Archive of SID

مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲، شماره ۱۲، صفحات ۱۰۳۶ تا ۱۰۴۲، (۱۳۸۳)

ارزیابی روش تغییریافته ایمونوتوربیدمتری جهت تشخیص میکروآلبومینوری در بیماران مبتلا به دیابت

دکتر پروانه خضرایی‌نیا (دانشیار)*، محمد طاهری (مربی)، دکتر فخراله طایفه (دانش‌آموخته)، دکتر ناهید اطیابی (استادیار)، دکتر علیرضا باهنر (استادیار)
* دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

چکیده

مقدمه: نفروپاتی دیابتی یکی از مشکلات دیررس و خطرناک بیماران دیابتیک می‌باشد. بنابراین تشخیص میکرو آلبومینوری برای غربالگری و مطالعات کلینیکی بیمارانی که در مرحله آغازین نفروپاتی دیابتیک هستند تست با ارزشی می‌باشد. ایمونوتوربیدی متری روشی ساده و سریع برای تشخیص میکرو آلبومینوری است که اساس آن واکنش آنتی ژن (آلبومین) آنتی‌بادی (آنتی‌آلبومین) می‌باشد و میتوان از طریق کدورت سنجی به وسیله فتو مترهای معمولی که در آزمایشگاه‌ها موجود می‌باشد، مقدار آلبومین را اندازه گیری نمود.این روش دارای حساسیت کافی برای اهداف کلینیکی است.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه آنتی آلبومین انسانی در خرگوش و تهیه رقتهای مختلف میکرو آلبومین با استفاد از ترازوی حساس و انجام آزمایش ایمونوتربیدمتری بر روی آنها و به دست آوردن جذب نوری هر یک از رقت‌ها، منحنی استاندارد رسم گردید. ۲۷ نمونه دیگر میکروآلبومین در محدوده رقت های بین ۲۰۰-۲۰μg/ml با استفاده از ترازوی حساس تهیه وبا روش ایمونوتربیدمتری وبه دست آوردن جذب نوری هر یک از رقت‌ها مقادیر آنها نیز با استفاده ازمنحنی استانداردی که قبلاً تهیه شده بود تعیین گردید.

یافته‌ها: باآزمایش بر روی این ۲۷ نمونه، همبستگی پیرسون بین مقادیری که با استفاده از ترازوی حساس تهیه شدند و مقادیر همین نمونه‌ها که با روش تربیدمتری و با استفاده از رسم منحنی استاندارد بدست آمدند، ۹۹/۹ بود که در سطح $p=0/01$ معنی دار می‌باشد. آزمایش بر روی چند نمونه ادرار افراد مبتلا به دیابت نیز انجام گردید و تعدادی از نمونه‌ها که پروتئین آنها در آزمایش با نوار ادراری منفی بودبا استفاده از روش ایمونوتربیدمتری دفع میکرو آلبومین را نشان دادند.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: در مجموع به نظر می‌رسد که این روش روشی مناسب سریع وارزان برای تشخیص میکروآلبومین در ادرار باشد.

مقدمه

نفروپاتی دیابتی یکی از شایع ترین علل بیماری‌های کلیوی در کشورهای پیشرفته است وتقریبا ۳۰٪آنرا تشکیل می‌دهد. حدود ۳۰٪-۲۰٪ از بیماران دیابتی تیپ ۱ و ۲ به نفروپاتی مبتلا میشوندومیزان بروز آن باطول مدت بیماری نسبت مستقیم دارد (۱).

در مراحل شروع بیماری‌های کلیوی به دلیل دفع بسیار ناچیز آلبومین از طریق ادرار (۲۰۰μg/ml- ۲۰) که به این

www.SID.ir

Archive of SID

حالت میکروآآلبومینوری گویند تشخیص بیماری کلیوی مشکل است (۲).

میکروآلبومینوری با نوارهای استریپ ادراری که حضور پروتئین در ادرار را نشان میدهد مشخص نمی شود. درحالی که تشخیص این مرحله از بیماری برای به تاخیرانداختن و حتی جلوگیری از بیماری کلیوی با کنترل قند خون و فشار خون بسیار حا ئز اهمیت می‌باشد.

ایمونوتوربیدمتری یک روش سریع ساده و ارزان نسبت به سایر روشها مانند الایزا، RIA و ژل دیفیوژن برای تشخیص میکروآلبومینوری است (۳).

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی: آلبومین انسانی ،ادجوانت کامل وناقص فروند، بافر بورات، پلیٰ اتیلن گلیکول ،ترایتون۱۰۰ -X آنتی سرم آلبومین ،نرمال سالین، نوار استریپ ادراری، PBS

مواد غیر مصرفی: بیوفتومتر اپندرف، سانتریفوژ یخچال‌دار،ترازوی حساس، سمپلر

حیوان مورد استفاده: خرگوش

محل اجرای طرح: دانشگاه تهران دانشکده دامپزشکی، آزمایشگاه مرکزی دکتر رضا رستگار

طرز تهیه PBS: ۸ گرم کلرید سدیم و۰/۲ گرم کلریدپتاسیم را در ۵۰۰میلی لیتر آب مقطر حل کرده وبه محلول حاصل ۰/۲ گرم KH2PO4 و۲/۵گرم Na2HPO4 اضافه و حجم با آب مقطر به یک لیتر رسانده شد. و نهایتاً PH= ۷/۲ تنظیم شد (٤).

طرز تهیه با فربورات: ۰/۵گرم دی سدیم ترا بورات در ۱۳/۸ میلی لیتر آب مقطر حل شد ودر ظر ف دیگری نیز ۵/۵ گرم اسید بوریک در۸۸۸ میلی لیتر آب مقطر حل گردید .برای اینکه PH کل با فر به ۷/٤ برسد ۵۵ میلی لیتر از استوک دی‌سدیم ترابورات با ٤۸۰ میلی لیتر اسید بوریک مخلوط شد (٤). طرز تهیه محلول پلی اتیلن گلیکول: ۰/۹ گرم از پودر پلی اتیلن گلیکول در ۱۰ میلی لیتر با فر بورات حل شد و محلول ۹٪ پلی اتیلن گلیکول به دست آمد (۵).

ایمونیزاسیون: برای تهیه آنتی‌آلبومین انسانی ۵۰۰ میکروگرم از آلبومین انسان در یک میلی لیتر با فربورات حل شد و سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول مذ کور با ۰/۵ میلی لیتر ادجوانت کامل فروند مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به دوطرف ران یک خرگوش تزریق گردید و عیناً همین کار روی خرگوش دوم نیز انجام شد.

در روز ١٤ بعد از تزریق اعمال فوق بر روی دو خرگوش به عنوان یادآور تکرار گردید. با این تفاوت که این بار از ادجوانت ناقص فروند استفاده شد.پس از ۲۸ روز (١٤ روز پس از تزریق دوم)از هر دو خرگوش خونگیری شد و سرم خون جدا گردید (٤).

انجام رینگ تست (آزمایش حلقه)

جهت تایید تشکیل آنتی سرم در خر گوش مقدا ر ۱۰۰ میکرولیتر از سرم هریک از خرگوشها در لوله‌های جداگانه ریخته شد و روی آنها ۱۰۰ میکرولیتر از محلولµg/ml ۵۰۰ آلبومین استاندارد ریخته شد در هر دو مورد در حد فاصل بین سرم و محلول آلبومین رینگ یا حلقه تشکیل گردیدکه نشان دهنده یک ایمونیزاسیون موفق می‌باشد، همچنین در آزمایش ژل دیفیوژن خط رسوبی بین سرم خرگوش وآلبومین انسانی تشکیل شد (٤)

جدا کردن گاماگلوبولین‌های سرم خرگوش: ۲ میلی لیتر سرم خرگوش با سالین نرما ل به نسبت ۱/۲ رقیق شد وطبق فرمول زیر آن قدر آمونیم سولفات اشباع اضافه گردید تا غلظت نهایی آمونیوم سولفات ٤۵٪ اشباع شد.

$x/x+٤=٤٥/١٠٠$

بنابراین ۳/۲٦ میلی لیتر آمونیوم سولفا ت اشباع آهسته به لوله حاوی ٤ میلی لیتر سرم رقیق شده اضافه گردید و مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت اتاق بوسیله همزن مخلوط گردید محلول حاصل با دو ر ۱۰۰۰ مدت ۲۵ دقیقه در سانتریفوژ یخچال دار قرار گرفت مایع رویی جدا ورسوب درPBS حل گردید و مجددا به حجم ٤ میلی لیتر رسید و با همان شرایط سانتریفوژ تکرار گردیدوبعد مجدداً با استفاده از فرمول فوق آنقدر آمونیوم سولفات به محلول رویی اضافه گردید تا غلظت آمونیوم سولفات به ٤۰٪ رسید وسپس با همان شرایط قبلی

www.SID.ir

Archive of SID

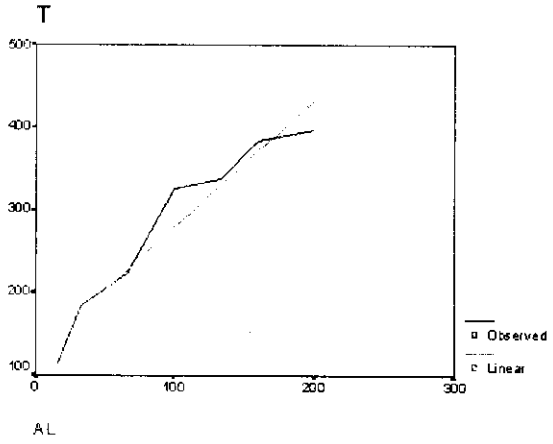
سانتریفوژ شد. محلول فوق در کیسه دیالیز ریخته ومدت ۴۸-۲۴ ساعت در یخچال در مقابل PBS دیالیز گردید. جهت اطمینان از تکمیل دیالیز و خروج یونهای سولفات آمونیوم یک قطره ازمحلول داخل کیسه دیالیز را به۰/۵میلی لیتر کلرید باریم در آب مقطر اسیدی شده با HCl یک مولار اضافه شد. عدم وجود کدورت دلیل برتکمیل دیالیز می‌باشد، در غیر این صورت دیالیز باید ادامه پیدا کند .به این ترتیب گاما گلوبولین‌ها از سرم جدا می‌شوند (٤).

تنظیم مقدار آنتی‌بادی: در این روش به جای تیتر آنتی بادی از مقادیر مختلف استوک آن استفاده گردید. آنتی با دی حاصل با مقادیر مختلف بین µl ۶۰-۱۰ بدون رقیق سازی با مقادیر مشخص آنتی ژن مجاور شد ودر نهایت برای بدست آوردن یک منحنی خطی وارتباط مستقیم افزایش جذب نوری با افزایش آنتی ژن در محدوده µg/ml۲۰۰- ۲۰ مقدار µl ۲۵ازآنتی بادی به ازای µ l ۲۰آنتی ژن مناسب ترین مقدار شناخته شد.

رسم منحنی استاندارد: یک میلی گرم از آلبومین انسانی کمپانی مرک با استفاده از ترازوی حساس توزین وبا دو میلی لیتربافر بورات حل شد و به محلول حاصل به نسبت µl۱۰ به ازای هرml ۱۰۰ ،ترایتون X-۱۰۰ اضافه شد. درنتیجه محلول استوک با غلظتµg /ml۵۰۰ بدست آمد. با رقیق کردن استوک فوق بوسیله بافر بورات استانداردهایی با غلظت‌های دلخواه و متفاوت ،شامل۱۶، ۳۳ ،۶۶،۱۰۰، ۱۳۳ و۲۰۰ میکروگرم درهر میلی‌لیتر ساخته شد.

برای انجام آزمایش ایمونوتوربیدومتری برای هر غلظت استانداردو لوله درنظرگرفته شد (لوله استاندارد S و لوله بلانک B).

به هر کدام از لوله‌های بلانک µl ۲۰۰ بافر بورات حاوی ترایتون X_۱۰۰ و به هریک از لوله‌های استاندارد µl ۱۰۰از بافر فوق وبه هر دو لولهS و Bµl ۲۰ از غلظت‌های مختلف آلبومین استاندارد اضافه گردید و کاملاً مخلوط شد. در مرحله بعد به تمام لوله‌ها µl ۲۵ آنتی آلبومین اضافه شد. سپس به منظور تشکیل ایمونوکمپلکس تمام لوله‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار گرفتند بعد از این مرحله فقط به لوله‌های تست µ l ۱۰۰ پلی اتیلن گلیکول برای رسوب ایمونوکمپلکس‌ها و ایجاد کدورت اضافه شد .و بعد از ۳۰ دقیقه با استفاده از دستگاه بیو فتو متر اپندرف در طول موج ۶۰۰nm جذب نوری هر.یک از محلولهای استاندارد در مقابل بلانک مربوط به خود قرائت شد ونمودار شماره ۱ بدست آمد.



غلظت آلبومین (میکروگرم در میلی‌لیتر)

نمودار شماره ۱- منحنی استاندارد تعیین غلظت میکروآلبومین به روش ایمونوتربیدمتری

بعد از کشیدن نمودار، ۲۷ نمونه استاندارد دیگر با میزان مشخص میکروآلبومین در محدوده غلظتهای µg/ml۲۰۰- ۲۰ ساخته شد (جدول شماره ۱) و عینا تمام مراحل ذکر شده بر روی این نمونه‌ها تکرار گردید و با استفاده از مقادیر جذب نوری آنها غلظت آنها از روی منحنی فوق تعیین گردید.

سپس آزمایش برروی چند نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت صورت گرفت.

جمع آوری نمونه‌های ادرار از بیماران مبتلا به دیابت:۸ نمونه ادرار از بیماران مبتلا به دیابت بستری در بیمارستا ن شریعتی تهران و ۱۰ نمونه از بیماران بستری بیمارستان یافت آباد و۲ نمونه ازبیماران غیر بستری به صورت رندم جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد درG۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند و قبل از انجام آزمایش ایمونوتوربیدومتری نمونه‌ها توسط نوار ادراری مورد ارزیابی قرارگرفتند از ۸ نمونه ادرار جمع‌آوری شده از بیمارستان

www.SID.ir

Archive of SID

شریعتی با استفاده از نوار ادراری ۳ مورد دارای ماکروآلبومینوری بود.

جدول شماره ۱- ۲۷ نمونه استاندارد با میزان مشخص میکروآلبومین در محدوده غلظتهای ۲۰۰μg/ml- ۲۰تهیه شده به وسیله ترازوی حساس Sartorius و غلظت‌های به دست آمده با روش ایمونوتربیدمتری

غلظت‌های تهیه شده μg/ml	غلظت‌های بدست آمده μg/ml	غلظت‌های تهیه شده μg/ml	غلظت‌های بدست آمده μg/ml
۱۸	۱۷	۱۲۱	۱۲۷
۲۵	۲۳	۱۲۸	۱۳۴
۳۲	۳۰	۱۳۵	۱۴۷
۳۹	۳۶	۱۴۲	۱۵۸
۴۶	۴۵	۱۴۹	۱۶۴
۵۲	۵۰	۱۵۶	۱۷۰
۵۸	۶۱	۱۶۳	۱۷۸
۶۶	۶۴	۱۷۰	۱۸۵
۷۳	۷۸	۱۷۷	۱۸۹
۸۰	۸۵	۱۸۴	۱۹۶
۸۷	۸۸	۱۹۱	۲۰۲
۹۴	۹۲	۱۹۸	۲۱۲
۱۰۰	۱۱۰		
۱۰۷	۱۱۴		
۱۱۴	۱۲۰		

همچنین از ۱۰ مورد نمونه ادراری جمع‌آوری شده از بیمارستان یافت آباد ۳ مورد مثبت شد. این نمونه‌ها با توجه به شدت مثبت بودن آنها (از یک مثبت تا چهار مثبت) با بافر بورات رقیق شدند .برای مثال نمونه‌های یک مثبت ۱/۱۰ و نمونه‌های دو مثبت ۱/۲۵ و نمونه‌های سه مثبت و چهار مثبت به میزان ۱/۵۰ رقیق شدند.

بعد از انجام مراحل مذکور برای تمام نمونه‌های ادراری (نمونه‌های مثبت رقیق شده و نمونه هایی که با نوار استریپ منفی بودند روش ایمونوتوربیدومتری انجام شد .جهت انجام آزمایش برای هر نمونه ادرار دو لوله آزمایش وبلانک در نظر گرفته شد و بقیه مراحل عینا به روش نمونه‌هایی که جهت استاندارد استفاده شدند عمل شد و جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ٦٠٠nm بوسیله بیوفتومتر قرائت گردید.

یافته ها

نتایج حاصل از ۲۷ نمونه استاندارد با غلظت‌های مختلف آلبومین نشان داد که همبستگی پیرسون بین مقادیری که با استفاده از ترازوی حساس تهیه شدند و مقادیر همین نمونه‌ها که با روش ایمونوتربید متری و با استفاده از رسم منحنی استاندارد بدست آمدند، ۹۹/۹ ٪ بود که در سطح p=۰/۰۱ معنی دار می باشد.

M±SD مقادیر نمونه‌های اندازه‌گیری شده با ترازوی حساس ۵۴/۹±۱۰۷/۶ و M±SD مقادیر همین نمونه‌ها با روش ایمونوتربیدومتری ۶۰/۹±۱۱۳/۹ به دست آمد و در آزمون T اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت.

در مورد بیماران مبتلا به دیابت، از مجموع نمونه‌های بیمارستان شریعتی سه نمونه میکروآلبومینوری داشتند (شماره ۲، ٤، ۸) و از نمونه‌های بیمارستان شهدای یافت‌آباد نیز سه نمونه میکروآلبومینوری داشتند (نمونه‌های شماره ۳،٦،۸).

نمونه بیماران بستری نشده هر دو فاقد میکرو آلبومین بودند. در مجموع از ۲۰ نمونه ادرار بیماران مبتلا به دیابت ٦ نمونه ماکرو آلبومینوری را نشان دادند ۳۰٪ و از ١٤ نمونه‌ای که پروتئین آنها با نوار استریپ منفی بود ٦ نمونه با روش ایمونوتربیدمتری میکرو آلبومینوری را نشان دادند(۳۰٪ کل مبتلایان به دیابت و٤٢/٨٪ بیماران مبتلا به دیابتی که با نوار ادراری دفع پروتئین را نشان ندادند). مجموع نتایج حاصل از ایمونوتوربیدومتری وآزمایش با نوار ادراری (PH ،گلوکز ،خون ،پروتئین) در جدول شماره۲ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۲- نتایج آزمایشات ادراری بیماران مبتلا به دیابت

محل اخذ نمونه	آزمایشات ادراری	PH	گلوکز	خون	پروتئین	جذب نوری	غلظت آلبومین µg/ml
	۱	۵	۲+	-	۱+	۱۶۴	۲۵*
	۲	۵	۳+	-	-	۳۵۱	۱۴۰×
	۳	۵	۲+	-	۱+	۲۶۶	۴۳*
بیمارستان دکتر	۴	۵	-	-	-	۱۵۱	۲۳×
شریعتی	۵	۷	۴+	۲+	-	۹۶	-
	۶	۷	۳+	۲+	۲+	۱۸۰	۳۰**
	۷	۵	-	-	-	۱۲۳	۱۸
	۸	۷	۲+	۱+	-	۱۳۷	۲۰×
	۱	۵	۴+	-	-	۸۷	-
	۲	۵	۴+	-	۲+	۱۹۶	۳۵**
	۳	۵	۳+	۲+	-	۱۴۸	۲۱×
	۴	۵	۲+	۲+	۱+	۲۴۳	۷۵*
بیمارستان	۵	۷	-	-	۲+	۱۷۴	۳۵***
یافت‌آباد	۶	۵	-	-	-	۳۱۰	۹۵×
	۷	۷	-	۱+	-	۱۲۲	۱۸
	۸	۵	۳+	-	-	۳۴۲	۱۳۳×
	۹	۵	-	-	-	۹۶	-
	۱۰	۶	-	-	-	۸۴	-
بیماران بستری	۱	۵	-	-	-	۱۰۱	-
نشده	۲	۵	-	-	-	۱۰۹	-

*۱/۱۰رقیق شده
** ۱/۲۵رقیق شده
*** ۱/۵۰رقیق شده
× میکروآلبومینوری

بحث

یکی از مهمترین عوارض بیماری دیابت نفروپاتی میباشد مدتها قبل از ظهور ماکروپروتئین ترشح پروتئین در ادرار به شکل میکروپروتئین اوری است. .تشخیص این مرحله از بیماری بسیار حیاتی به نظر میرسد به دلیل اینکه میکروپروتئین اوری یک شاخص مهم برای پیشگویی پیشرفت آسیب کلیوی به شکل نفروپاتی کلینیکال می‌باشد .با تشخیص سریع این مرحله آغازی و باکنترل دقیق دیابت و فشار خون می‌توان آسیب غیر قابل برگشت کلیوی را کاهش داد ویا متوقف نمود.

یکی از دلایل ارزیابی میزان پروتئین در ادرار عملکردو نمود پذیری گلومرولها میباشد و مهمترین پروتئین برای این ارزیابی آلبومین است از دیگر پروتئین‌های موجود در ادرار که بدین منظور به آن می‌توان توجه داشت ترانسفرین است اما این پروتئین مقدار ناچیزی از توتال پروتئین را شامل می‌شود (۶) .در روش ایمونوتربیدومتری افزودن g/l ۵۰ هموگلوبین به ادرار با میزان آلبومین تداخلی ایجاد نمی‌نماید (۶).

سانتریفوژ ادرار سبب افزایش دقت اندازه‌گیری میکروآلبومین وکاهش SD می‌گردد (۷).

حدود ۵۰٪-۴۰٪ پروتئین‌های نرمال در ادرار بوسیله لوله‌های دیستال کلیه ترشح می‌شوند و نشان دهنده آسیب کلیوی نیستند بنابراین اندازه‌گیری توتال پروتئین نمی تواند یک معیار قابل اعتمادی برای سنجش میزان نفوذپذیری گلومرول‌ها و ارزیابی عملکرد کلیه‌ها باشد (۶). روشهای

www.SID.ir

Archive of SID

متعددی برای اندازه‌گیری میکروآلبومینوری وجود دارد، که مهمترین آنها رادیو ایمونواسی الایزا، ایمونونفلومتری، ایمونودیفیوژنو، آگلوتیناسیون معکوس و ایمونوتوربیدومتری می‌باشد.

رادیو ایمونواسی(RIA): این روش بسیار حساس ولی مانند سایر روش‌های رادیوایمونولوژی احتیاطات خاص خود رالازم دارد و همچنین نیاز به تجهیزات مخصوص می‌باشد و در مجموع روش گرانی است (٢،٥).

ایمونو دیفیوژن: این روش ارزان است ولی زمان زیادی را برای انکوباسیون نیاز دارد .همچنین در غلظت‌های پایین میکروآلبومین اوری حساسیت لازم را ندارد (٥).

ایمونونفلومتری: گرچه این روش یک روش اتوماتیک ودارای دقت کافی است اما بدلیل نیاز به دستگاه نفلومتر در بسیاری از آزمایشگاها مورد استفاده قرار نمی‌گیرد (٢).

الایزا: این روش نیز دقیق، ولی روش گرانی است ونیاز به کیت الایزا ودستگاه الایزا Reader می‌باشد (٢).

آگلوتیناسیون معکوس: این روش سریع ،ساده وارزان است اما روشی نیمه کمی است و در واقع نشان دهنده میکرو آلبومینوری است ولی میزان آلبومین رانشان نمی دهد (٢).

ایمونوتوربیدمتری: این روش روشی سریع وارزان برای غلظت‌های مختلف میکروآلبومین در ادرار می‌باشد ونیاز به تجهیزات خاص ندارد و با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر یا بیو فتومتر میتوان مقدار آلبومین در ادرار را تعیین نمود. در ایمونوتوربید متری واکنش بین آنتی ژن وآنتی بادی صورت می‌گیرد و بعد از تشکیل ایمونو کمپلکس با حضور پلی اتیلن گلیکول این کمپلکس ایمنی رسوب و ایجاد کدورت می‌نماید. در این روش تنظیم رقت آنتی بادی اهمیت بسیار دارد. در مواردی که فزونی آنتی‌بادی وجود داشت، در غلظت‌های پایین آنتی‌ژن نتایج کاذب بیش از مقدار واقعی آنتی ژن بدست آمد و در فزونی آنتی‌ژن منحنی از حالت خطی خارج و نتایج کمتر از مقادیر واقعی حاصل شد و افزایش میزان آنتی‌ژن با جذب نوری‌ها نسبت مستقیم نداشت.

در این روش برای قرائت جذب نوری از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد در این دستگاه کدورت سنجی با طول موج ٦٠٠nm انجام می‌شود. علت به کار بردن بیوفتومتر در این روش سهولت انجام کار بود. در مطالعه دیگری تأثیر طول موج بر حساسیت تست ایمونوتربیدومتری مورد بررسی قرار گرفته است ومشخص شده است که با کاهش طول موج تا ٣١٠ نانومتر میزان حساسیت تست افزایش می‌یابد اما در طول موج کمتر از ٣١٠ نانومتر رنگدانه‌های موجود در ادرار نیز دارای جذب نوری می‌شوند و نتایج غیر قابل اعتمادی را ایجاد می‌کنند (٢) در روش‌های مشابه با این روش که با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شده بود جهت قرائت جذب نوری از طول موج ٣٤٠nm استفاه شد (٢،٥).

در این روش جهت حذف پاسخ‌های منفی کاذب از ترایتون X-١٠٠ استفاده گردید .آلبومین سرم انسان به شکل غیراختصاصی با لوله‌های آزمایش و پلی استرن پیوند می‌شود و در نتیجه باعث کاهش غلظت آلبومین در نمونه شده ونتایج غیر واقعی بویژه درغلظت‌های پایین آلبومین بدست خواهد آمد. جهت جلوگیری از این نوع پیوندها به ازای هر ١٠٠ml بافر بورات ١٠μl ترایتون١٠٠- X که نوعی دترجنت است اضافه شد. در روش دیگری جهت جلوگیری از تشکیل باندهای غیر اختصاصی آلبومین با جدار لوله‌های آزمایش از آلبومین گاوی به میزان ٢٠mg/L استفاده شد اما به دلیل ایجاد واکنش متقاطع بین آلبومین سرم گاو و آلبومین انسان این روش تایید نشد و د راین روش نیز از تریتون X-١٠٠ استفاده شد (٨).

مشابه تحقیق حاضردرتحقیق دیگری نمونه‌های ادراری که با نوار استریپ ادراری مثبت شده بود رقیق شدند، نمونه‌های $^{+}$١به میزان ١/١٠، نمونه‌های $^{+}$٢و $^{+}$٣ به میزان ١/٥٠ توسط بافر فسفات (PBS) رقیق شدند .در این تحقیق جهت رقیق نمودن نمونه‌های ادرار که با نوار استریپ مثبت شده بودند از بافر بورات استفاده شد که برای تشکیل کمپلکس ایمنی تراکم یونی مناسبی را ایجاد می‌نماید (٩). بعد از رقیق شدن نمونه‌هایی که ماکروآلبومینوری داشتند آزمایش میکرو آلبومینوری بر روی نمونه های رقیق شده انجام شد ولی نتایج با میزان ماکروآلبمینوری آنها همخوانی نداشت، که می‌توان علت آنرا مربوط به حضور پروتئین‌های دیگر به غیر از آلبومین دانست.

دمای انکوباسیون در نتیجه آزمایش تاثیر فراوانی دارد .بالاترین میزان جذب نوری برای آلبومین ٥ دقیقه در ٢٥ درجه

www.SID.ir

Archive of SID

سانتیگراد و ۱۰ دقیقه در ۳۷درجه سانتیگراد بدست آمده است (٦). در این تحقیق انکوباسیون در حرارت آزمایشگاه انجام گرفته است. در مجموع به نظر می‌رسد که این روش، روش مناسبی برای اندازه‌گیری میکرو آلبومین در ادرار باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از سرکار خانم دکتر رستگار به علت کمک های شایان ایشان برای راه اندازی آزمایشگاه تحقیقاتی دکتر رضا رستگار در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1. Broch G., Anderson P.K.and Dekert T. The effect of proteinuria on relative mortality in type 1 (insulin dependent) diabetes mellitus Diab to Log-a 1985; 28,5: 590-596.

2. Spooner R.J, Weir R. J., and Feier B. M. Detection of microalbuminuria in diabetic patients using a simple latex agglutination test. Clinica Chemica Acta 1987 ;166 : 247-253.

3. Biou D., Therond P., Israel A, and Dekert T. Rapid assessment of albumin concentration by Immuonoturbidimetry. Clinical Chemistry 1985; 32,4: 620-621.

4. Hudson L. ., Hay F.c. Practical Immunology 3rd ed Blackwell 1991 P: 471, 468,14,15,2.

5. Palolhemo L., Pajari-Backas M., Pitkahen E.,Melammies I. and Rissanen R. Evaluation of an immunoturbidmetric microalbuminuria assay. J. Clin .Chem.Clinbiochem 1987; 25,12 : 889-892.

6. Rifal N., Gubar K. and Silverman L. Immunoturbidimetry :An attractive technique for the determination of urinary albumin and transferin. Clinical Biochemistry 1987 ; 20 :179-181.

7- Medcalf E , Newman DJ., Gorman E. and Price C. Rapid latex enhanced turbidimetric assay for urine albumin. Ann Clin Biochem 1988 ;25 : 164-165.

8. Bakker A.G. Immuonoturbidimetry of urinary albumin ,prevention of adsorption of albumin , influence of other urinary constituents. Clinical Chemistry 1988 ; 34 , 1 : 82-86.

9. Newman DJ., Thakkar H., Medcalf EA , Gray MR.and Price C. Use of urin albumin measurement as a replacement for total protein Clinical Nephrology 1995 ;43,2: 104-109.

www.SID.ir