مراد رستمی - کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
معصومه جرفی - کارشناس ارشد میکروب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
محمدعلی محمدی - کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک

اندازه گیری پروتیین ادرار ۲۴ ساعته

پروتیین دفع شده در ادرار ۲۴ ساعته یکی از شاخص های اصلی در تشخیص و پیگیری وضعیت بیماران دچار نارسایی های کلیه است. از آنجایی که اندازه پروتیین دفع شده گاهی نمایانگر مرحله نارسایی کلیه، سندروم نفروتیک، گلومرولونفریت، پروتیینوری، پره اکلامپسی و ... است، بدین روی دستیابی به نتیجه درست برای پزشک از ارزش ویژه‌ای برخوردار است.

درخواست انجام این آزمایش می تواند به انگیزه های زیر باشد:

- افزایش پروتیین در ادرار
- گلومرولونفریت
- سندروم همولیتیک اورمیک
- سندروم نفروتیک
- بیماری کلیه
- پره اکلامپسی

نسبت پروتیین دیده شده در ادرار بستگی به جذب آن توسط توبول های کلیه دارد. آلبومین، ۶۰ درصد پروتیین های ادرار را می سازد؛ زیرا آلبومین به وسیله توبول های کلیه به طور کامل برداشته نمی شود. مانده ی پروتیین ها را پروتیین تام هورسفال که ماده زمینه سیلندرها است تشکیل می دهد. با توجه به اینکه اندازه کمی پروتیین در روز از راه ادرار دفع می شود (۱۵۰-۲۰ میلی گرم در روز) و بیشتر آن هم آلبومین است، اندازه گیری پروتیین تام می تواند نمایانگر اندازه تراوش آلبومین از راه گلومرول ها باشد. روی هم رفته، پروتیین ادرار ۲۴ ساعته در هنگام تندرستی، کمتر از ۱۵۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت یا ۱۰ میلی گرم در روز است. این اندازه در جوانان سالم می تواند تا ۳۰۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت برسد. در کودکان نیز کمتر از ۱۰۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت است. به عبارتی اندازه پروتیین ادرار ۲۴ ساعته در کودکان بایستی کمتر از ۴ میلی گرم برای هر متر مربع سطح بدن در ساعت ($4\ mg/m^2/h$) باشد. ترکیب این پروتیین ها عبارت است از ۱۵-۱۰ میلی گرم آلبومین، بیش از ۳۰ گونه پروتیین پلاسما و گلیکو پروتیین هایی که از سلول های کلیه سرچشمه دارند. اما بیشترین اندازه آن را پروتیین تام-هورسفال (۲۵ میلی گرم) می سازد که از بخش پایین رو قوس هنله تراوش می شود.

پایه ی آزمایش

پایه ی اندازه گیری پروتیین در ادرار به صورت کمی، نیمه کمی و کیفی بر پایه روش های ایمونوشیمی، کدورت سنجی و شیمیایی با بهره گیری از نوارهای تشخیصی است. در این میان روش کدورت سنجی برای ساده بودن و ارزان تر بودن در بیشتر آزمایشگاه ها کاربرد بیشتری دارد. در این روش پروتیین ادرار با تری کلرو استیک اسید ۱۲/۵ درصد رسوب داده می شود. کدورت ایجاد شده متناسب با اندازه

پروتیین (آلبومین و گلبولین) موجود در ادرار است. غلظت پروتیین رسوب داده شده با در نظر گرفتن غلظت اسید، دما و زمان سپری شدن بین اضافه کردن اسید تا ایجاد رسوب پروتیین محاسبه می شود. روش ایمونوشیمی به دلیل نیاز به ابزار و مواد اختصاصی و هزینه بیشتر، رایج نبوده و روش نواری به دلیل کیفی بودن نتایج حاصله برای ادرار ۲۴ ساعته مورد استفاده قرار نمی گیرد.

روش های مورد استفاده در آزمایشگاه های تشخیص طبی ایران عبارتند از:

۱-روش اسید تری کلرو استیک (TCA) (کدورت سنجی در طول موج ۴۰۵ نانومتر): این روش برای اندازه گیری غلظت های ۷۰۰-۲۵ میلی گرم در لیتر پروتیین مناسب بوده و حداقل تاثیر پذیری در استفاده از مواد کالیبراسیون متفاوت را دارا است.

۲-روش اسید تری کلرو استیک (TCA) (کدورت سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر): این روش دارای کیفیت مناسبی در اندازه گیری غلظت های ۱۰۰۰-۱۰۰ میلی گرم در لیتر پروتیین است اما در استفاده از مواد کالیبراسیون مختلف، تاثیر پذیری بیشتری نسبت به روش کدورت سنجی با استفاده از TCA در طول موج ۴۰۵ نانومتر از خود نشان می دهد.

۳-روش اسید سولفو سالیسیلیک (SSA) (کدورت سنجی در طول موج ۶۲۰ نانومتر): این روش پایین ترین کیفیت درسنجش مقادیر کمتر از ۲۰۰ میلی گرم در لیتر پروتیین داشته و در استفاده از مواد کالیبراسیون مختلف، تاثیر پذیری قابل توجهی دارد.

با توجه به پژوهش های انجام شده در آزمایشگاه رفرانس، روش TCA با بهره گیری از طول موج ۴۰۵ نانومتر برای سنجش مقادیر کم پروتیین به عنوان روش انتخابی معرفی شده است.

جمع آوری نمونه

در سایه ی نوسان های طبیعی بدن که در درازای روز رخ می دهد، شاید که نیاز باشد تا آزمایش ها در زمان مشخصی از روز انجام شود. در زمان جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته، باید رژیم غذایی و دریافت مایعات شخص مانند روزهای پیشین باشد (مگر نظر پزشک درمانگر و یا آزمایشگاه غیر از این باشد). باید پیش و در هنگام زمان جمع آوری نمونه ادرار ۲۴ ساعته از خوردن الکل پرهیز کرد.

در این آزمایش می توان از ادرار به گونه ی انتخابی (راندوم) استفاده نمود. ولی ادرار ۱۲ یا ۲۴ ساعته بهتر است. شایان یادآوری است که نمونه ادرار ۱۲ یا ۲۴ ساعته باید تهی از ماده نگهدارنده جمع آوری شود و در تمام مدت نمونه گیری، ظرف نمونه در جای خنک و بهتر است در دمای یخچال ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری شود. برای این کار باید از ظرف تمیز و تهی از آلودگی استفاده نمود و به بیمار، روش جمع آوری ادرار ۲۴ ساعته داده شود. به این گونه که از ساعت ۸ بامداد تا ۸ بامداد روز دیگر، همه ی نمونه های پس از ساعت ۸ به طور کامل جمع آوری شود. ولی ادرار ساعت ۸ روز نخست دور ریخته شود.

برای انجام دیرتر آزمایش، می توان پس از اندازه گیری حجم ادرار، نمونه را خوب مخلوط نموده و بخشی از آن را تا روز انجام آزمایش نگهداری کرد. بهتر است پیش از انجام آزمایش، نمونه ادرار به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و از محلول رویی برای اندازه گیری اندازه غلظت پروتیین استفاده شود.

نمونه ادرار را نباید با دستمال کاغذی، مدفوع و یا هر چیز دیگری آلوده نمود.

دفع پروتیین در ادرار به گونه ی پیوسته، ثابت و مشخص نیست و در دوره های ۲۴ ساعته تغییر چشمگیری دارد. بنابراین برای اندازه گیری پروتیین دفع شده بهتر است از ادرار ۲۴ ساعته استفاده شود.

روش تهیه TCA ۱۰۰ درصد ذخیره

۱۷۵ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه را به یک ظرف دارای ۵۰۰ گرم از TCA می افزاییم. در ظرف را بسته و به آرامی تکان می دهیم تا خوب حل شود. سپس تمام مواد را به طور کامل به یک بالن ۵۰۰ میلی لیتری حجمی منتقل نموده و حجم کل را به ۵۰۰ میلی لیتر

می رسانیم. برای انحلال کامل طی مدت ۲۴ ساعت، گاهگاه محلول را با چرخش مخلوط می کنیم.

محلول TCA ۱۰۰ درصد ذخیره را در یک ظرف تیره و در دمای اتاق نگهداری می کنیم. این محلول به مدت ۱۲ ماه پایدار است.

به علت خورندگی TCA باید تهیه محلول با احتیاط و با محافظت از چشم ها و دست ها انجام گرفته و پس از پایان کار ظروف مورد استفاده کاملا شسته شوند.

روش تهیه TCA ۱۲/۵ درصد

(۷۶۵ میلی مول در لیتر)

با استفاده از پی پت حجمی ۲۵ میلی لیتری، اندازه ۲۵ میلی لیتر از محلول TCA ۱۰۰ درصد ذخیره را به یک بالن ژوژه ۲۰۰ میلی لیتری منتقل می کنیم و با استفاده از آب مقطر حجم آن را به ۲۰۰ میلی لیتر می رسانیم. محلول حاصله را خوب مخلوط کرده و در ظرف شیشه ای تیره و در دمای اتاق نگهداری می کنیم. این محلول در دمای اتاق به مدت یک ماه و در صورت نگهداری در یخچال تا مدت های خیلی طولانی، پایدار است.

همچنین می توان به طور مستقیم ۱۲/۵ گرم پودر TCA را در اندازه کمی آب مقطر حل کرده و سپس حجم را به ۱۰۰ میلی لیتر رسانید.

کنترل

از سرم کنترل های تجاری برای کنترل استفاده می شود. رقتی برابر ۱ به ۳۰۰ با استفاده از سرم فیزیولوژی تهیه می شود.

استاندارد

برای آزمایش های روزمره از سرم کنترل هایی با ارزش مرجع استفاده می شود. برای انجام کار نخست غلظت پروتیین این سرم کنترل ها را به اندازه ی که امکان وجود آن در ادرار است می رسانیم. (برای رقیق کردن از سرم فیزیولوژی استفاده می کنیم). لازم به ذکر است که این روش تا ۵۰۰ میلی گرم در لیتر خطی است؛ بنابراین نمونه ها اعم از ادرار و استاندارد باید به گونه ای رقیق شوند که غلظت پروتیین موجود در آن ها حداکثر ۵۰۰ میلی گرم در لیتر باشد.

از یک گونه نمونه کنترل نمی توان همزمان به عنوان کنترل واستاندارد استفاده نمود.

روش کار

● ۱۰ میلی لیتر از ادرار را سانتریفوژ کرده و سپس با استفاده از نوار ادراری پروتیین آن را بررسی نموده و نتیجه آن را ثبت می کنیم. اگر پروتیین آن بیش از یک پلاس (+۱) بود باید نخست نمونه ادرار را پیش از آغاز آزمایش با سرم فیزیولوژی رقیق نمود. اگر نیتریت بیمار مثبت باشد باید بیمار را برای نمونه گیری دوباره با رعایت شرایط نمونه گیری راهکنی نمود. در هنگام تکرار آلودگی نمونه، بیمار را برای مشاوره و نیاز به بررسی نتیجه ی کامل ادرار و شاید درخواست کشت ادرار به پزشک معرفی نمود.

نمونه هایی که پروتیین آن ها با استفاده از روش نواری ۱، ۲ و ۳ پلاس می شوند باید به ترتیب به نسبت های ۱ به ۵، ۱ به ۱۰ و ۱ به ۱۵ رقیق نمود.

● برای هر آزمایش (نمونه، کنترل و استاندارد) دو لوله، یکی به عنوان بلانک و دیگری به عنوان آزمایش در نظر می گیریم.

● ۱/۶ میلی لیتر از نمونه ادرار، استاندارد و کنترل را در لوله های وابسته ریخته و سپس ۰/۴ میلی لیتر از محلول TCA ۱۲/۵ درصد به همه لوله ها می افزاییم. سپس به آرامی لوله را مخلوط می کنیم. برای مخلوط نمودن لوله ها بهتر است سر لوله ها را با پارافیلم بسته و با واژگون کردن لوله ها آن ها را مخلوط کنیم. دما در این گام موثر بوده و بایستی در مرز میان ۲۷ تا ۲۳ درجه سانتیگراد باشد. لوله های بلانک را پس از ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می کنیم. سپس لوله های آزمایش را پس از ۳۵ دقیقه به خوبی مخلوط کرده و جذب نوری آن ها را در طول موج ۴۰۵ یا ۴۲۰ نانومتر در برابر محلول رویی لوله های بلانک می خوانیم. رعایت زمان ۳۵ دقیقه در این آزمایش ضروری است.

لوله ها / محلول	لوله آزمایش (میلی لیتر)	لولـه بلانـک (آزمایش) (میلی لیتر)	لوله کنترل (میلی لیتر)	لوله استاندارد (میلی لیتر)	لوله بلانک (میلی لیتر)
نمونه ادرار سانتریفوژ شده	۱/۶	۱/۶			
کنترل			۱/۶		
استاندارد				۱/۶	
سرم فیزیولوژی					۱/۶
TCA ۱۲/۵ درصد	۰/٤	۰/٤	۰/٤	۰/٤	۰/٤

هر نمونه باید در مقابل بلانک وابسته به خود اندازه گیری شود.

به آرامی لوله را مخلوط می کنیم (دمای ۲۷-۲۳ درجه). لوله های بلانک را پس از ۲۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ می کنیم. لوله های آزمایش را پس از ۳۵ دقیقه کاملا مخلوط نموده و جذب نوری آنها را در طول موج ۴۰۵ یا ۴۲۰ نانومتر در مقابل محلول رویی لوله های بلانک قرایت می کنیم.

کدورت حاصل از اضافه شدن TCA به ادرار به دلیل وجود آلبومین و گلبولین است.

محاسبه

میلی گرم پروتیین در ادرار ۲۴ ساعته =ضریب رقت کنترل × حجم ادرار ۲۴ ساعته (میلی لیتر) × فاکتور × جذب نوری آزمایش

$$\text{فاکتور } F = \frac{\text{غلظت استاندارد}}{\text{جذب نوری استاندارد}}$$

دامنه مرجع

با توجه به توانایی این روش برای سنجش مقادیر کم پروتیین (حدود ۲۵ میلی گرم در لیتر پروتیین و بیشتر)، از این روش می توان برای غربالگری وضعیت کلیه جمعیت های مستعد به بیماری کلیه مانند دچارشدگان به دیابت در راستای بررسی میکرو پروتیینوری استفاده نمود. در افراد سالم اندازه دفع پروتیین تام تا ۱۵۰ میلی گرم در ۲۴ ساعت ۱۵۰ mg/۲۴ hours و در بچه ها کمتر از ۴ میلی گرم برای هر متر مربع سطح بدن در هر ساعت ۴ mg/m²/hour» در ادرار طبیعی است.

نتایج مثبت و منفی کاذب

-PH قلیایی و پیگمان های ادرار باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب می شوند.

شاید میان پاسخ های به دست آمده از روش کدورت سنجی TCA و بررسی ادرار توسط نوارهای ادراری تفاوت وجود داشته باشد. دیدن نتایج منفی یا مقادیر کمی پروتیین با نوار ادراری و نتیجه مثبت با روش TCA به طور همزمان ممکن است به دلایل زیر باشد:

● وجود پروتیین میلوما (گاما گلبولین و پروتیین بنس جونز) در ادرار

●متابولیت های داروهای ویژه مانند Tolmetin و داروهای ضد التهاب که در درمان آرتریت روماتویید بکار می رود، می توانند با ناهمگن کردن نمونه، مایه ی پاسخ مثبت کاذب شود.

منابع

[1] Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diadnosis. 2006; 4th Edition.

[2] Henrys Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 2007; 21st Edition.

[3]Bernard JH. Clinical diagnosis and management by laboratory Methods. 19th Edition. New York. W.B.Saunders Company. 1996; PP: 142-147, 164-165, 241-243.

[4]Ginsberg JM, Chang BS, Matarese RA, et al: Use of single voided urine samples to estimate quantitative proteinuria.. N Engl J Med 1983; 309:1543-1546.

[5] Lawrence A. Kaplan and Amadeo J. Clinical chemistry. 5th Edition.1989

[۶]رستمی م. و جرفی م. آزمایش های جایگزین اندازه گیری پروتیین در ادرار ۲۴ ساعته. پزشک و آزمایشگاه. بهار ۱۳۸۸. سال هشتم. شماره ۳۸-۳۷. صفحات ۸-۷.