

مقایسه اندازه‌گیری سطح آلبومین به روش ایمونوتوریدومتري در سه شیوه مختلف نمونه‌گیری ادراری برای غربالگری آلبومینوری در بیماران دیابتی

فاطمه محمدزاده^۱، کبری امیدفر^{۱*}، رامین حشمت^۱، مظاهر رحمانی^۱، باقر لاریجانی^۱

چکیده

مقدمه: میکروآلبومینوری یک علامت زودرس از ضایعات کلیوی دیابت است که به‌عنوان یک عامل مستقل پیش‌بینی‌کننده حوادث کاردیوواسکولر در این بیماران عمل می‌کند. روش‌های مختلفی هم برای جمع‌آوری نمونه و هم برای بررسی آزمایشگاهی میزان آلبومینوری وجود دارد. هدف از انجام این مطالعه مقایسه روش‌های جمع‌آوری ادرار در سنجش آلبومینوری با استفاده از روش کمی ایمونوتوریدومتري به‌عنوان روشی که پس از HPLC از دقت و حساسیت قابل قبول برخوردار است می‌باشد.

روش‌ها: طی یک مطالعه مقطعی در نمونه‌ای تصادفی از بیماران دیابتی در سال ۱۳۸۵، یک نمونه ادرار ۲۴ ساعته (Timed 24-hours) و سپس در روز بعد یک نمونه ادرار شبانه ۸ ساعته (Overnight timed collection) و یک نمونه ادرار راندوم صبحگاهی (Spot urine sampling) تهیه و به روش ایمونوتوریدومتريک سطح آلبومین در آنها اندازه‌گیری شد. ضرایب همبستگی و هم‌خوانی بین ۳ روش مختلف به شیوه کمی و کیفی (طبقه‌بندی شده) محاسبه گردید.

یافته‌ها: ۴۷ بیمار دیابتی مورد مطالعه (۴۶ نفر دیابت نوع ۲ و ۱ نفر دیابت نوع ۱) در محدوده سنی ۲۰-۸۵ سال قرار داشتند. بین ۲ روش نمونه‌گیری ادرار شبانه (۸ ساعته) و نمونه ادرار راندوم صبحگاهی با نمونه ادرار ۲۴ ساعته از نظر تشخیص میکروآلبومینوری همبستگی قابل قبولی وجود داشته و هم‌چنین ضریب هم‌خوانی (کاپا) برای دو روش جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته با ادرار شبانه ۰/۸۷۶ و بین دو روش ادرار ۲۴ ساعته با ادرار راندوم صبحگاهی ۰/۹۳۶ و بین دو روش نمونه ادرار شبانه با نمونه ادرار راندوم ۰/۸۰۷ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود هم‌خوانی معنی‌دار و در حد عالی (Excellent) برای تشخیص میکروآلبومینوری بین این روش‌های جمع‌آوری می‌توان یکی از روش‌های جمع‌آوری ادرار شبانه و یا ادرار راندوم (صبحگاهی) را به‌جای ادرار ۲۴ ساعته در غربالگری آلبومینوری بیماران دیابتی به‌کار برد.

واژگان کلیدی: میکروآلبومینوری، جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته، جمع‌آوری ادرار شبانه (۸ ساعته)، نمونه ادرار راندوم، هم‌خوانی، غربالگری، غربالگری

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، کدپستی ۱۴۱۱۴؛ تلفن: ۳-۸۸۰۲۶۹۰۲؛ نمابر: ۸۸۰۲۹۳۹۹؛ پست الکترونیک: emrc@sina.tums.ac.ir

مقدمه

در بسیاری از کشورهای جهان نروپاتی دیابتی علت اصلی End Stage Renal Disease (ESRD) است [۱]. میکروآلبومینوری یک علامت زودرس از ضایعات کلیوی دیابت است که در دیابت نوع ۱ و ۲ دیده می‌شود و پیش‌بینی‌کننده نروپاتی دیابتی و پیشرفت به سمت ESRD است [۲]. آلبومینوری یک عامل پیش‌بینی‌کننده مستقل برای حوادث کاردیوواسکولر در بیماران دیابتی است. شناسایی حضور آلبومین به مقدار کم در ادرار به عنوان یک راهکار تشخیص ریسک ابتلا به ضایعات کلیوی نه تنها در بیماران دیابتی بلکه همچنین در پیگیری تشخیص و درمان بیماران با فشار خون بالا و در عفونت‌های حاملگی نیز قابل استفاده می‌باشد [۳-۶]. دفع آلبومین در ادرار را می‌توان در نمونه ادرار جمع‌آوری‌شده در ۲۴ ساعت و یا در طول شب اندازه‌گیری نمود [۴ و ۵]. هم‌چنین اندازه‌گیری نسبت آلبومین به کراتینین در یک نمونه ادرار راندوم و یا اندازه‌گیری غلظت آلبومین در یک نمونه ادرار صبحگاهی هم تست‌های قابل قبولی برای غربالگری میکروآلبومینوری هستند [۳]. هدف از این مطالعه مقایسه اندازه‌گیری سطح آلبومین به روش ایمونوتوربیدومتری در سه روش نمونه‌گیری ادراری (جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته - جمع‌آوری ادرار شبانه و نمونه ادرار راندوم) برای غربالگری آلبومینوری در بیماران دیابتی می‌باشد.

روش‌ها

این مطالعه به صورت مقطعی و در فاصله بهمن ۸۴ لغایت خرداد ۸۵ در بیمارستان شریعتی تهران صورت پذیرفت. تعداد ۴۷ بیمار بین سنین ۲۰ تا ۸۵ سال میانگین (۱۲ ± ۵۶/۹۵ سال) که ۴۶ نفر آنها مبتلا به دیابت نوع ۲ و ۱ نفر دیابت نوع ۱ و مدت‌زمان ابتلا به دیابت در آنها بین ۱ تا ۲۲ سال (میانگین ۶/۵ ± ۹/۴) بود، از بین بیماران مراجعه‌کننده به درمانگاه دیابت در این طرح وارد شدند.

معیارهای خروج از طرح شامل: عفونت‌های ادراری (از همه بیماران آزمایش تجزیه ادرار جهت بررسی

پیوری، هم‌چوری و باکتریوری انجام شد)، نارسایی قلب پیشرفته (Function class III, IV)، تب، ورزش شدید در زمان نمونه‌گیری، $HgA1c > 9$ ، فشار خون کنترل‌نشده، $FBS > 180 \text{ mg/dl}$ در روز جمع‌آوری نمونه، بودند. از همه بیماران یک نمونه ادرار ۲۴ ساعته و یک نمونه ادرار شبانه (۸ ساعته) و یک نمونه راندوم ادرار صبحگاهی در ۲ روز متوالی اخذ شد. سپس میزان آلبومین ادرار به روش کمی ایمونوتوربیدومتری با کیت RANDOX(MA 2426) در هر ۳ نمونه ادراری اندازه‌گیری شد. در نمونه ادرار ۲۴ ساعته کراتینین ادرار جهت ارزیابی جمع‌آوری صحیح اندازه‌گیری شد. حضور آلبومین در ادرار با میزان‌های ۲۹۹-۳۰ میلی‌گرم در ادرار ۲۴ ساعته و ۱۹۹-۲۰ میکروگرم در دقیقه در نمونه ادرار شبانه و ۲۹۹-۳۰ میکروگرم در میلی‌گرم کراتینین در نمونه ادرار راندوم معادل میکروآلبومینوری و بیشتر از مقادیر ذکرشده نشان‌دهنده ماکروآلبومینوری می‌باشد. همچنین مقادیر کمتر از حدود فوق طبیعی در نظر گرفته می‌شود.

اطلاعات بیماران و داده‌های حاصل از سه روش جمع‌آوری ادرار در نرم‌افزار آماری SPSS ویرایش ۱۱/۵ وارد شده و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. علاوه بر تحلیل‌های توصیفی میزان انحراف آزمون‌ها از همدیگر محاسبه و همبستگی بین آنها به شکل کمی و با توجه به توزیع غلظت آلبومین با استفاده از آزمون Pearson's Correlation با در نظر گرفتن سطح معنی‌داری $P < 0/05$ سنجیده شد. پس از طبقه‌بندی تشخیصی در هر یک از روش‌های جمع‌آوری، هم‌خوانی آنها در جداول 3×3 با استفاده از محاسبه ضریب توافق کاپا (Kappa) بررسی گردید. پیش از شرکت در مطالعه توضیحات لازم در خصوص مطالعه، اهداف آن و روش‌های جمع‌آوری ادرار به بیماران داده شد و از تمامی شرکت‌کنندگان رضایت‌نامه اخذ گردید.

یافته‌ها

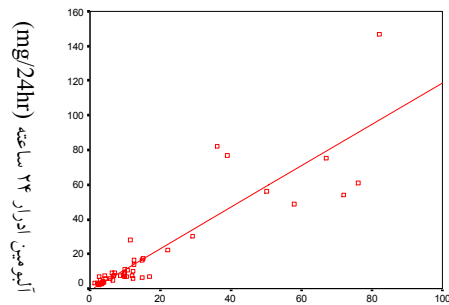
در بین ۴۷ بیماری که نتایج مورد آنالیز قرار گرفت، در جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته ۳۷ نفر (۷۸/۷٪) دفع

آلبومین نرمال و ۹ نفر (۱۹/۱٪) میکروآلبومینوری و ۱ نفر (۲/۱٪) ماکروآلبومینوری و با روش جمع‌آوری ادرار شبانه ۸ ساعته ۳۷ نفر (۷۸/۷٪) نرمال و ۹ نفر (۱۹/۱٪) میکروآلبومینوری و ۱ نفر (۲/۱٪) ماکروآلبومینوری با روش نمونه ادرار رانندوم ۳۸ نفر (۸۰/۹٪) دفع آلبومین نرمال و ۸ نفر (۲۰/۱٪) میکروآلبومینوری و ۱ نفر (۲/۱٪) ماکروآلبومینوری تشخیص داده شدند. (جدول ۱) ضرایب توافق (Kappa) محاسبه شده بین جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته با جمع‌آوری ادرار شبانه

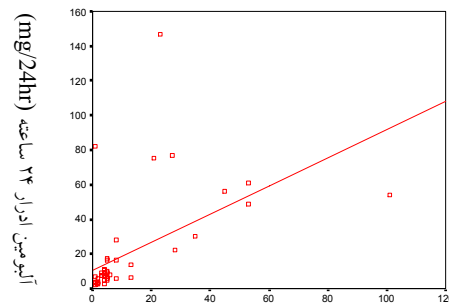
جدول ۱- مقایسه همخوانی بین روشهای مختلف جمع‌آوری ادرار در تشخیص نوع آلبومینوری

جمع کل	نمونه ادرار رانندوم			نمونه ادرار شبانه ۸ ساعته				
	ماکروآلبومینوری	میکروآلبومینوری	نرمال	ماکروآلبومینوری	میکروآلبومینوری	نرمال		
۳۷	۰	۰	۳۷	۰	۱	۳۶	نرمال	نمونه ادرار ۲۴ ساعته
۵	۰	۸	۱	۰	۸	۱	میکروآلبومینوری	
۱	۱	۰	۰	۱	۰	۰	ماکروآلبومینوری	
۴۷	۱	۸	۳۸	۱	۹	۳۷	جمع	
Kappa = ۰/۹۳۶			Kappa = ۰/۸۷۶					

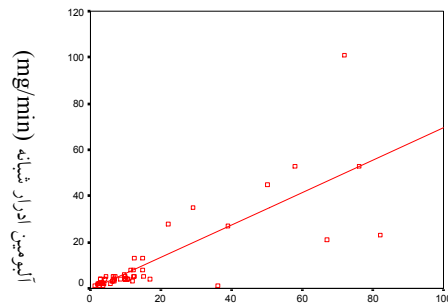
* بین آلبومین نمونه ادرار رانندوم و نمونه ادرار شبانه ۸ ساعته Kappa = ۰/۸۰۷



آلبومین ادرار ۲۴ ساعته (mg/24hr) vs آلبومین ادرار رانندوم (µg/mg)
ضریب همبستگی ۰/۸۸۷، P=۰/۰۰۰۱



آلبومین ادرار شبانه (µg/min) vs آلبومین ادرار ۲۴ ساعته (mg/24hr)
ضریب همبستگی ۰/۵۲۹، P=۰/۰۰۰۱



آلبومین ادرار شبانه (mg/min) vs آلبومین ادرار رانندوم (µg/mg)
ضریب همبستگی ۰/۷۹۷، P=۰/۰۰۰۱

شکل ۱ - نمودارهای پراکنندگی مربوط به همبستگی میزان آلبومین بین روش‌های مختلف جمع‌آوری ادرار

(High Performance Liquid Chromatography): HPLC یکی از دقیق‌ترین روش‌ها به منظور اندازه‌گیری آنالیت‌ها می‌باشد. مطالعات نشان داده که ۵۰ درصد بیماران دیابتی که نتایج اندازه‌گیری آلبومین آنها در ادرار با روش‌های ایمونولوژیک منفی بوده توسط این روش قابل شناسایی می‌باشند و به واسطه این روش می‌توان ضایعات کلیوی را در این بیماران ۴ سال زودتر از دیگر روش‌ها تشخیص داد [۷-۹].

معایب این روش هزینه بالای انجام آزمایش و همچنین دستگاه موردنظر می‌باشد.

۲- رسوب‌دهی:

انواع روش‌های رسوب‌دهی شامل جوشاندن، تری کلرواستیک اسید و سولفوسالسیلیک اسید می‌باشد [۱۰ و ۱۱]. این روش‌ها برای اندازه‌گیری پروتئین تام یک نمونه مورد استفاده قرار می‌گیرند.

۳- رنگ‌سنجی (Dye-binding):

انواع روش‌های رنگ‌سنجی شامل برادفورد، بیوره و آلبومین ۵۸۰ می‌باشد [۱۰ و ۱۱]. دو روش اول برای اندازه‌گیری پروتئین تام یک نمونه کاربرد داشته و آلبومین ۵۸۰ بطور اختصاصی برای اندازه‌گیری آلبومین استفاده می‌شود.

بطور کلی روش‌هایی با اساس رسوب‌دهی و Dye-binding حساسیت و دقت لازم را برای اندازه‌گیری آلبومین را دارا نمی‌باشند.

۴- روش‌های ایمونولوژیک

روش‌های ایمونولوژیک شامل ایمونواسی (رادایوایمونواسی، آنزیم ایمونواسی)، نفلومتری، ایمونوتوربیدومتری و... برای اندازه‌گیری کمی آلبومین و استریپ‌ها به منظور اندازه‌گیری نیمه کمی و کیفی آلبومین تاکنون طراحی شده‌اند [۱۰-۱۲]. روش‌های ایمونولوژیک از جمله ایمونوتوربیدومتری که در این تحقیق به منظور اندازه‌گیری آلبومین ادرار بیماران دیابتی استفاده گردیده، نسبت به سایر روش‌ها به جز HPLC از دقت و حساسیت بالاتری برخوردار بوده و همچنین دستگاه‌های مورد استفاده در بیشتر آزمایشگاه‌ها موجود می‌باشد.

۰/۸۷۶ و بین روش ادرار ۲۴ ساعته با نمونه ادرار راندوم ۰/۹۳۶ و بین نمونه ادرار راندوم با جمع‌آوری ادرار شبانه ۰/۸۰۷ بود که در جدول ۱ نیز آمده است. ضرایب همبستگی محاسبه شده با آزمون Pearson Correlation به شرح زیر بودند: بین روش جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته با شبانه ۰/۵۲۹ ($P=0/0001$)، بین روش جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته و نمونه ادرار راندوم ۰/۸۸۷ ($P=0/0001$) و بین روش جمع‌آوری ادرار شبانه با نمونه ادرار راندوم ۰/۷۹۷ ($P=0.0001$). نمودارهای پراکنندگی مربوط به همبستگی بین روش‌ها در شکل ۱ آمده است.

بحث

آلبومین یکی از پروتئین‌های سرم با بار منفی و وزن مولکولی ۶۶ کیلوالتون می‌باشد. بعد از فیلتراسیون گلوبولین، مقداری از آلبومین توسط سلول‌های اپی‌تلیال لوله‌ها مجدداً جذب و توسط پروتئازهای موجود در این سلول‌ها مولکول آلبومین به قطعات با وزن مولکولی متفاوت تبدیل شده، مجدداً به مایع لوله‌های ادراری ترشح می‌شود. هم‌چنین آلبومین می‌تواند بواسطه التهابات ایجاد شده در هر مکانی از لگنچه گرفته تا لوله‌های ادراری در ادرار وارد شود. مولکول کامل آلبومین از منشا گلوبولین اصلی آلبومین در ادرار در غیاب التهاب بوده و قطعات کوچک آلبومین در ادرار در این وضعیت کمتر مشاهده می‌شوند. هم‌چنین قابل ذکر است که مولکول کامل آلبومین ترشح شده به داخل ادرار در مراحل ابتدایی بیماری کلیوی، شکل اصلی ترشح آلبومین به داخل ادرار بوده و این مولکول‌ها بواسطه تغییراتی که در ساختمان دوم و سوم پروتئینی آنها به علت تخریب باندهای دی‌سولفیدی روی می‌دهد، با سنجش‌های ایمنی قابل ارزیابی نمی‌باشند [۸].

آلبومین در مایعات بیولوژیک با بکارگیری روش‌های سنجش متفاوت قابل اندازه‌گیری بوده که هر کدام دارای معایب و مزایایی می‌باشند که به ترتیب در زیر به آنها اشاره می‌شود:

۱- روش کروماتوگرافی

در مطالعه Ng WY که باز هم میزان آلبومین را در نمونه‌های مختلف مثل مطالعه فوق مقایسه کرده است، جهت یافتن میکروآلبومینوری نسبت آلبومین به کراتینین در ادرار راندم در مقایسه با آلبومین ادرار ۲۴ ساعته حساسیت ۷۱/۴٪ و ویژگی ۹۸٪ و غلظت آلبومین در نمونه ادرار راندم در مقایسه با ادرار ۲۴ ساعته حساسیت ۶۴/۳٪ و ویژگی ۹۶/۱٪ داشته است [۱۳].

در مطالعه حاضر با بکارگیری روش‌های مختلف جمع‌آوری نمونه‌های ادراری، غلظت آلبومین نمونه‌ها ارزیابی شد. در این مطالعه غلظت آلبومین با روش واحد ایمونوتوریدومتری که یک روش کمی بوده و پس از HPLC از حساسیت و ویژگی بالا و هزینه قابل قبولی برخوردار است، اندازه‌گیری شده است. با توجه به همخوانی روش‌های فوق، می‌توان یکی از روش‌های جمع‌آوری ادرار شبانه (Timed collection) و یا نمونه‌گیری ادرار راندم صبحگاهی را بجای جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته جهت یافتن میکروآلبومینوری بکار برد که این نتیجه با نتایج مطالعات قبلی همخوانی دارد. بر اساس این مطالعه به نظر می‌رسد در آینده نیاز هست که حساسیت و ویژگی روش ایمونوتوریدومتری در نمونه‌های مختلف جمع‌آوری ادرار در گروه‌های خاص بیماران مثل بیماران مبتلا به ماکروآلبومینوری بررسی گردد.

در سایر مطالعات انجام شده، اگرچه حساسیت و ویژگی‌های بدست آمده برای سنجش آلبومین در نمونه‌های مختلف ادراری مثلاً نمونه راندم صبحگاهی با ادرار ۲۴ ساعته و یا نمونه ادرار شبانه ۸ ساعته با ادرار ۲۴ ساعته در حد خوبی بوده است، اما اکثر این مطالعات متدهای مختلف آزمایشگاهی را (کمی، نیمه کمی و کیفی) در هر مطالعه به کار برده‌اند. مثلاً در مطالعه Khawali که میزان آلبومین ادرار راندم (با روش نیمه کمی کیت $\text{DCA 2000}^{\text{®}}$) را با آلبومین ادرار شبانه (به روش کمی ایمونوتوریدومتری) مقایسه کرده است، آلبومین ادرار راندم نسبت به آلبومین ادرار شبانه (به عنوان روش استاندارد) در تشخیص میکروآلبومینوری حساسیت ۵۰٪ و ویژگی ۱۰۰٪ و از نظر همخوانی ضریب توافق ۹۸/۰ با $P < ۰/۰۰۱$ داشته است [۴].

در مطالعه Gansevoort نسبت آلبومین به کراتینین و غلظت آلبومین موجود در یک نمونه ادرار راندم با آلبومین ادرار ۲۴ ساعته مقایسه شدند. حساسیت غلظت آلبومین در ادرار راندم در مقایسه با نسبت آلبومین به کراتینین تفاوت معنی‌داری نداشته و هر دو در مقایسه با ادرار ۲۴ ساعته حساسیت ۸۵٪ داشته‌اند، همچنین تفاوت موجود در ویژگی این دو روش در مقایسه با ادرار ۲۴ ساعته ناچیز بوده است (۸۵٪ در مقابل ۸۷٪) [۳].

مآخذ

1. Khatami Z, Mcilveen DW, Nesbitt SG. Screening for microalbuminuria by use of microproteinuria. *East Mediteer Health J* 2005; 11: 358-65.
2. Pfat T, Franz U, Herfeld F. Rapid immunochromatographic strip test for the detection of albuminuria and brief literature review on albuminuria screening. *Eur J Med Res* 2006; 11: 3-6.
3. Gansevoort RT, Verhave JC, Hillege HL. The validity of screening based on spot morning urine samples to detect subjects with microalbuminuria in the general population. *Kidney Int (Suppl)* 2005; 94: S25-35.
4. Khawali C, Andriolo A, Ferreira SR. Comparison of methods for urinary albumin determination in patients with type 1 diabetes. *Braz J Med Biol Res* 2002; 35: 337-43.
5. Meinhardt U, Ammann RA, Fluck C. Microalbuminuria in diabetes mellitus: efficacy of a new screening method in comparison with timed overnight urine collection. *J diabetes complications* 2003; 17: 254-7.
6. Romundstad S, Holmen J, Hallan H, Kvenild K. Microalbuminuria, cardiovascular disease and risk factors in a nondiabetic/ nonhypertensive population. The Nord-Trøndelag Health study (HUNT, 1995-97). *Journal of internal medicine* 2002; 252: 164-172.
7. Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A Comparison of immunonephelometry with

- HPLC. *Kidney Int* (supp 1) 2004; 92: S69-75.
8. Peters T. New form of urinary albumin in early diabetes. *Clin Chem* 2004; 12: 2238-2239.
 9. Comper WD, Osika TM, Jerums G. High Prevalance of immuno unreactive intact albumin in diabetic patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 4: 336-342.
 10. Hill PG. The measurement of albumin in serum and plasma. *Ann clin Biochem* 1985; 22: 565-78.
 11. Kessler Manfred A, Meinitzer Andreas, petek walter and wolfbeis oTTo S. Microalbuminuria and borderline-increased albumin excretion determined with a centrifugal analyzer and the albumin blue 580 fluorescence assay. *Clinical chemistry* 1997; 43: 996-1002.
 12. Larijani B, Javadi A, Shafae M. Screening for microalbuminuria in the early detection of diabetic nephropathy : A cheap and simple method. *Acta medica iranica* 2004; 40: 65-68.
 13. Ng WY, Lui KF, Thai AC. Evaluation of a rapid screening test for microalbuminuria with a spot measurement of urine albumin-creatinine ratio. *Ann Acad med Singapore* 2000; 29: 62-5.