کیت ایمونو آنزیماتیک (EIA) پادتن علم (۹۶ تستی)

Micro-Albumin

موارد استفاده:
تعیین کمّی Albumin ادرار

I. مقدمه:

آلبومین با وزن مولکولی تقریبی kDa ۶۶ بیشترین پروتئین پلاسما را تشکیل می‌دهد. در افراد سالم مقدار دفع آلبومین در ادرار ناچیز است. در حالیکه در بیماران مبتلا به نارسائیهای کلیوی افزایش چشمگیری می‌یابد و می‌تواند به غلظتهای بالاتر از µg/ml ۲۰۰ (Proteinuria) برسد. قبل از بروز پروتئین اوریا (Proteinuria) ، به میزان دفع آلبومین ادراری در غلظت‌های بین µg/min ۲۰ تا µg/min ۲۰۰ معادل mg/24h ۳۰ تا mg/24h ۳۰۰ که نشانگر شروع ضایعات کلیوی است، میکرو آلبومین اوریا (Micro-albuminuria) گفته می‌شود.
تعیین غلظت آلبومین در مرحله میکرو آلبومین اوریا شاخص ارزشمندی در بررسی عوارض کلیوی بیماران مبتلا به دیابت ملیتوس بوده و می‌تواند در کنترل و پیگیری نفروپاتی دیابتیک موثر باشد. [۱-۵]
علاوه بر بیماری دیابت ،آزمایش میکروآلبومین اوریا در بررسی عملکردکلیوی بانوان باردار [۱۰]، بیماران مبتلا به بیماریهای قلبی - عروقی [۶-۹] و همچنین پیگیری عوارض کلیوی مصرف برخی از داروها ، هورمون ها و نفروتوکسین ها نیز حائز اهمیت می باشد.

II. اصول اندازه‌گیری:

کیت اندازه گیری کمی میکروآلبومین در ادرار بر مبنای سنجش واکنش ایمونوآنزیماتیک روی فاز جامد طراحی شده است. در این سیستم از دو آنتی بادی که شاخص‌های آنتی ژنیک متمایزی را روی مولکول آلبومین شناسایی می کنند، استفاده شده است. جهت اندازه‌گیری آلبومین، ابتدا به حفره‌های پلی استایرن پوشیده شده با آنتی بادی پلی کلونال ضد آلبومین، استانداردها، کنترل ها و نمونه های بیماران افزوده می شود. سپس آنتی بادی دوم ضد آلبومین که به آنزیم پراکسیداز (HRP)متصل شده است به حفره ها افزوده می شود. درحین انکوباسیون، آلبومین موجود در نمونه ها از طرفی به آنتی بادی های ضد آلبومین متصل به پلیت و از طرف دیگر به آنتی بادی دوم ضد آلبومین که به آنزیم پراکسیداز (HRP)متصل شده است وصل می شود. بقیه مواد از طریق تخلیه و شستشو از سیستم خارج می شوند. پس از انکوباسیون و شستشو، با افزودن TMB ، آنزیم رنگ آبی ایجاد می کند .
رنگ‌زایی واکنش آنزیماتیک با افزودن محلول متوقف کننده خاتمه یافته، رنگ آبی ایجاد شده به رنگ زرد تبدیل می‌شود. شدت رنگ به وسیله یک اسپکتروفتومتر مخصوص میکروپلیت در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری می شود. منحنی استاندارد براساس جذب نوری غلظت هر استاندارد رسم می‌شود. غلظت آلبومین ادرار از روی منحنی استاندارد تعیین می‌شود. جذب نوری اندازه گیری شده با غلظت آلبومین موجود در نمونه نسبت معکوس دارد.

III. محتویات کیت:

محلولهای این کیت(Cat.No.P-MAI) جهت انجام ۹۶ تست بوده و تاریخ انقضای هر یک بر روی شیشه آن درج شده است. درجه مناسب برای نگهداری کیت ۲-۸ درجه سانتیگراد می‌باشد.

۱. **پلیت:** پلیت ۹۶ حفره‌ای پوشش داده شده با آنتی بادی‌های پلی کلنال ضد آلبومین خرگوش.

۲. **استانداردها:** ۷ ویال ۱/۰ میلی‌لیتری استاندارد میکروآلبومین حاوی آلبومین.(در محلول استانداردها از تیمروزال به عنوان نگهدارنده استفاده شده است.)

۳. **کنترل‌ها :** ۲ ویال ۱/۰ میلی لیتری محلول حاوی آلبومین انسانی.

۴. **ردیاب آنزیمی:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری آنتی بادی منوکلونال ضد آلبومین متصل به پراکسیداز (HRP) محلول در بافر، حاوی پروتئین و تیمروزال.

۵. **محلول شستشوی غلیظ (۲۰X):** یک ویال ۱۲ میلی لیتری ۲۰ PBS-Tween و تیمروزال.

۶. **محلول رنگ زا:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری بافر حاوی H_2O_2 و TMB

۷. **محلول متوقف کننده واکنش:** یک ویال ۱۲ میلی لیتری H_2SO_4 دو نرمال.

IV. وسایل مورد نیاز (این وسایل همراه کیت عرضه نمی‌شوند):

۱. دستگاه اسپکتروفتومتر میکروپلیت با دامنه جذب نوری ۳-۰ در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دیفرانسیل ۶۳۰
۲. میکروپیپت قابل تنظیم بر روی ۲۵ و ۱۰۰ میکرولیتر.
۳. آب مقطر یا آب دیونیزه برای رقیق کردن محلول شستشو

V. نحوه جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌ها:

نمونه مناسب جهت اندازه‌گیری میکروآلبومین، ادرار بدون نگهدارنده می‌باشد. نمونه‌های ادرار نباید آلودگی عفونی یا پروتئینی غیرادراری (خون، سرم..) داشته باشند. از آنجایی که مقدار آلبومین دفع شده بعد از فعالیت ورزشی تغییر می کند و نیز مقدار دفع آن در ساعات مختلف روز متغیر است توصیه می گردد این آزمایش بر روی اولین ادرار روز انجام گردد و همچنین نمونه هایی که به دنبال یک فعالیت شدید ورزشی جمع‌آوری شده‌اند یا دارای pH کمتر از ۴ یا بیشتر از ۸ هستند، مجددا ارزیابی گردند. [۱۱-۱۲]
این نمونه‌ها به مدت ده روز در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است. لطفاً از فریز کردن نمونه ها اکیداً خودداری شود. جهت حذف نمونه های مثبت کاذب بر اثر Matrix effect حتماً اعداد بالای µg/ml ۲۰۰ را مجدداً با محلول رقیق کننده کیت به نسبت ۱/۲ یا ۱/۳ رقیق کرده و مجدداً بررسی شوند.بدیهی است اگر غلظت نمونه رقیق شده مناسب با فاکتور رقت بدست نیاید اثر ماتریکس تائید می شود و غلظت بدست آمده از رقت باید گزارش شود.

VI. روش کار:

قبل از شروع کار باید دمای تمامی محلولها به دمای اتاق برسد.

یک حجم از محلول شستشوی غلیظ را با ۱۹ حجم آب مقطر یا دیونیزه رقیق نمایید. این محلول به مدت ۷ روز در درجه حرارت ۲-۸ درجه سانتی گراد پایدار است. در صورت مشاهده کریستال در محلول غلیظ شستشو ، ویال را به مدت چند دقیقه در۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید تا محلول یکنواخت گردد.

۱.ابتدا ۲۵ میکرولیتر از استانداردها،کنترل‌ها و ادرار بیماران را در داخل حفره‌ها ریخته، سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از ردیاب آنزیمی را به حفره‌های مربوطه اضافه نمایید.

۲.محتویات پلیت را به مدت ۱ دقیقه بر روی میز تکان داده و به خوبی مخلوط نمائید.

۳.پلیت را با برچسب مخصوص پوشانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار دهید.

۴.حفره‌ها را ۴ بار با ۳۰۰ میکرولیتر محلول شستشو بشویید.

۵.به هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از سوبسترای TMB اضافه نمایید و به آرامی تکان دهید.

۶.پلیت را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در محلی تاریک قرار دهید.

۷.۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده واکنش در هر حفره ریخته و به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط کنید.

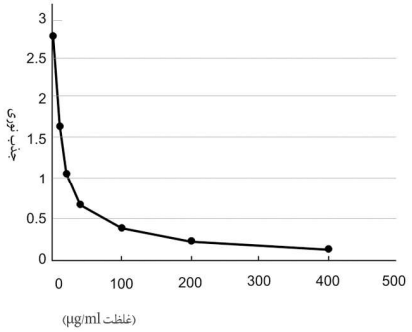
۸.میزان جذب نوری حفره‌ها را در طول موج ۴۵۰ نانومتر (با طول موج دیفرانسیل ۶۳۰ نانومتر) حداکثر تا ۱۵ دقیقه بعد از افزودن محلول متوقف کننده، بخوانید.

VII. محاسبه نتایج:

پس از تعیین میزان جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها و ترسیم منحنی استاندارد ، غلظت میکرو آلبومین بیماران را می توان محاسبه کرد. در منحنی مذکور که با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (قابل برنامه ریزی) و یا بصورت دستی ترسیم می شود ، محور Y شاخص میزان جذب نوری استاندارد های میکرو آلبومین در طول موج ۴۵۰ نانو متر و محور X شاخص غلظت استاندارد های میکرو آلبومین بر حسب µg/ml است . نتایجی که در جدول زیر آمده ، فقط مثال هستند و نباید برای تفسیر نتایج از آنها استفاده شود .

غلظت آلبومین(µg/ml)	جذب نور	نمونه
۰/۰	۲/۷۲	استاندارد A
۱۰	۱/٦٤	استاندارد B
۲۰	۱/۰٦	استاندارد C
٤۰	۰/٦۷	استاندارد D
۱۰۰	۰/۳۹	استاندارد E
۲۰۰	۰/۲۲	استاندارد F
٤۰۰	۰/۱۳	استاندارد G
٤٥	۰/٦۰	ادرار

برای ترسیم منحنی از ارزش های مندرج بر روی ویال استانداردها استفاده کنید.



میزان آلبومین دفع شده در نمونه‌ها بر مبنای میکروگرم در دقیقه (µg/min) گزارش می شود. این عدد با ضرب غلظت آلبومین بدست آمده از منحنی، در حجم نمونه (ml) تقسیم بر زمان جمع‌آوری (min) بدست می‌آید.

$$\frac{\text{غلظت آلبومین نمونه ادرار (µg/ml)} \times \text{حجم نمونه (ml)}}{\text{مدت زمان جمع‌آوری نمونه (۶۰× ساعت)}}$$

VIII. مقادیر طبیعی:

مقادیر طبیعی آلبومین ادراری با استفاده از نمونه ادرار ۱۱۷ فرد سالم (کمتر از ۵۰ سال) با کیت پادتن علم تعیین گردید. غلظت متوسط آلبومین در این نمونه‌ها ۵/۳ µg/ml با انحراف معیار ۲/۵ µg/ml است. براساس این مطالعه غلظت آلبومین در ادرار ۹۸٪ از این افراد کمتر از ۲۰ µg/ml است.
نتایج بد ست آمده در این بررسی منطبق با نتایج گزارش شده در کتب رفرانس و مقالات منتشر شده می باشد. [۱۴-۱۲]
توصیه می‌شود هر آزمایشگاه با در نظر گرفتن غلظت میکرو آلبومین افراد سالم، دامنهٔ طبیعی آن را تعیین و از آن به عنوان مبنای مقایسه خود استفاده نماید.

IX. ویژگی‌های اختصاصی تست:

۱. حساسیت: حداقل غلظت آلبومین قابل اندازه‌گیری بااین کیت ۰/۵ µg/ml می‌باشد.

۲. اثر Hook : در کیت میکرو آلبومین پادتن علم تا غلظت ۱۵۰ mg/ml اثر Hook مشاهده نشده است.

۳. اختصاصی بودن : اختصاصی بودن تست میکروآلبومین با اندازه‌گیری غلظت میکرو آلبومین بعد از افزودن مقادیر بالایی از :

ovalbumin (1 mg/dl)
Rat serum Albumin (1 mg/dl)
Mouse serum Albumin (1 mg/dl)
Bovine serum Albumin (1 mg/dl)
CRP (5 mg/dl)
Transferrin (2 mg/dl)

بررسی شده است.
بررسی نتایج بدست آمده تداخلی در نتایج آزمایش را نشان نمی‌دهد.

۴. مقایسه با روش nephelometry : برای بررسی آماری بین کیت EIA پادتن علم و روش نفلومتری غلظت آلبومین ۵۰۰ نمونه تصادفی با هر دو روش اندازه‌گیری شد.
مقایسه نتایج به دست آمده. ضریب همبستگی ۰/۹۷ را نشان می‌دهد.

۵. دقت: شاخص دقت کیت با مقایسه تکرارپذیری جواب‌ها به روش میان‌سنجی (Inter-assay) و درون‌سنجی (Intra-assay) تعیین گردیده است. برای این منظور ۴ نمونه ادرار ده بار در یک دوره آزمایش (درون‌سنجی) و یک بار در ده دوره آزمایش متفاوت (میان‌سنجی) تعیین غلظت شده است. نتایج انحراف معیار (SD) و ضریب تغییرات (CV) در جدول روبرو آمده است.

جدول شاخص دقت

	درون سنجی			میان سنجی		
	CV٪	SD	میانگین (µg/ml)	CV٪	SD	میانگین (µg/ml)
۱	۴/۸۴	۰/۶۱	۱۲/۷	۵/۵۱	۰/۷۰	۱۲/۸
۲	۳/۲۸	۰/۶۲	۱۹/۰	۲/۸۱	۰/۵۳	۱۸/۹
۳	۹/۰۱	۶/۳۱	۷۰/۰	۶/۵۵	۴/۳۷	۶۶/۷
۴	۵/۰۷	۸/۱۵	۱۶۰/۹	۴/۷۰	۷/۳۱	۱۵۵/۶

۶. ریکاوری و رقت : ریکاوری به حالتی اطلاق می‌شود که با افزودن حجم معینی از یک محلول با غلظت بالا به نمونه رقیق‌تر، افزایش غلظت حاصل شود. برای تعیین ریکاوری، محلولی با غلظت بالای آلبومین به نمونه ادراری که غلظت پائینی از آلبومین دارد. افزوده شده است. درصد ریکاوری طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\frac{\text{غلظت اندازه‌گیری شده µg/ml}}{\text{غلظت پیش‌بینی شده µg/ml}} \times ۱۰۰$$

دامنه درصد ریکاروی به دست آمده از ۹۶ **تا** ۱۱۰ درصد است.

جدول ریکاوری

ریکاوری٪	غلظت اندازه‌گیری شده µg/ml	غلظت پیش‌بینی شده µg/ml	غلظت افزوده شده µg/ml
–	۲۲/۸	–	–
۱۰۷	۹۸/۷	۹۲/۳	۸/۸
۱۱۰	۱۵۵/۸	۱۴۲	۱۷/۶
۹۶	۲۰۰/۶	۲۰۸/۲	۳۵/۲

برای بررسی خطی بودن رقتهای آلبومین بر روی منحنی چندین نمونه ادراری غلیظ، پس از رقیق شدن متوالی با استاندارد صفر، اندازه‌گیری شده و نتایج یک نمونه برای مثال در جدول زیر آورده شده است. دامنه درصد ریکاوری به دست آمده از ۱۰۳ تا ۱۰۷/۵ درصد است.

جدول رقت

ریکاوری٪	غلظت اندازه‌گیری شده µg/ml	غلظت پیش‌بینی شده µg/ml	رقت
–	۳۶۲	–	–
۱۰۳/۸	۱۸۷/۹	۱۸۱	۱:۲
۱۰۳	۹۳/۲	۹۰/۵	۱:۴
۱۰۷/۵	۴۸/۶	۴۵/۲	۱:۸

X. References

1. Morgensen C.E. et al. N. Engl. J. Med. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients N. Engl. J. Med., 1984, 311 : 89-93
2. Mogensen C.E. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. Kidney Int 1987; 31: 673-689.
3. Herman W. et al. Am J Kidney Dis. Pre-diabetes: clinical relevance and therapeutic approach. 1989 13, 2 .
4. Rowe DJF. et al. Microalbuminuria in diabetes mellitus: review and recommendations for the measurement of albumin in urine.Ann. Clin. Biochem.1990,27:297-312
5. Viberti GC et al. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. Lancet. 1982;1:1430–1432.
6. Gerstein HC. et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. JAMA. 2001;286:421–426.
7. Habball R et al. Prevalence of microalbuminuria in hypertension patients and its associated cardiovascular risk in clinical cardiology. Cardiovasc. J. Afr.2010; 4:200-5
8. Pallatini P. Microalbuminuria in hypertension. Curr Hypertens. Rep. 2003 ; 5: 208-214
9. Matsushita K, et at. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. Lancet. 2010;375:2073—2081.
10. Bouton E. Microalbuminuria and pregnancy. Is microalbuminuria predictive of pregnancy toxemia? J Gynecol Obstet Biol Reprod .1992; 21: 363-9
11. Jefferson IG. et al. Urine albumin to creatinine ratio-response to exercise in diabetes. Arch Dis Child. 1985: 60:305–310.
12. Marshall SM. Screening for microalbuminuria: which measurement? Diabet Med. 1991;8:706–711.
13. Tietz, N.W., Textbook of Clinical Chemistry Second Edition, Burtis E.A. and Ashwood, E.R. eds. W.B. Saunders Company, 1994.
14. Jones CA. et at. Microalbuminuria in the US population: third National Health and Nutrition Examination Survey. Am J Kidney Dis. 2002;39:445–459.

احتیاط!
با توجه به اینکه محلول‌های به‌کار رفته در این کیت‌ها حاوی مواد سمی مانند تیمروزال و مواد پروتئینی با منشا انسانی و حیوانی هستند، و اینکه با هیچ تستی نمی توان از عدم وجود ویروس‌هایی چون HCV، HBV، HIV در این محلول‌ها اطمینان کامل حاصل کرد، خواهشمند است هنگام کار احتیاط‌های لازم از جمله استفاده از دستکش، امتناع از خوردن و آشامیدن و سیگار کشیدن، خودداری از پیپت کردن با دهان و پرهیز از هرگونه تماس محلول با چشم و دست‌ها، رعایت شود.

Rev: Aug.2020

تهران ۱۴۱۶۸، خیابان طالقانی غربی، خیابان شهید سرپرست (کیوان جنوبی)، پلاک ۲۶
تلفن و فکس : ۶۳۴۸۱(۰۲۱)