مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دوره پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۵، ۲۳۳-۲۲۵

ارزیابی روش‌های الکترواِیمونواسی و Clinitek-۱۰۰ برای تشخیص میکروآلبومینوری

دکتر بمانعلی جلالی‌خان‌آبادی[۱]، دکتر حسن مظفری‌خسروی[۲]

دریافت مقاله: ۸٤/۷/۲۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸٤/۱۲/۱۳ 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 الکترواِیمونواسی (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 راه اندازی شد. در ۶۱ نمونه ادرار نسبت آلبومین به کرآتینین، 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، الکترواِیمونواسی، Clinitek-۱۰۰، ELISA

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

تلفن: ۸۲۴۱۷۵۱-۰۳۵۱، فاکس: ۸۲۴۷۰۸۴-۰۳۵۱، 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 کرآتینین 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 کرآتینین در ادرار طراحی شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند. دو نمونه از چنین سیستم‌هایی، دستگاه Clinitek-۵۰ [۹] و Clinitek-۱۰۰ [۱۰]، برای تخمین نسبت آلبومین به کرآتینین (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.

الکترواِیمونواسی (EIA) یا الکترواِیمودیفیوژن 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].

روش EIA اگرچه مستلزم صرف نیروی انسانی و زمان نسبتاً زیادی می‌باشد، ولی با داشتن صحت و دقت بالا و امکان تهیه آنتی‌بادی اختصاصی آن در داخل کشور، هزینه کمتری را به بیمار و جامعه تحمیل می‌نماید. لذا هدف از این مطالعه اولاً راه‌اندازی، 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 Clinitek-۱۰۰ مستقر در مرکز تحقیقات دیابت یزد در تشخیص میکروآلبومینوری، بوده است.

مواد و روش‌ها

۱- تولید آنتی‌بادی ضد آلبومین: برای تهیه آنتی‌آلبومین 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 آماده‌سازی آنتی‌ژن برای تزریق اولیه، ابتدا محلول ۵۰ میلی‌گرم درصد آلبومین در محلول ۰/۱۵ مولار کلرور سدیم تهیه و سپس یک میلی‌لیتر از محلول فوق (معادل ۵۰۰ میکروگرم آلبومین) با یک میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر 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 آنتی‌ژن به منظور تزریقات یادآوری، یک میلی‌لیتر از محلول آلبومین تهیه شده (معادل ۵۰۰ میکروگرم آلبومین) با یک میلی‌لیتر ادجوانت ناکامل فروندز (FRUND'S ADJUVANT Incomplete) مخلوط و با روش قبلی به حالت سوسپانسیون درآمده و یک میلی‌لیتر از آن به صورت عضلانی (نیم میلی‌لیتر به هر عضله ران هر حیوان) تزریق شد. اولین مرحله خونگیری از حیوان‌ها چهل 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 گزیلن 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 جمع‌آوری گردید. سرم نمونه‌های 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 سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

برای تعیین تیتر تقریبی آنتی‌سرم از روش ایمونودیفیوژن دوطرفه استفاده شد. برای این منظور بر روی ژل آگاروز یک چاهک مرکزی حاوی آنتی‌ژن (محلول آلبومین انسانی با غلظت ۱mg/ml) و در اطراف آن با فواصل نیم سانتی‌متری چاهک‌هایی حاوی رقت‌های مختلف آنتی سرم تهیه و پس از گذشت ۲۴ ساعت وضعیت از نظر تشکیل قوس رسوبی آنتی‌ژن- آنتی‌بادی بررسی شد. رقیق‌ترین غلظتی از آنتی‌سرم که با آنتی‌ژن قوس رسوبی تشکیل داده بود، به عنوان تیتر تقریبی آنتی‌سرم در نظر گرفته شد.

۲- انجام الکترواِیمونواسی: 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-

بورات و اسلایدهای شیشه‌ای با ابعاد ۸×۲۰ cm استفاده شد. ابتدا بافر ذخیره تریس بورات ۰/۴۲ مولار حاوی ۱۰ میلی‌مولار نمک دی‌سدیک‌اتیلن‌دی‌آمین‌تترااستات (Na2EDTA) با PH=۸/۴ تهیه (۵۱/۲ گرم تریس بازی،۳/۲ گرم Na2EDTA و ۱۸ گرم اسید بوریک برای یک لیتر)، و در هنگام استفاده به میزان پنج برابر با آب مقطر رقیق می‌شد. برای تهیه هر ژل، ۰/۲ گرم پودر آگاروز (تهیه شده از شرکت مرک) با ۲۰ میلی‌لیتر بافر تریس - بورات کار، مخلوط و برای حل شدن به مدت ۱۵ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد. مخلوط فوق تا ۵۶ درجه سانتی‌گراد خنک، و به آن ۲۰ 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 ۲۰ 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 ۶۰ ولت، به سه چاله ابتدایی و انتهایی ژل از محلول استاندارد آلبومین و به بقیه چاله‌ها هر کدام ۳ میکرولیتر نمونه مورد آزمایش (ادرار) اضافه شده و حداقل ۱۸ ساعت همان اختلاف پتانسیل ۶۰ ولت برقرار می‌ماند. پس از خاتمه الکتروفورز، برای خروج پروتئین‌های زمینه، ژل حداقل چهار ساعت در حدود ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول کلرور سدیم ۰/۱۵ مولار و برای شسته شدن نمک، یک شب در ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده می‌شد. ژل در هوای آزاد یا فور ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و با استفاده از محلول کوماسی بلو (۲ گرم در لیتر در مخلوطی از اسید استیک، متانول و آب به نسبت ۸ : ۲۵ : ۶۷) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با استفاده از حدود ۵۰ 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 ۶۱ نمونه ادرار) با روش مرجع به دست آمد. برای مقایسه نتایج روش پیاده شده و دستگاه Clinitek-۱۰۰، تعداد ۶۱ نمونه ادرار اول صبح از افراد دیابتی تهیه شد. دستگاه Clinitek-۱۰۰ مورد استفاده ساخت شرکت Bayer از کشور آمریکا (Model:۵۷۷۲C ،Serial No:۳۰۰۰۴۹۵)، بود و از ۶۱ نمونه ادرار، ۳۱ نمونه بر اساس نتایج دستگاه فوق آلبومینوری طبیعی و ۳۰ نمونه میکروآلبومینوری بوده است.

۳- سنجش آلبومین و کرآتینین: آلبومین ادرار در ۶۱ 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 SLT.SPECTRA ELISA reader) اندازه‌گیری شد. از الیزا به عنوان روش مرجع برای سنجش آلبومین ادرار و ارزیابی روش

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

برای اندازه‌گیری کرآتینین 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 کرآتینین در نمونه‌های ادرار محاسبه گردید.

۴- تعیین میکروآلبومینوری: پس از آنکه غلظت آلبومین نمونه‌های ادرار به دو روش الیزا و EIA و غلظت کرآتینین در نمونه‌های ادرار به روش ژافه تعیین گردید، نسبت آلبومین به کرآتینین هر نمونه ادرار و برای هر روش سنجش آلبومین تعیین شد. برای این کار غلظت آلبومین نمونه‌ها بر حسب واحد mg/L و غلظت کرآتینین بر حسب واحد g/L و بنابراین نسبت‌های به دست آمده بر حسب mg/g یا µg/mg می‌باشند.

برای پی بردن به میکروآلبومینوری در نمونه‌های ادرار مورد مطالعه، از طریق به دست آوردن نسبت آلبومین به کرآتینین 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 کرآتینین در نمونه ادرار را تخمین می‌زند. روش دوم تعیین غلظت آلبومین به روش مرجع الیزا و تعیین غلظت کرآتینین به روش ژافه و تعیین نسبت آلبومین به کرآتینین 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 کرآتینین بر اساس نتایج به دست آمده از این روش می‌باشد.

بدین ترتیب نتایج به دست آمده از روش مرجع به عنوان مبنا قرارداده 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

بـرای راه‌انـدازی روش EIA، از هـر خرگـوش حـدود ۳۰ میلی‌لیتر آنتی‌سرم به دست آمد. نشان دادن یک راکت رسوبی در روش EIA و با بکار گیری ادرار و سرم رقیق شده، حاکی از عدم وجود آنتی‌بادی‌های ناخواسته و اختصاصی بودن آنتی‌سرم بود. تیتر آنتی‌سـرم بـه دسـت آمـده بـا روش ایمونودیفیـوژن دوطرفه ۱/۱۶ به دست آمد که تیتر نسبتاً مناسبی بـوده و ۲۰ میکرولیتر از آن برای اندازه‌گیری آلبومین در حداقل ۴۰ نمونه ادرار کافی بود. آنتی‌سرم حاصل کاملا پایدار بـوده و بـا اضـافه نمودن سدیم آزاید به میزان ۰/۰۵ درصد (جهت جلـوگیری از رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها) چندین ماه در درجه حرارت ۴ درجه یخچال پایدار بود.

کمترین غلظت قابل سنجش 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 غلظـت‌هـای ۱۴، ۲۸ و ۵۶ میلی‌گرم بر لیتر آلبومین بـه ترتیـب ۵/۵۷، ۴/۹۶ و ۳/۳۴ درصد به دست آمد.

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 ۹۹/۶٪ به دست آمد (r=۰/۹۹۶).

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

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

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

**** : الکترواایمونواسی***

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 الکترواایمونواسی و دستگاه ۱۰۰-Clinitek جهت تعیین میکروآلبومینوری در مقایسه با روش مرجع الیزا

روش / قابلیت	روش الکترواایمونواسی	دستگاه 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

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 کرآتینین 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 نسبتا آسان و کم هزینه می‌باشد و با داشتن چند میلی‌گرم آلبومین خالص و دو

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 کاملا 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 (r=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٪، (r=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٪ 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 کرآتینین در ادرار برای هر دو تست فوق به روش کینتیکی ژافه مورد سنجش قرار گرفت. و نسبت آلبومین به کرآتینین 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 کرآتینین 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 Clinitek-۱۰۰ 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

کـه روش EIA در آزمایـشگاه‌هـای کوچـک بـرای سـنجش آلبومین، مناسـب‌تـرین روش از نظـر صـحت، زمـان و هزینـه می‌باشد [۱۷].

Jenhani و همکاران (۱۹۹۰) روش‌هـای ایمونونفلـومتری و EIA را برای ارزیابی میکروآلبومینوری در بیماران دیابتی نـوع II با روش رادیوایمونواسی به عنوان مرجع، مقایسه نمـوده‌انـد. در این مطالعه ضریب همبستگی روش EIA با رادیوایمونواسی معادل ۹۰٪ (r=۰/۹۰۳)، و حد تشخیص روش ۲/۵ میلـی‌گـرم بر لیتر برآورد شده است. با توجه بـه ایـن نتـایج، روش مـورد مطالعـه در ایـن تحقیـق، بـه مراتـب دارای حـساسیت (حـد تشخیص ۲mg/L) و صحت (r=۰/۹۹۶) بـالاتری مـی‌باشـد. در عـین حـال آن‌هـا نتیجـه‌گیـری نمـوده‌انـد کـه EIA یکـی از روش‌های انتخابی برای تشخیص میکروآلبومینوری برای تعداد نمونه‌های متوسـط و زیـاد و روش رادیوایمونواسـی بـه عنـوان روش مرجع در اینگونه موارد مناسب می‌باشد [۱۸].

در این مطالعه قابلیـت‌هـای دسـتگاه Clinitek-۱۰۰ بـرای تشخیص آلبومینوری نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. حساسیت و ویژگی این تست برای تشخیص میکروآلبومینـوری بـه ترتیـب ۶۶/۷٪ و ۹۴٪ به دست آمد. بدین ترتیب یکی از نقـاط ضـعف تست فـوق، عـدم توانـایی تـشخیص درصـد قابـل تـوجهی از بیمـاران (میکروآلبومینـوری بـا شـدت کـم) مـی‌باشـد. ارزش اخباری مثبت و منفی برای این تست به ترتیـب ۹۶/۵ و ۵۳/۳ درصد به دست آمد. این نتایج نشان دهنده آن است که نتـایج 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 بـرای تشخیص میکروآلبومینوری، بر روی ۱۴۴ نمونه مـورد ارزیـابی قرار دادند و نتیجه تقریباً مشابهی را به دست آورده‌انـد. آن‌هـا حساسیت، ویژگی و ارزش اخباری مثبت را به ترتیـب ۷۶/۳٪، ۸۹٪ و ۸۹/۷٪ به دست آوردنـد [۱۹]. بـر اسـاس نتـایج ایـن مطالعـه، حـساسیت روش بـالاتر (۷۶/۳ در مقابـل ۶۶/۷٪) و ویژگی آن کمتر (۸۹ در مقابل ۹۴٪) بوده است.

علاوه بر قابلیت‌های علمی، قابلیـت‌هـای عملـی روش‌هـای EIA و دستگاه Clinitek-۱۰۰ نیز مورد ارزیـابی قـرار گرفـت. یکی از نقاط ضعف روش EIA وقت‌گیـر بـودن و عـدم امکـان اجرای آن روی سیستم‌های خودکار می‌باشـد. از جملـه نقـاط قوت دستگاه Clinitek-۱۰۰ سرعت آن اسـت. بـه کمـک ایـن دستگاه، هر نمونه به تنهایی در عرض چند دقیقه قابل سنجش می‌باشد، ولی در روش EIA لازم است که نمونه‌ها جمـع‌آوری شده و به صورت مجموعه اندازه‌گیری شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع EIA روش مناسبی برای سنجش آلبومین ادرار و تعیین میکروآلبومینوری می‌باشد. با توجـه بـه قابلیـت‌هـای علمی مناسب و هزینه پایین، این روش برای کلیه مواردی کـه جمع‌آوری نمونه‌ها و سنجش همزمان آن‌ها کفایت مـی‌نمایـد، بسیار مناسب می‌باشد. از جمله موارد فوق، سـنجش آلبـومین 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 جملـه نقـاط ضـعف آن طـولانی بـودن زمـان آزمایش و نیاز به کارهای دستی و صرف نیروی انـسانی نـسبتاً زیاد است.

دستگاه Clinitek-۱۰۰ با توجه به سرعت بالا و امکان انجام تست‌های انفرادی، برای کلینیک‌های دیابت مناسب می‌باشـد. این دستگاه نیاز به اعمال کنتـرل و مراقبـت از نظـر صـحت و دقت داشته و نتایج منفی آن بهتر اسـت بـا روش حـساس‌تـر، 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. Miroalbuminuria: 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 immunonephe_ lometry. *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 albumun 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

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

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

[19] k Parsons M, Newman DJ, Pugia M, Newall RG, Price CP. Performance of a reagent strip device for quantitation of the