

ارزیابی روش‌های الکتروایمونواسی و Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری

دکتر بمانعلی جلالی خان آبادی^۱، دکتر حسن مظفری خسروی^۲

دریافت مقاله: ۸۴/۷/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۴/۱۲/۱۳ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۵/۱۰/۳۰ پذیرش مقاله: ۸۵/۱۱/۵

چکیده

زمینه و هدف: تشخیص میکروآلبومینوری یک روش مهم برای پی بردن و ارزیابی عوارض دیررس در بیماران دیابتی می‌باشد. روش مطمئن برای سنجش آلبومین ادرار، در این خصوص حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه یک نوع روش الکتروایمونواسی (EIA) برای سنجش آلبومین در ادرار، راه‌اندازی و ارزیابی شد. علاوه بر این، قابلیت‌های دستگاه Clinitek-۱۰۰ در تشخیص میکروآلبومینوری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه که از نوع ارزیابی آزمون تشخیصی می‌باشد، ابتدا با ایمن نمودن خرگوش، آنتی بادی آلبومین انسانی تهیه و با استفاده از آن روش EIA برای سنجش آلبومین ادرار راه‌اندازی شد. در ۶۱ نمونه ادرار نسبت آلبومین به کراتینین، به عنوان شاخصی از میزان دفع آلبومین از طریق ادرار، محاسبه گردید. در نهایت ارزش تشخیصی EIA و Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری مورد ارزیابی قرار گرفت. از روش الیزا به عنوان مرجع برای تعیین آلبومین ادرار و پی بردن به میکروآلبومینوری استفاده شد.

یافته‌ها: حد تشخیص روش EIA برای سنجش آلبومین ۲ میلی‌گرم بر لیتر و محدوده آنالیز آن بین ۲ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. ضریب تغییرات (CV) روش در یک مرحله و در غلظت‌های مختلف بین ۳/۳۴ تا ۵/۵۷٪ و ضریب همبستگی نتایج آن با روش مرجع (r) معادل ۰/۹۹۶ به دست آمد. حساسیت و ویژگی روش EIA برای تشخیص میکروآلبومینوری به ترتیب ۹۵٪ و ۸۳٪ بود. حساسیت و ویژگی دستگاه Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری به ترتیب ۶۷٪ و ۹۴٪ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: روش EIA برای سنجش آلبومین در ادرار و تشخیص میکروآلبومینوری دقت و حساسیت بالایی دارد، ولی وقت‌گیر بوده و برای تست‌های انفرادی مناسب نیست. دستگاه Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری اختصاصی و سریع می‌باشد. این روش برای تست‌های انفرادی مناسب است، ولی نتایج منفی آن معتبر نمی‌باشد. پیشنهاد می‌شود که دقت بیشتری در استفاده از این دستگاه صورت گرفته و نتایج منفی آن با روش‌های حساس‌تر بررسی شوند.

واژه‌های کلیدی: میکروآلبومینوری، الکتروایمونواسی، Clinitek-۱۰۰، ELISA

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

تلفن: ۰۳۵۱-۸۲۴۱۷۵۱، فاکس: ۰۳۵۱-۸۲۴۷۰۸۴، پست الکترونیکی: bajalali@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

مقدمه

تعیین مقدار آلبومین در ادرار و تشخیص میکروآلبومینوری در برخی از موارد اهمیت کلینیکی داشته و مهم‌ترین استفاده آن در بیماران مبتلا به دیابت می‌باشد [۱]. میزان دفع آلبومین در افراد سالم معمولاً کمتر از ۲۰ میکروگرم در دقیقه می‌باشد، که چنین شرایطی اصطلاحاً آلبومینوری طبیعی نام دارد. دفع آلبومین از طریق ادرار با سرعت ۲۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در دقیقه (۳۰ تا ۳۰۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت) میکروآلبومینوری، و دفع آلبومین بیشتر از این مقدار، ماکروآلبومینوری نامیده می‌شود [۲]. در بیماران دیابتی وجود میکروآلبومینوری نشانه شروع عوارض دیررس بیماری از جمله نفروپاتی است [۳]. از آن جا که چنین شرایطی در صورت تشخیص به موقع، قابل پیشگیری و درمان می‌باشد [۴]، تشخیص اولیه میکروآلبومینوری در این بیماران، در پیشگیری از عوارض دیررس بیماری حائز اهمیت بسیار می‌باشد.

تعیین سرعت دفع آلبومین از طریق ادرار، مستلزم جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته و یا ادرار زمان‌دار شبانه می‌باشد. تهیه ادرار زمان‌دار به ویژه در مورد بیمارانی که بستری نمی‌باشند، کاری مشکل و دارای خطاهای زیادی می‌باشد [۵]. برای به حداقل رساندن مشکلات و خطاهای روش‌های فوق برای تعیین سرعت دفع آلبومین از طریق ادرار، روش‌های ساده‌تر و مطمئن‌تری بکار گرفته شده است، که یکی از مناسب‌ترین آن‌ها تعیین نسبت آلبومین به کراتینین در ادرار تصادفی اول صبح می‌باشد [۶]. اگرچه استفاده از این روش خطاهای مربوط به جمع‌آوری ادرار زمان‌دار توسط بیمار را به طور کامل مرتفع می‌نماید، ولی نیاز به یک روش مناسب و مطمئن برای تعیین غلظت آلبومین در ادرار همچنان ضرورت دارد.

با توجه به موارد فوق، در اختیار بودن یک روش دقیق، صحیح، مطمئن و ارزان برای سنجش آلبومین در ادرار از اهمیت بسیار بالایی برخوردار می‌باشد. روش‌های متعددی

برای این منظور به کار گرفته شده است. روش ایمونوتوربیدیمتری، ساده و سریع بوده ولی به علت امکان ایجاد کدورت‌های غیر اختصاصی، و همچنین وجود کدورت در برخی از نمونه‌های ادرار، نیازمند کنترل و نظارت دقیق می‌باشد [۷]. ELISA روشی بسیار حساس و اختصاصی می‌باشد ولی در حال حاضر از نظر تأمین کیت وابستگی به خارج از کشور داشته و دارای هزینه بسیار بالایی می‌باشد [۸]. امروزه دستگاه‌های خودکار برای برآورد نسبت آلبومین به کراتینین در ادرار طراحی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. دو نمونه از چنین سیستم‌هایی، دستگاه ۵۰-Clinitek [۹] و ۱۰۰-Clinitek [۱۰]، برای تخمین نسبت آلبومین به کراتینین (Alb/Creat) می‌باشند. استفاده از دستگاه‌های فوق علاوه بر داشتن هزینه بالا دارای، نتایج نیمه کمی نیز می‌باشد و به علاوه نیاز به اعمال کنترل دقیق و سرویس‌دهی و ارزیابی مکرر دارد.

به نظر می‌رسد که برای رفع احتیاجات درمانی و تحقیقاتی در داخل کشور، بکارگیری روش‌های مناسب و کم‌هزینه برای تعیین غلظت آلبومین در ادرار و پی بردن به میکروآلبومینوری، از ضرورت بالایی برخوردار باشد.

الکتروایمونواسی (EIA) یا الکتروایمودیفیوژن نوعی روش ایمونوشیمیایی است که برای سنجش یک نوع پروتئین خاص در یک مخلوط پروتئینی و در محدوده میلی‌گرم بر لیتر (mg/L) همواره به عنوان یک روش مرجع مطرح بوده است [۱۱-۱۲].

ویژگی بالای روش به خاطر واکنش اختصاصی آنتی‌ژن - آنتی‌بادی بوده و به عبارتی برای سنجش هر پروتئینی، داشتن آنتی‌بادی ویژه آن در این روش ضروری است. این روش به کرات برای سنجش کمی یک پروتئین خاص مورد استفاده قرار گرفته [۱۳] و از جمله موارد استفاده آن، تعیین مقدار آلبومین در مایعات بیولوژیک و از جمله ادرار بوده است [۱۴].

ادجوانت ناکامل فروندز (FRUND'S ADJUVANT Incomplete) مخلوط و با روش قبلی به حالت سوسپانسیون درآمده و یک میلی لیتر از آن به صورت عضلانی (نیم میلی لیتر به هر عضله ران هر حیوان) تزریق شد. اولین مرحله خونگیری از حیوانات چهار روز بعد از تزریق اولیه انجام و مراحل خونگیری هر ده روز یک بار تکرار و جمعاً پنج بار انجام شد. عمل خونگیری در اول صبح و پس از ناشتا نگه داشتن حیوانات به مدت حداقل ۱۲ ساعت و از ورید کناری (Marginal) لاله گوش انجام شد. برای خونگیری پس از تراشیدن موها، ناحیه مورد نظر به کمک پنبه آغشته به اتانول ۷۰٪ تمیز و سپس به منظور تحریک و پرخون شدن وریدها، از پنبه آغشته به گزین استفاده شد. در نهایت با استفاده از تیغ ژیلت یک بریدگی عرضی بر روی ورید کناری لاله گوش ایجاد، و خون جاری شده در لوله آزمایش جمع آوری گردید. سرم نمونه های خون، پس از انعقاد کامل (حداقل یک ساعت در درجه حرارت آزمایشگاه)، به کمک سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در شرایط ۳۰۰۰g) جدا شد. به سرم تهیه شده سدیم آزاید اضافه شده (به میزان ۰/۰۵٪) و برای استفاده به عنوان آنتی سرم آلبومین، در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

برای تعیین تیتراژ تقریبی آنتی سرم از روش ایمونودیفیوژن دوطرفه استفاده شد. برای این منظور بر روی ژل آگاروز یک چاهک مرکزی حاوی آنتی ژن (محلول آلبومین انسانی با غلظت ۱mg/ml) و در اطراف آن با فواصل نیم سانتی متری چاهک هایی حاوی رقت های مختلف آنتی سرم تهیه و پس از گذشت ۲۴ ساعت وضعیت از نظر تشکیل قوس رسوبی آنتی ژن- آنتی بادی بررسی شد. رقیق ترین غلظتی از آنتی سرم که با آنتی ژن قوس رسوبی تشکیل داده بود، به عنوان تیتراژ تقریبی آنتی سرم در نظر گرفته شد.

۲- انجام الکتروایمونواسی: برای اجرای روش EIA از تجربیات Pascucci و همکاران کمک گرفته شد [۱۶]. برای اجرای روش EIA از ژل آگاروز یک درصد در بافر تریس-

روش EIA اگرچه مستلزم صرف نیروی انسانی و زمان نسبتاً زیادی می باشد، ولی با داشتن صحت و دقت بالا و امکان تهیه آنتی بادی اختصاصی آن در داخل کشور، هزینه کمتری را به بیمار و جامعه تحمیل می نماید. لذا هدف از این مطالعه اولاً راه اندازی، استاندارد نمودن و ارزیابی روش EIA جهت سنجش آلبومین در ادرار و مقایسه نتایج آن با روش ELISA به عنوان روش مرجع، و ثانیاً ارزیابی این روش برای تعیین نسبت آلبومین به کراتینین در ادرار و پی بردن به میکروآلبومینوری و همچنین ارزیابی نتایج دستگاه ۱۰۰-Clinitex مستقر در مرکز تحقیقات دیابت یزد در تشخیص میکروآلبومینوری، بوده است.

مواد و روش ها

۱- تولید آنتی بادی ضد آلبومین: برای تهیه آنتی آلبومین از آلبومین خالص انسانی (تهیه شده از شرکت فلوکا) در محلول ۰/۱۵ مولار کلرور سدیم به عنوان آنتی ژن و ادجوانت کامل و ناقص فروندز (از شرکت سیگما) و بر اساس برنامه Kamp و همکاران استفاده شد [۱۵]. حیوانات مورد استفاده دو عدد خرگوش سفید نر از نژاد نیوزلندی (خریداری شده از انستیتو پاستور ایران) و با وزن تقریبی هر کدام ۲/۵ کیلوگرم بودند. به منظور آماده سازی آنتی ژن برای تزریق اولیه، ابتدا محلول ۵۰ میلی گرم درصد آلبومین در محلول ۰/۱۵ مولار کلرور سدیم تهیه و سپس یک میلی لیتر از محلول فوق (معادل ۵۰۰ میکروگرم آلبومین) با یک میلی لیتر ادجوانت کامل فروندز (FREUND'S ADJUVANT Complete) مخلوط و با پر و خالی نمودن با فشار در سرنگ، سوسپانسیون غلیظ شیری رنگ به دست آمد. به هر کدام از حیوانات یک میلی لیتر از سوسپانسیون آماده شده به صورت زیر جلدی و در پنج ناحیه از پشت تزریق شد. تزریقات یادآوری هر بیست روز یک بار و جمعاً چهار بار انجام شد. برای تهیه آنتی ژن به منظور تزریقات یادآوری، یک میلی لیتر از محلول آلبومین تهیه شده (معادل ۵۰۰ میکروگرم آلبومین) با یک میلی لیتر

بورات و اسلایدهای شیشه‌ای با ابعاد 20×8 cm استفاده شد. ابتدا بافر ذخیره تریس بورات $0/42$ مولار حاوی 10 میلی‌مولار نمک دی‌سدیک‌اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات (Na_2EDTA) با $PH=8/4$ تهیه $51/2$ گرم تریس بازی، $3/2$ گرم Na_2EDTA و 18 گرم اسید بوریک برای یک لیتر، و در هنگام استفاده به میزان پنج برابر با آب مقطر رقیق می‌شد. برای تهیه هر ژل، $0/2$ گرم پودر آگاروز (تهیه شده از شرکت مرک) با 20 میلی‌لیتر بافر تریس - بورات کار، مخلوط و برای حل شدن به مدت 15 دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. مخلوط فوق تا 56 درجه سانتی‌گراد خنک، و به آن 20 میکرولیتر از آنتی‌سرم آل‌بومین اضافه و بلافاصله بر روی اسلاید شیشه‌ای ریخته و پخش می‌شد. ژل پس از بسته شدن حداقل یک ساعت در یخچال قرار داده شده و سپس در فاصله یک سانتی‌متری از انتهای یکی از اضلاع 20 سانتی‌متری آن، تعداد چهل چاله ایجاد شده، و طوری در تانک الکتروفورز (دستگاه الکتروفورز Shandon انگلستان) قرار داده می‌شد که چاله‌ها به طرف قطب منفی باشند.

با استفاده از حداقل دو لایه کاغذ صافی واتمن آغشته به بافر به عنوان فتیله (Wick) دو طرف ژل به بافر موجود در تانک الکتروفورز وصل می‌شد. پس از برقراری اختلاف پتانسیل 60 ولت، به سه چاله ابتدایی و انتهایی ژل از محلول استاندارد آل‌بومین و به بقیه چاله‌ها هر کدام 3 میکرولیتر نمونه مورد آزمایش (ادرار) اضافه شده و حداقل 18 ساعت همان اختلاف پتانسیل 60 ولت برقرار می‌ماند. پس از خاتمه الکتروفورز، برای خروج پروتئین‌های زمینه، ژل حداقل چهار ساعت در حدود 200 میلی‌لیتر محلول کلرور سدیم $0/15$ مولار و برای شسته شدن نمک، یک شب در 200 میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده می‌شد. ژل در هوای آزاد یا فور 70 درجه سانتی‌گراد خشک شده و با استفاده از محلول کوماسی بلو (2 گرم در لیتر در مخلوطی از اسید استیک، متانول و آب به نسبت $8 : 25$: 67) به مدت 15 دقیقه رنگ‌آمیزی و با استفاده از حدود 50

میلی‌لیتر مخلوط اسید استیک، متانول و آب، رنگ زمینه شسته می‌شد. اکنون برای هر استاندارد و هر نمونه (مقابل هر چاله) یک قوس رسوبی راکتی شکل ظاهر شده است که طول و سطح آن متناسب با غلظت آنتی ژن (آلبومین) اضافه شده به آن چاله می‌باشد. پس از محاسبه سطح تمام راکت‌ها، سطوح مربوط به نمونه‌های استاندارد را روی محور عرض‌ها و غلظت استاندارد را روی محور طول‌ها برده و با داشتن حداقل سه نمونه استاندارد، منحنی استاندارد برای هر ژل رسم شد. با بردن سطح راکت‌های مربوط به نمونه‌ها، غلظت آل‌بومین در آن‌ها محاسبه گردید. ضریب تغییرات، با اندازه‌گیری آل‌بومین سه نمونه ادرار با غلظت‌های کم، متوسط و زیاد، هر کدام به تعداد بیست بار و بر روی یک ژل انجام و محاسبه شد. حد تشخیص و محدوده آنالیز روش پیاده شده، با بکار بردن رقت‌های مختلف محلول استاندارد آل‌بومین تعیین گردید. کمترین غلظتی که راکت قابل اندازه‌گیری تشکیل می‌داد، حد تشخیص روش و بالاترین غلظتی که در ژل راکت کامل تشکیل می‌داد به عنوان حد بالای تشخیص روش در نظر گرفته شد. برای پی بردن به صحت روش، ضریب همبستگی نتایج آن (در 61 نمونه ادرار) با روش مرجع به دست آمد. برای مقایسه نتایج روش پیاده شده و دستگاه 100 -Clinitek، تعداد 61 نمونه ادرار اول صبح از افراد دیابتی تهیه شد. دستگاه 100 -Clinitek مورد استفاده ساخت شرکت Bayer از کشور آمریکا (Serial No: 3000495 ، Model: $5YY2C$)، بود و از 61 نمونه ادرار، 31 نمونه بر اساس نتایج دستگاه فوق آل‌بومینوری طبیعی و 30 نمونه میکروآلبومینوری بوده است.

۳- سنجش آل‌بومین و کراتینین: آل‌بومین ادرار در 61 نمونه، یک بار با روش EIA (روش توضیح داده شده بالا) و یک بار با استفاده از کیت الیزای میکروآلبومین (ساخت شرکت DRG آلمان) و بر اساس دستور کار همراه (دستگاه شرکت DRG آلمان) اندازه‌گیری شد. از الیزا به عنوان روش مرجع برای سنجش آل‌بومین ادرار و ارزیابی روش

بدین ترتیب نتایج به دست آمده از روش مرجع به عنوان مبنا قرار داده شد و قابلیت‌های دو روش دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. قابلیت‌هایی که برای دو روش مورد مطالعه ارزیابی شد، شامل حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی بود.

۵- روش‌های آماری مورد استفاده: آنالیز آماری شامل تعیین میانگین، واریانس و انحراف از معیار، به منظور تعیین ضریب تغییرات (C.V) و پی بردن به دقت روش می‌باشد. از آزمون همبستگی برای مقایسه نتایج روش EIA و روش ELISA برای تعیین غلظت آلبومین و با هدف پی بردن به صحت روش EIA استفاده شد. سایر روش‌ها شامل تعیین حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی می‌باشد.

نتایج

برای راه‌اندازی روش EIA، از هر خرگوش حدود ۳۰ میلی‌لیتر آنتی‌سرم به دست آمد. نشان دادن یک راکت رسوبی در روش EIA و با بکارگیری ادرار و سرم رقیق شده، حاکی از عدم وجود آنتی‌بادی‌های ناخواسته و اختصاصی بودن آنتی‌سرم بود. تیتراژ آنتی‌سرم به دست آمده با روش ایمونودیفیوژن دوطرفه ۱/۱۶ به دست آمد که تیتراژ نسبتاً مناسبی بوده و ۲۰ میکرولیتر از آن برای اندازه‌گیری آلبومین در حداقل ۴۰ نمونه ادرار کافی بود. آنتی‌سرم حاصل کاملاً پایدار بوده و با اضافه نمودن سدیم آزاید به میزان ۰/۰۵ درصد (جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها) چندین ماه در درجه حرارت ۴ درجه یخچال پایدار بود.

کمترین غلظت قابل‌سنجش با روش EIA (حد تشخیص) حدود ۲ میلی‌گرم بر لیتر و محدوده آنالیز تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شد.

ضریب تغییرات در یک مرحله و در غلظت‌های ۱۴، ۲۸ و ۵۶ میلی‌گرم بر لیتر آلبومین به ترتیب ۵/۵۷، ۴/۹۶ و ۳/۳۴ درصد به دست آمد.

EIA استفاده شد. این روش دارای محدوده آنالیز ۱/۵ تا ۴۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، حد تشخیص ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر، ضریب تغییرات ۳/۶ تا ۵/۳٪ و بازیابی ۹۶ تا ۱۰۲٪ بود.

برای اندازه‌گیری کراتینین در ادرار پس از رقیق نمودن به میزان بیست برابر، از اصول ژافه و کیت شرکت Man استفاده شد. روش به صورت کینتیکی و دستی و با استفاده از اسپکتوفتومتر دو پرتوی UV/VIS کلمن مدل ۵۰۵S اجرا گردید. در عمل ۲ میلی‌لیتر معرف ژافه را با ۰/۲ میلی‌لیتر محلول استاندارد (با غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر) یا نمونه ادرار رقیق شده مخلوط نموده و تغییرات جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر و در فواصل زمانی ۱۰ ثانیه تا ۲ دقیقه تعیین شد. سپس با استفاده از رابطه کلی فوتومتری غلظت کراتینین در نمونه‌های ادرار محاسبه گردید.

۴- تعیین میکروآلبومینوری: پس از آنکه غلظت آلبومین

نمونه‌های ادرار به دو روش الیزا و EIA و غلظت کراتینین در نمونه‌های ادرار به روش ژافه تعیین گردید، نسبت آلبومین به کراتینین هر نمونه ادرار و برای هر روش سنجش آلبومین تعیین شد. برای این کار غلظت آلبومین نمونه‌ها بر حسب واحد mg/L و غلظت کراتینین بر حسب واحد g/L و بنابراین نسبت‌های به دست آمده بر حسب mg/g یا $\mu\text{g}/\text{mg}$ می‌باشند.

برای پی بردن به میکروآلبومینوری در نمونه‌های ادرار مورد مطالعه، از طریق به دست آوردن نسبت آلبومین به کراتینین در آن‌ها، سه روش به کار گرفته شد. یک روش همان استفاده از دستگاه Clinitek-۱۰۰ است که به صورت خودکار و به صورت نیمه کمی، نسبت آلبومین به کراتینین در نمونه ادرار را تخمین می‌زند. روش دوم تعیین غلظت آلبومین به روش مرجع الیزا و تعیین غلظت کراتینین به روش ژافه و تعیین نسبت آلبومین به کراتینین و تشخیص میکروآلبومینوری، که در این جا به عنوان تست مرجع است. روش سوم تعیین غلظت آلبومین به روش EIA و تعیین نسبت آلبومین به کراتینین بر اساس نتایج به دست آمده از این روش می‌باشد.

از روش الیزا به عنوان روش مرجع برای تعیین غلظت آلبومین در ادرار استفاده شد، بنابراین از کل ۶۱ نمونه، ۴۳ مورد از نظر آلبومینوری مثبت حقیقی و ۱۸ مورد بقیه از این نظر منفی حقیقی تشخیص داده شد.

نتایج آلبومینوری در مورد روش EIA با روش الیزا اندکی تفاوت داشت و از این نظر ۴۴ مورد مثبت و ۱۷ مورد منفی تشخیص داده شد. در جدول ۱ جزئیات نتایج سه روش نشان داده شده است.

برای پی بردن به صحت روش EIA در تعیین غلظت آلبومین، نتایج حاصل از ۶۱ نمونه ادرار با این روش و روش الیزا به عنوان مرجع، مقایسه و با استفاده از آزمون همبستگی پیرسون ضریب همبستگی دو روش معادل ۰/۹۹۶ به دست آمد (r=۰/۹۹۶).

بر اساس نتایج روش الیزا ۴۳ مورد از کل ۶۱ نمونه ادرار دارای نسبت آلبومین به کراتینین مساوی یا بالاتر از ۳۰ و به عبارتی دچار درجاتی از میکروآلبومینوری بودند. از آن جا که

جدول ۱- مقایسه نتایج تعیین میکروآلبومینوری در ۶۱ نمونه ادرار به روش‌های الیزا، الکتروایمونواسی، و دستگاه Clinitek-۱۰۰

روش	نتیجه		مثبت		منفی	
	مثبت	منفی	حقیقی	کاذب	حقیقی	کاذب
روش الیزا	۴۳	۱۸	۴۳	۱۸	-	-
روش EIA*	۴۴	۱۷	۴۱	۱۵	۲	۳
دستگاه Clinitek-۱۰۰	۳۰	۳۱	۲۸	۱۶	۱۴	۱

*: الکتروایمونواسی

بحث

یکی از هدف‌های این مطالعه، راه‌اندازی و ارزیابی روش EIA برای تعیین غلظت آلبومین در ادرار و تشخیص میکروآلبومینوری، از این طریق بوده است. برای این کار از روش الیزا به عنوان روش مرجع، برای تعیین غلظت آلبومین استفاده شد.

ابتدا روش EIA راه‌اندازی شد و قابلیت‌های آن به عنوان یک روش برای تعیین غلظت آلبومین در ادرار نسبت به روش مرجع مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس نسبت آلبومین به کراتینین بدست آمده از نتایج این روش، به عنوان یک تست آزمایشگاهی با نسبت به دست آمده از نتایج روش مرجع، مقایسه شد.

اولین قدم برای راه‌اندازی روش EIA، تهیه آنتی‌بادی اختصاصی برای آلبومین انسانی بود. این کار نسبتاً آسان و کم هزینه می‌باشد و با داشتن چند میلی‌گرم آلبومین خالص و دو

با مقایسه نتایج دو روش EIA و Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری با روش الیزا به عنوان مرجع، قابلیت‌های علمی دو روش فوق محاسبه گردید. در جدول ۲ حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی دو روش فوق برای پی بردن به میکروآلبومینوری نشان داده شده است.

جدول ۲- قابلیت‌های روش الکتروایمونواسی و دستگاه Clinitek-۱۰۰ جهت تعیین میکروآلبومینوری در مقایسه با روش مرجع الیزا

روش	روش	دستگاه
قابلیت	الکتروایمونواسی	Clinitek-۱۰۰
حساسیت (درصد)	۹۵	۶۶/۷
ویژگی (درصد)	۸۳	۹۴
ارزش اخباری مثبت (درصد)	۹۳/۵	۹۶/۵
ارزش اخباری منفی (درصد)	۸۸/۲۳	۵۳/۳

بدست آوردند که از نظر دقت و صحت شبیه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌باشد [۱۶].

هدف دیگر این مطالعه، مقایسه سه روش آزمایشگاهی برای پی بردن به میکروآلبومینوری بوده است. در این خصوص تست مرجع تعیین غلظت آلبومین به روش الیزا بود. روش دوم اندازه‌گیری آلبومین به روش EIA بود. غلظت کراتینین در ادرار برای هر دو تست فوق به روش کینتیکی ژافه مورد سنجش قرار گرفت. و نسبت آلبومین به کراتینین به عنوان شاخص دفع آلبومین از طریق ادرار در نظر گرفته شد. روش سوم استفاده از یک مورد (سه کلمه حذف شد) از دستگاه‌های نیمه خودکاری است که در سال‌های اخیر وارد بازار شده است. این دستگاه‌ها طوری طراحی شده است که با استفاده از نوارهای ادراری خاصی، نسبت آلبومین به کراتینین در نمونه ادرار را تخمین زده و از این طریق وجود میکروآلبومینوری را مشخص می‌نماید. از جمله این دستگاه‌ها که در مرکز دیابت یزد مورد استفاده قرار می‌گیرد ۱۰۰-Clinitek می‌باشد. این دستگاه‌ها برای غربالگری میکروآلبومینوری طراحی شده و قابلیت‌های آن در دست مطالعه می‌باشد.

روش EIA برای تشخیص میکروآلبومینوری نسبت به روش مرجع، دارای حساسیت ۹۵٪ و ویژگی ۸۳٪ بوده است. ارزش اخباری مثبت و منفی برای این تست به ترتیب ۹۳/۵٪ و ۸۸/۶٪ به دست آمد. از نتایج فوق چنین برمی‌آید که نتایج مثبت این تست تقریباً به طور کامل مورد اطمینان می‌باشند. ارزش اخباری منفی نه چندان ایده آل تست (۸۸/۶٪) بیانگر آن است که حدود ۱۱٪ از نتایج منفی مورد اطمینان نمی‌باشد. Patiss و همکاران (۱۹۹۸) با مبنا قرار دادن روش رادیوایمونواسی، روش EIA برای تشخیص میکروآلبومینوری را مورد ارزیابی قرار داده اند.

آن‌ها ضریب همبستگی بین دو روش را معادل ۰/۹۸ به دست آوردند، که اندکی کمتر از روش مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد. محققین فوق در نهایت نتیجه‌گیری نموده‌اند

عدد خرگوش می‌توان آنتی سرم مورد نیاز برای انجام چندین هزار تست را تهیه نمود. آنتی‌سرم تهیه شده با استفاده از آلبومین خالص، کاملاً اختصاصی می‌باشد و نیازی به جدا نمودن آنتی بادی از پروتئین‌های سرم نمی‌باشد. آنتی سرم تهیه شده، در شرایط ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای سال‌ها، و یا همراه با سدیم آزاید در حرارت چهار درجه سانتی‌گراد، برای ماه‌ها کاملاً پایدار می‌باشد.

روش پیاده شده دارای حساسیت و محدوده آنالیز قابل قبولی بود، به طوری که در یک ژل نمونه‌هایی با غلظت ۲ تا حدود ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بدون دستکاری در نمونه، قابل سنجش بودند. تکرار پذیری و دقت روش نیز بسیار خوب بود، بطوریکه ضریب تغییرات در یک مرحله و در غلظت‌های مختلف بین ۳/۳۴ تا ۵/۵۷٪ به دست آمد. این در حالی است که ضریب تغییرات روش الیزا به عنوان روش مرجع، ۳/۶ تا ۵/۷ بوده است. از نظر صحت نیز بین روش مورد نظر و روش مرجع همبستگی بسیار خوبی (۰/۹۹۶) وجود داشت.

Samuel و همکاران روش EIA جهت تشخیص میکروآلبومینوری را مورد ارزیابی قرار داده اند. آن‌ها ضریب تغییرات یک مرحله ای روش (Intra assay C.V) برای تعیین غلظت آلبومین ادرار را در غلظت 16 mg/L معادل ۵/۷٪ و ضریب همبستگی نتایج حاصل از روش را نسبت به روش Radio Immuno Assay (RIA) به عنوان روش مرجع، معادل ۹۷٪، (۰/۹۷) بدست آورده‌اند [۱۴].

با توجه به نتایج ذکر شده روش ما از دقت بیشتر (ضریب تغییرات متوسط ۴/۵٪ در مقایسه با ۵/۷٪) و صحت بالاتری (ضریب همبستگی ۹۹/۶٪ در مقایسه با ۹۷٪) برخوردار می‌باشد.

Pascucci و همکاران روش EIA جهت سنجش آلبومین سرم را از نظر دقت، صحت و عوامل دخیل در این پارامترها، مورد ارزیابی قرار داده‌اند. آن‌ها ضریب تغییرات روش را به طور متوسط ۴/۶٪ و میزان بازیابی روش را بین ۹۹٪ تا ۱۰۰٪

که روش EIA در آزمایشگاه‌های کوچک برای سنجش آلبومین، مناسب‌ترین روش از نظر صحت، زمان و هزینه می‌باشد [۱۷].

Jenhani و همکاران (۱۹۹۰) روش‌های ایمنونفلومتری و EIA را برای ارزیابی میکروآلبومینوری در بیماران دیابتی نوع II با روش رادیوایمونواسی به عنوان مرجع، مقایسه نموده‌اند. در این مطالعه ضریب همبستگی روش EIA با رادیوایمونواسی معادل $r=0/903$ ، و حد تشخیص روش ۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر برآورد شده است. با توجه به این نتایج، روش مورد مطالعه در این تحقیق، به مراتب دارای حساسیت (حد تشخیص ۲mg/L) و صحت ($r=0/996$) بالاتری می‌باشد. در عین حال آن‌ها نتیجه‌گیری نموده‌اند که EIA یکی از روش‌های انتخابی برای تشخیص میکروآلبومینوری برای تعداد نمونه‌های متوسط و زیاد و روش رادیوایمونواسی به عنوان روش مرجع در اینگونه موارد مناسب می‌باشد [۱۸].

در این مطالعه قابلیت‌های دستگاه Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص آلبومینوری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. حساسیت و ویژگی این تست برای تشخیص میکروآلبومینوری به ترتیب ۶۶/۷٪ و ۹۴٪ به دست آمد. بدین ترتیب یکی از نقاط ضعف تست فوق، عدم توانایی تشخیص درصد قابل توجهی از بیماران (میکروآلبومینوری با شدت کم) می‌باشد. ارزش اخباری مثبت و منفی برای این تست به ترتیب ۹۶/۵ و ۵۳/۳ درصد به دست آمد. این نتایج نشان دهنده آن است که نتایج مثبت تست فوق تقریباً به طور کامل مورد قبول می‌باشد، ولی نتایج منفی آن از اعتبار کمی برخوردار است.

Parsons و همکاران نتایج دستگاه Clinitek-۱۰۰ را برای تشخیص میکروآلبومینوری، بر روی ۱۴۴ نمونه مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه تقریباً مشابهی را به دست آورده‌اند. آن‌ها حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت را به ترتیب ۷۶/۳٪، ۸۹٪ و ۸۹/۷٪ به دست آوردند [۱۹]. بر اساس نتایج این

مطالعه، حساسیت روش بالاتر (۷۶/۳ در مقابل ۶۶/۷٪) و ویژگی آن کمتر (۸۹ در مقابل ۹۴٪) بوده است.

علاوه بر قابلیت‌های علمی، قابلیت‌های عملی روش‌های EIA و دستگاه Clinitek-۱۰۰ نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از نقاط ضعف روش EIA وقت‌گیر بودن و عدم امکان اجرای آن روی سیستم‌های خودکار می‌باشد. از جمله نقاط قوت دستگاه Clinitek-۱۰۰ سرعت آن است. به کمک این دستگاه، هر نمونه به تنهایی در عرض چند دقیقه قابل سنجش می‌باشد، ولی در روش EIA لازم است که نمونه‌ها جمع‌آوری شده و به صورت مجموعه اندازه‌گیری شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع EIA روش مناسبی برای سنجش آلبومین ادرار و تعیین میکروآلبومینوری می‌باشد. با توجه به قابلیت‌های علمی مناسب و هزینه پایین، این روش برای کلیه مواردی که جمع‌آوری نمونه‌ها و سنجش همزمان آن‌ها کفایت می‌نماید، بسیار مناسب می‌باشد. از جمله موارد فوق، سنجش آلبومین ادرار و تشخیص میکروآلبومینوری در مطالعات اپیدمیولوژیکی و پی بردن به سرعت دفع آلبومین از طریق ادرار می‌باشد. نقاط قوت این روش دقت و صحت بالا و هزینه نسبتاً پایین آن می‌باشد و از جمله نقاط ضعف آن طولانی بودن زمان آزمایش و نیاز به کارهای دستی و صرف نیروی انسانی نسبتاً زیاد است.

دستگاه Clinitek-۱۰۰ با توجه به سرعت بالا و امکان انجام تست‌های انفرادی، برای کلینیک‌های دیابت مناسب می‌باشد. این دستگاه نیاز به اعمال کنترل و مراقبت از نظر صحت و دقت داشته و نتایج منفی آن بهتر است با روش حساس‌تر، مورد بررسی مجدد قرار گیرند.

References

- [1] Colin FC, Andrea C, Walter G, Caron H R, Sharon L. Intensive therapy and progression of to clinical albuminuria in patients with insulin dependent diabetes mellitus and microalbuminuria. *BMJ*, 1995; 311: 973-7.
- [2] Bakris GL. Microalbuminuria: what is it? Why is it important? What should be done about it? *J Clin Hypertens Greenwich*, 2001; 3(2): 99-102.
- [3] Viberti GC, Hill RD, Jarret RJ, Argropoulos A, Mahmud U, Keen H. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1982; 1(8287): 1430-2.
- [4] Ravid M, Lang R, Rachmani R, Lishner M. Long-term renoprotective effect of angiotensin – converting enzyme inhibition in non-insulin dependent diabetes mellitus: A 7 years follow-up study. *Arch Intern Med*, 1996; 156(3): 286-9.
- [5] Ross SA, Fick GH, Alima L. Factors influencing the estimation of the albumin excretion rate in subjects with diabetes mellitus. *Clin Invest Med*, 1997;20(3):152-61.
- [6] Jensen JS, Clausent P, Borch-Johnsen K, Jensen G, Feldt-Rasmussen B. Detecting microalbuminuria by urinary albumin/creatinine concentration ratio. *Nephrol Dial Transplant*, 1997; 12(Suppl 2):6-9.
- [7] Borg N, Hemmingsen L, Skaarup P. Evaluation of quantitative methods for determination of proteins in urine. *Clin Chim Acta*, 1975; 64(3): 247-52.
- [8] Feldt-Rasmussen B, Dinesen B, Deckert M. Enzyme immunoassay: an improved determination of urinary albumin in dibetics with incipient nephropathy. *Scand J Clin Lab Invest*, 1985; 45(6): 539-44.
- [9] Osta V, Natoli V, Dieguez S. Evaluation of two rapid tests for the determination of microalbuminuria and the urinary albumin/creatinine ratio. *An Pediatr (Barc)*, 2003; 59(2):131-7.
- [10] Suzuki M. Present status and tasks for future of point of care testing. *Rinsho Byori*, 2002; 50(10): 953-7.
- [11] Schuller E, Tompe L, Delasnerie N. Simultaneous determination of albumin and IgG in serum and CSF: comparison of electro-immunodiffusion and immunonephelometry. *Biomedicine*. 1975; 23(5): 189-92.
- [12] Shin Shino K. Development of a serum lipoprotein A-1 immunoassay method. *Rinsho Byori*, 1999; 47(6): 576-79.
- [13] Wells FE, Addison GM, Postlethwaite RJ. Albumin analysis in serum of haemodialysis patients: discrepancies between bromocresol purple, bromocresol green and electroimmunoassay. *Ann Clin Biochem*, 1985; 22(Pt 3): 304-9.
- [14] Samuell CT, Walker BJ, Smith RF, Dhar H, Nelstrop GA. Assay of microalbuminuria using gel electroimmunoassay. *Diabet Med*, 1984; 1(4): 298-300.
- [15] Kamp HH, Luderer TK, Muller HJ, Sopjes-Kruk A. Rapid immunoturbidimetric assay of albumin and immunoglobulin G in serum and cerebrospinal fluid with an automatic discrete analyser. *Clin Chim Acta*, 1981; 114(2-3): 195-205.
- [16] Pascucci MW, Grisley DW Jr, Rand RN. Electroimmunoassay of albumin in human serum: accuracy and long-term precision. *Clin Chem*, 1983; 29 (16): 1787-90.
- [17] Pati SS, Taori CB, Rajan MG, Bhatkar SV, Thakar YS, Chande C, et al. Comparative evaluation of immunochemical methods for estimation of albumin in microalbuminuria. *Indian J Biochem Biophys*, 1998; 35(1): 48-51.
- [18] Jenhani F, Aved K, Jedidis S, Ben Khelifa F, Ben Aved H. Comparison of three methods to evaluate microalbuminuria

in NIDDM: Radio immuni assay, Laser-nephelometry,
Electroimmunodiffusion. *Diabet Metab*, 1990; 16(2): 98-101.

urine albumin: creatinine ratio in a point of care setting. *Clin
Nephrol*, 1999;51(4):220-7

[19] k Parsons M, Newman DJ, Pugia M, Newall RG, Price CP.

Performance of a reagent strip device for quantitation of the