werd ingesteld; alleen bij instellen op pH = 4, werd na invriezen een lagere albumineconcentratie gevonden (101).
- Adsorptie van albumine aan zoutneerslagen wordt, in samenhang met de pH-effecten, gezien als oorzaak voor de albumineverlaging na invriezen (147, 170). Albumine blijkt uit het, door invriezen ontstane, precipitaat weer opgelost te kunnen worden in alkalische buffer (170). Omdat dit met name is geconstateerd in urine met uraatneerslagen, wordt uraat als oorzakelijke factor aangemerkt voor het albumineverlies na invriezen (156). Verwijdering van het precipitaat door centrifugatie of filtratie, zowel voor als na het invriezen, blijkt geen invloed op het albumineverlies te hebben (145, 157, 160). Hetzelfde geldt ook voor het goed resuspenden van het precipitaat na ontdooien.
 - Adsorptie aan de wand van glazen of polystyreen buizen, waarin het materiaal wordt bewaard, is ook geopperd als mogelijke oorzaak voor albumineverlies (171). Dit is bij kamertemperatuur wel aangetoond voor waterige standaarden (138), doch voor urine is slechts minimale adsorptie van albumine aangetoond in polystyreen buizen en niet in glazen buizen (138, 150). Het soort materiaal waarvan de buizen zijn gemaakt, waarin de urine werd ingevroren (getest zijn: glas, polystyreen en polypropyleen), heeft geen enkele invloed op het albumineverlies na invriezen (144, 168). Adsorptie van albumine aan de wand van de urineverzamelcontainers lijkt evenmin op te treden (172, 173).
 - Het effect van bacteriële verontreiniging van de urine op de albumineconcentratie is nauwelijks onderzocht. Desondanks wordt gesuggereerd dat geen bacterieel gecontamineerde urine gebruikt mag worden, omdat albumine door bacteriële proteases gehydrolyseerd zou worden (162, 174). De albumineconcentratie wordt in-vitro niet wezenlijk door bacteriële verontreiniging (14 dagen bij kamertemperatuur) beïnvloed (175). In hoeverre het invriezen van bacterieel verontreinigde urine albumineverlies veroorzaakt, is onduidelijk. In vivo daarentegen doet bacteriurie de albumineexcretie toenemen en wordt beschouwd als oorzaak voor voorbijgaande toename hiervan (176, 177).
 - De periode, gedurende welke een urine is ingevroren, lijkt direct invloed te hebben op het albumineverlies na invriezen. Het albumineverlies is groter naarmate de urine langer ingevroren is geweest, (156, 157, 169).

Het albumineverlies, nadat een urine ingevroren is bewaard, blijkt dus niet in elk monster op te treden (156, 169), is variabel (157) en wordt beïnvloed door de duur (getest is tot 2 jaar bij -20°C) van het invriezen (156-158). Er is geen relatie met de gebruikte analysemethodiek. Het verlies treedt overwegend op in monsters met een lage albumineconcentratie (<30 mg/l), terwijl bij een hogere concentratie de afname nauwelijks wordt gezien (144, 156, 159). Ook ten

aanzien van dit punt is de literatuur echter niet eensluidend (157). Herhaald vriezen/ontdooien heeft geen additioneel verlagend effect (101, 144, 151, 174). Gelet op deze tegenstrijdige onderzoeksresultaten, is het niet aan te bevelen urine voor langere tijd in te vriezen bij -20°C.

Het bewaren van urine bij -40°C (144), -70°C (158) en -80°C (167) is veel minder uitgebreid bestudeerd; toch geven deze spaarzame studies aan dat invriezen bij deze temperaturen niet tot albumineverlies leidt. Samenvattend wordt geconcludeerd dat urinemonsters tussen lozing en analyse het beste kunnen worden bewaard bij 4°C gedurende maximaal 2 weken en bij een temperatuur beneden -30°C, als de urine langer dan 2 weken moet worden bewaard.

Analysemethoden

Met analysemethoden, die voor het aantonen van microalbuminurie worden gebruikt, dient een albumineconcentratie van 1-5 mg/l gedetecteerd te kunnen worden. Omdat de concentratierange voor microalbuminurie tot ca. 250-300 mg/l reikt, moet deze zonder additionele verdunningen gemeten kunnen worden. Hogere albumineconcentraties kunnen echter ook voorkomen, zodat maatregelen getroffen moeten worden om deze extreem hoge concentraties te signaleren. De analysemethoden voor albumine in urine worden in drie categorieën onderverdeeld:

- Varianten van kwantitatieve immunologische methoden. De gelabelde immunoassays die worden gebruikt zijn o. a. radioimmunoassays (150, 151, 174, 178-180), enzymimmunoassays (153, 181-188), fluoroimmunoassays (151, 189, 190) en chemiluminescentieimmunoassays (191). Ze vertonen een groot verschil in complexiteit, hebben veelal een minimum doorlooptijd van ca. 2 uur, terwijl iedere run een eigen standaard of standaardreeks nodig heeft. De gevoeligheid is meestal dermate groot dat urinemonsters vooraf verdund moeten worden, hoewel modificaties het soms mogelijk maken onverdunde urine te gebruiken. Additionele verdunningen zijn vaak nodig om de gehele concentratierange van 1-250 mg/l albumine te overbruggen. Mechanisatie vereist een gespecialiseerde analyzer. De gerapporteerde tussen-run variatie is 2,3-9,1% voor de radioimmunoassay, 5,2-22% voor de enzymimmunoassay, 4,5-9,8% voor de fluoroimmunoassay en 5,0-15,0% voor de chemiluminescentieimmunoassay.

De niet-gelabelde immunoassays omvatten de immunonefelometrie (102, 137, 192, 193) en immunoturbidimetrie (98, 138, 154, 194, 195). De detectielimiet van 1-5 mg/l is voldoende om albumine in onverdunde urine te meten. Mechanisatie is goed mogelijk, zodat snelle analyse van grotere series haalbaar is. De gerapporteerde tussen-run variatie is 2,1-7% voor immunonefelometrie en 1,9-13,0% voor immunoturbidimetrie; de laatste kan op routine-klinische-chemie analyzers worden uitgevoerd en verdient uit logistiek oogpunt de voorkeur (geldt met name voor ACR's). Door de stabiliteit van de standaardcurve hoeft niet bij iedere run gekalibreerd te worden. Ook kan een monsterblanco

worden gemeten. Één van de potentiële nadelen is het fenomeen "antigeenovermaat", waardoor macroalbuminurie vals te lage uitslagen veroorzaakt (196). Dit probleem is met de moderne analyzers te ondervangen door een controle op antigeenovermaat uit te voeren, waarbij een "fysieke" antigeenovermaat detectie (= toevoegen van extra antigeen na afloop van de feitelijke reactie) de voorkeur verdient, omdat rekenkundige procedures regelmatig ten onrechte alarmeren bij lage antigeenconcentraties. Andere mogelijkheden om dit antigeenovermaat probleem te omzeilen of te detecteren, zijn het gebruik van een aanzienlijk grotere hoeveelheid antilichaam (uitbreiding meetbereik; vergt onnodig veel duur antiserum) of het onderzoeken van urine met de teststrip voor totaal eiwit (extra handeling). Het gebruik van latex-gemedieerde turbidimetrie vergroot de gevoeligheid (197-200) en elimineert het antigeenovermaat probleem, omdat het signaal bij antigeenovermaat dat van de hoogste standaard overtreft. De gerapporteerde tussen-run variatie bij latex-gemedieerde turbidimetrie ligt in dezelfde orde van grootte als van de gewone turbidimetrie. Radiale immunodiffusie is als niet-gelabelde immunoassay betrouwbaar en goedkoop, maar kan niet gemechaniseerd worden en is dus te arbeidsintensief (201, 202).

Onderlinge vergelijking van de verschillende methoden geeft een uitstekende correlatie (101, 201, 203). De interpretatie van de resultaten is equivalent, zodat een methodekeuze primair kan worden ingegeven door de mogelijkheden binnen een laboratorium. Gezien de logistieke voordelen betekent dit dat meestal immunoturbidimetrie wordt gekozen.

- Kleurbindingsmethoden. Hiervoor worden behalve de voor serumalbumine gebruikte kleurstof broomcresolgroen (BCG) (204), ook broomfenolblauw (BFB) (205-207), coomassiebriljantblauw (CBB) (208, 209) en pyrogallolrood (PGR) (210) gebruikt. Deze kleurstoffen meten totaal eiwit (CBB, PGR), zijn niet-specifiek (interferentie door andere eiwitten en andere urinebestanddelen; BCG, BFB) (207) of zijn niet gevoelig genoeg (BFB en BCG). Deze effecten spelen met name in het gebied van 15-30 mg/l (162). Voor zover de gevoeligheid toereikend lijkt (BFB), wordt de analyse gecompliceerd door een gelfiltratiestap, waardoor deze methode niet geschikt is voor grotere series (205). Kleurbindingsmethoden zijn derhalve niet geschikt voor screening op microalbuminurie. De enige uitzondering op deze regel lijkt de fluorescerende kleurstof albumineblauw 580 (211).
- Semi-kwantitatieve immunochemische methoden, waarvoor geen apparatuur of complex geheel aan handelingen nodig zijn, worden als snelst voor de screening op microalbuminurie gebruikt, met name in de huisartsenpraktijk, waar de meeste patiënten onder controle zijn. Hierbij wordt gebruik gemaakt van immunologische principes, o.a. latex-gemedieerde agglutinatie (212-216) en immunochromatografie (217-224), en van kleurbindingsmethoden met broomfenolblauw (223, 225-227). De kleurbindingsmethoden zijn aspectief, soms

moelijk te beoordelen en geven variabele resultaten met veel vals-positieve uitslagen (161, 203, 207, 228,). De latexagglutinatiemethoden zijn bewerkelijk (verschillende reagentia, timing) en, onder niet-optimale omstandigheden door minder goed getraind personeel, moeilijk te beoordelen (229). Een semi-kwantitatieve immunochemische teststrip kent deze nadelen niet (221). De gevoeligheid van deze semi-kwantitatieve methoden, die met verse urine moeten worden uitgevoerd, is ca. 10-15 mg/l (221). Omdat de albumineconcentratie wordt gemeten, zijn ze niet geschikt om microalbuminurie in sterk verdunde urine aan te tonen. De specificiteit en sensitiviteit van de snelsten (afgemeten t.o.v. de albumineconcentratie) schommelt rond de 90% resp. 85%. Deze sensitiviteit is aan de lage kant; immers 15% van de patiënten met microalbuminurie wordt gemist en ten onrechte wordt hen aanscherping van de behandeling onthouden. De sensitiviteit verslechtert verder (tot ca. 50%) als de resultaten t.o.v. de AER worden afgemeten (216).

Ondanks de goede reproduceerbaarheid van de verschillende methoden en de goede correlatie tussen de methodieken, blijkt de interlaboratorium vergelijkbaarheid van de microalbumine bepaling slecht. Een onderzoek door Mueller (230) toonde een aanzienlijk verschil in de gemeten albumineconcentratie voor twee rondgestuurde monsters (range van de gemiddelde concentratie: 7,4-18,3 en 12,8-35,4 mg/l). Er is geen reden te veronderstellen dat deze variatie in ons land kleiner is (in regio noord is voor één urinecontrole een range van 60-112 mg/l voor het laboratoriumgemiddelde gevonden). De onlangs gerealiseerde SKZL urine-enquête met (micro)albumine is dan ook hard nodig. Ook zijn aanbevelingen voor kalibratieprocedure en materiaal zinvol.

Wijze van kalibratie

Voor kalibratie kan gelyofiliseerd gezuiverd humaan albumine of vloeibaar humaan albumine worden gebruikt. Tevens kan een humaan kalibratieserum na adequate verdunning worden gebruikt. Afhankelijk van de procedure kunnen er systematische verschillen optreden. Bij gebruik van een kalibratieserum is de albumineconcentratie door de leverancier vastgesteld; controle hierop is lastig. Gelyofiliseerd gezuiverd humaan albumine heeft het risico dat na reconstitutie albumine deels in polymere (dimere) vorm oplost, waardoor een deel van de antigene determinanten wordt gemaskeerd (231-233). Soortgelijke polymere vormen van albumine zijn echter ook in urine beschreven (234, 235). Wegens de variabele hoeveelheid water in gelyofiliseerde albuminepreparaten wordt de albumineconcentratie na reconstitutie vastgesteld door de absorptie bij 280 nm te meten (1 g/l albumine opgelost in 0,15 mol/l NaCl of in 0,02 mol/l fosfaatbuffer heeft een absorptie van 0,54). Afgevoegen en berekende albumineconcentratie kunnen 5-10% van elkaar verschillen (139, 151).

De bereidingswijze van de ijklijn kan ook leiden tot verschil in resultaten. Het verdunnen van een kalibra-

tor in uitsluitend buffer of fysiologisch zout kan albumineverlies met zich mee brengen, doordat bij lage eiwitconcentraties adsorptie van eiwitten plaatsvindt aan de wand van de buizen waarin wordt verdund. Deze adsorptie wordt voorkomen door Triton X-100 (138), gelatine (139, 236) of BSA (236-238) toe te voegen aan de verdunningsvloeistof. Glas of polystyreen maakt hierbij geen verschil (138). Bij gebruik van BSA kan, afhankelijk van de specificiteit van het antiserum, soms kruisreactiviteit optreden (240). Ongeacht welk detergens/eiwit gebruikt wordt ter preventie van deze adsorptie, het dient altijd getest te worden om interferentie in de bepalingsmethode uit te sluiten. Als voorbeeld hiervoor dient gelatine, dat in immunoturbidimetrie wel en in een radioimmunoassay niet de antigeen-antilichaam-reactie remt (139, 236). De stabiliteit van standaarden bereid uit humaan albuminepoeder en opgelost in fosfaat gebufferd fysiologisch zout met 0,1% Triton X-100 (138), blijkt uit eigen ervaring bij 4°C gedurende langere tijd (minimaal 1/2 jaar) stabiel te zijn.

Aanbevelingen

Uit het voorgaande overzicht zijn een aantal conclusies getrokken, die in de onderstaande aanbevelingen worden samengevat:

- *Wie*: Patiënten met IDDM worden gescreend vanaf de puberteit of na 5 jaar nadat de diagnose is gesteld. Patiënten met NIDDM worden gescreend vanaf het moment waarop de diagnose is gesteld.
- *Frequentie*: Screening op microalbuminurie wordt jaarlijks gedaan.
- *Hoe*: Gelet op de belasting voor de patiënt en de problemen met de timing, dient de urineverzameling zo eenvoudig mogelijk te zijn. Tevens wordt er rekening gehouden met de geconcentreerdheid van de urine. Er wordt daarom bij voorkeur gescreend via de ACR. Zolang niet is aangetoond dat de invloed van lichamelijke inspanning overdag leidt tot het eerder opsporen van risicopatiënten, verdient de eerste ochtendurine de voorkeur voor de screening op microalbuminurie. Kortdurende hyperglycemie, urineweginfecties, koortsende ziekten, etc. gaan gepaard met een voorbijgaande verhoging van de microalbuminurie; daarom dient de screening op microalbuminurie te geschieden, als de patiënt metabool stabiel is.
- *Bewaren urine*: Urine kan tussen verzameling en analyse het beste worden bewaard bij 4°C gedurende maximaal 2 weken. Moet urine langer worden bewaard, dan dient de urine bij -30°C of lager ingevroren te worden. Toevoegen van een conserveermiddel is niet noodzakelijk.
- *Analyse*: Een kwantitatieve immunochemische methode (meetbereik: 1-250 mg/l), die uitgevoerd kan worden met een analyzer voor routine klinische chemie heeft de voorkeur boven kleurbindingsmethoden en semi-kwantitatieve methoden. Omdat albumineconcentraties >250 mg/l kunnen voorkomen, moet een effectief systeem voor detectie van antigeenovermaat in de analyseprocedure worden ingebouwd. Een "fysieke" antigeenovermaat detectie heeft de voorkeur boven een reken-

kundige procedure. Eventueel kan een test voor totaal eiwit in urine (bijv. de teststrip voor eiwit in urine) worden gebruikt. Indien om redenen van analyse/rapportage snelheid gekozen wordt voor een semi-kwantitatieve test heeft een immunochemisch testprincipe de voorkeur.

- *Kalibratie*: Bij het maken van ijklijnen dient men rekening te houden met de problemen die kunnen optreden als oplossingen met lage eiwitconcentraties worden verdund. Adsorptie aan de wand van buizen kan albumineverlies veroorzaken, zodat foutieve concentraties worden gemeten. Maatregelen ter preventie van dit verlies mogen geen invloed hebben op de gebruikte bepalingsmethodiek. Het gebruik van een landelijke kalibrator heeft de voorkeur.
- *Referentiewaarden*: Voor diagnostiek van microalbuminurie zijn niet de referentiewaarden van belang, maar de grenswaarde waarboven we van microalbuminurie spreken. Bij mannen spreken we van microalbuminurie als de ACR >2,0 g/mol is en bij vrouwen als de ACR >2,5 g/mol is. In geval van de albumineconcentratie is er microalbuminurie als de concentratie >20 mg/l is en in geval van de AER als deze >20 µg/min is.
- *Vervolgonderzoek*: Indien de screening op microalbuminurie positief is, dan dient in een periode van 3 maand de ACR 2 keer te worden herhaald. Gelet op de grote intra-individuele variabiliteit (ook als de patiënt metabool stabiel is), kan alleen op deze manier een goede indruk worden verkregen over de ernst van de microalbuminurie. Ook bij deze herhalingen kan de ACR worden gebruikt. Het effect van intensivering van de therapie kan ook met de ACR worden beoordeeld, waarbij de frequentie afhankelijk is van de ingestelde therapie.

Dr. G.A. van den Berg en Drs. R.F.M. Oude Elferink, klinisch chemici, en Dr. L.J.M. de Heide, internist, ben ik zeer erkentelijk voor hun commentaar en het kritisch doorlezen van het manuscript.

Literatuur

Een volledige literatuurlijst is bij de auteur te verkrijgen. Enkele belangrijke referenties worden hieronder weergegeven

9. Viberti GC, Yip-Messent J, Morocutti A. Diabetic nephropathy: future avenue (Review). *Diabetes Care* 1992; 15: 1216-1225.
11. Deckert T, Kofoed-Enevoldsen A, Nørgaard K, Borch-Johnsen K, Feldt-Rasmussen B, Jensen T. Microalbuminuria: implications for micro- and macrovascular disease. *Diabetes Care* 1992; 15: 1181-1191.
15. The Diabetes Control and Complications Trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
20. American Diabetes Association. Diabetic Nephropathy (Position statement). *Diabetes Care* 1997; 20 (Suppl.1): s24-s27.
21. Abbott KC, Sanders LR, Bakris GL. Microalbuminuria in non-insulin-dependent diabetes mellitus (Review). *Arch Intern Med* 1994; 154: 146-153.
22. Alzaid AA. Microalbuminuria in patients with NIDDM: an overview (Review). *Diabetes Care* 1996; 19: 79-89.

39. Viberti GC, Keen H. The patterns of proteinuria in diabetes mellitus: relevance to pathogenesis and prevention of diabetic nephropathy (Review). *Diabetes* 1984; 33: 686-692.
42. Mogensen CE, Vestbo E, Poulsen PL, et al. Microalbuminuria and potential confounders: a review and some observations on variability of urinary albumin excretion. *Diabetes Care* 1995; 18: 572-581.
44. Carella MJ, Gossain VV, Rovner DR. Early diabetic nephropathy (Review). *Arch Intern Med* 1994; 154: 625-629.
45. Deckert T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen T, Kofoed-Enevoldsen A. Albuminuria reflects widespread vascular damage: the Steno hypothesis (Review). *Diabetologia* 1989; 32: 219-226.
52. Waller KV, Ward KM, Mahan JD, Wismatt DK. Current concepts in proteinuria (Review). *Clin Chem* 1989; 35: 755-765.
53. Wardle EN. Diabetic nephropathy (Review). *Nephron* 1987; 45 :177-181.
63. Howey JEA, Browning MCK, Fraser CG. Selecting the optimum specimen for assessing slight albuminuria and a strategy for clinical investigation: novel uses of data on biological variation. *Clin Chem* 1987; 33: 2034-2038.
115. Hutchison AS, Paterson KR. Collecting urine for microalbumin assay (Review). *Diabetic Med* 1988; 5: 527-532.
121. Gatling W, Knight C, Mullee MA, Hill RD. Microalbuminuria in diabetes: a population study of the prevalence and an assessment of three screening tests. *Diabetic Medicine* 1988; 5: 343-347.
132. Zelmanovitz T, Gross JL, Oliveira JR, Paggi A, Tatsch M, Azevedo MJ. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as screening test for diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 1997; 20: 516-519.
133. Marshall S. Screening for microalbuminuria: which measurement? *Diabetic Med* 1991; 8: 706-711.
139. Rowe DJF, Dawnay A, Watts GF. Microalbuminuria in diabetes mellitus: review and recommendations for the measurement of albumin in urine (Review). *Ann Clin Biochem* 1990; 27: 297-312.
230. Mueller PW, MacNell ML, Smith SJ, Miller DT. Interlaboratory comparison of the measurement of albumin in urine. *Clin Chem* 1991; 37: 191-195.

Summary

Screening for microalbuminuria: recommendations for collection, preservation of urine and analysis. Bakker AJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1998; 23: 129-137.

Measures preventing or postponing diabetic complications are increasingly based on the results of laboratory assays. The analysis of microalbuminuria, which became increasingly popular in recent years, is an important example of such an assay. In this review, I briefly discuss the changes in diabetes mellitus causing nephropathy and the concomitant microalbuminuria. Thereafter, the most important measures available for preventing or postponing these complications are considered, followed by the reasons for the large intra-individual variability of microalbuminuria. Furthermore, the pros and cons of the quantitative and semi-quantitative methods of analysis and the various ways of calibrating the measurement of microalbuminuria are discussed. After comparing the various methods of collecting urine and the methods of preserving urine until analysis, I propose recommendations for the collection, preservation and analysis of urine for the screening of patients for microalbuminuria.

Key-words: Microalbuminuria; urine collection; diabetes mellitus; albumin concentration; albumin excretion rate; albumin creatinin ratio; intra individual variation; measuring methods; urine conservation reference values