Review
Journal of Medical Council of Iran, Volume 42, Issue 2, 2024
https://doi.org/10.22034/42.2.14

The Basis of Classification of Biochemistry Medical Diagnostic Tests and Kits

Abstract

Background: Medical diagnostic laboratories use ready-to use kits to standardize methods and facilitate tests. In spite of the diversity of the manufacturers, the kits are generally prepared using the same methods and solutions. The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine acts as one of the authorities for evaluating, setting goals and providing recommendations for choosing test methods, but organizations such as the International Association for Laboratory Accreditation have also published guidelines in the form of the ISO 15189 standard. Familiarity with the molecular basis of kits enables the lab technician to identify possible errors and troubleshooting them. Therefore, in addition to practical skills, it is necessary for the technician to be familiar with the details of the testing method. Common methods can be traced back to the 18th century. The pervious literatures focused on specific analyt and presents their differences in terms of sensitivity and specificity while we reclassified the methods based on mechanism of actions.

Method: We searched PubMed, MEDLINE and the other databases for the most common articles discussing the basis and theory of testing and the technical details of the testing method and reviewed the literature by focusing on current Kit mechanisms.

Results: The review on the methodology of current medical diagnostic kits showed that they are based on several methods but could be categorized into peroxidase-based detection, chemical reaction, complex formation, enzymatic assays, and immune assays.

Conclusion: In general, the method of performing a reaction depends on the type of analyte. Therefore, it is obvious that the method of measuring rare metal elements is different from the method of measuring enzymes. The classification of these methods can promote the laboratory science significantly.

Key words: Biochemistry, kit, Laboratory, Reaction Mechanism

Farnaz Jahanbin, Shiva Mehran, Zafar Gholinejad*

[1] Lecturer, Department of Medical Laboratory Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[2] Student, Department of Medical Laboratory Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Science, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

*** Corresponding Author**
Ayatollah Rafsanjani Complex, Urmia Branch, Azad University, Selmas Road, Kilometer 2, Urmia, Iran
Email: ghzafar@yahoo.com

Received: Mar 09 2024
Accepted: Apr 20 2024

Copyright 2024, Journal of Medical Council of Iran.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution–NonCommercial 4.0 International License.

مقـاله مروری
Journal of Medical Council of Iran, Volume 42, Issue 2, 2024
https://doi.org/10.22034/42.2.14

اساس طبقه بندی آزمایشات و کیت‌های تشخیص طبی بیوشیمی

فرناز جهان بین[1]، شیوا مهران[2]، زعفر قلی نژاد[3]*

[1] مربی، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
[2] دانشجو، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
[3] استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

*** نشانی نویسنده مسئول:**
کیلومتر دو جاده سلماس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، مجتمع آیت الله رفسنجانی، ارومیه، ایران
نشانی الکترونیک: ghzafar@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۰۱

چکیده

زمینه: آزمایشگاه‌های تشخیص پزشکی از کیت‌های آماده به مصرف استاندارد جهت تسهیل تست‌ها استفاده می‌کنند. علیرغم تنوع تولیدکنندگان، کیت‌ها عموماً با روش‌های مشابه تهیه می‌شوند. فدراسیون بین‌المللی شیمی بالینی و پزشکی آزمایشگاهی به عنوان یکی از مراجع برای ارزیابی، تعیین اهداف و ارائه توصیه‌هایی برای انتخاب روش‌های آزمایش عمل می‌کند، اما سازمان‌هایی مانند انجمن بین‌المللی اعتبارسنجی آزمایشگاهی نیز دستورالعمل‌هایی را در قالب ISO 15189 منتشر کرده‌اند. آشنایی با پایه مولکولی کیت، تکنسین آزمایشگاه را قادر می‌سازد تا خطاهای احتمالی را شناسایی و عیب‌یابی کند. بنابراین لازم است تکنسین علاوه بر مهارت عملی، با جزئیات روش تست نیز، آشنا باشد. تاریخچه برخی روش‌های رایج به قرن هجدهم برمی‌گردد. در مطالعات قبلی تلاش کرده‌اند که برای یک آنالیت خاص، روش‌های مختلف را از نظر حساسیت و ویژگی بررسی نمایند. درحالیکه در این مطالعه ما به بازطبقه بندی روش‌ها بر اساس مکانیسم واکنش‌ها می‌پردازیم.

روش کار: در این مطالعه از پایگاه های اطلاعاتی PubMed و MEDLINE و دیگر پایگاه‌های اطلاعاتی را برای رایج‌ترین مقالاتی که در مورد مبانی و تئوری آزمایش و جزئیات تکنیکی روش های آزمایش بحث می‌کردند، جستوجو بعمل آمد و بررسی با تمرکز بر مکانیسم‌های کیت رایج فعلی مورد مطالعه مروری قرار گرفت.

یافته ها: بررسی روش‌شناسی کیت‌های تشخیصی پزشکی کنونی نشان داد که این کیت‌ها مبتنی بر روش‌های مختلفی هستند، اما می‌توان آنها را به تشخیص مبتنی بر پراکسیداز، واکنش شیمیایی، تشکیل کمپلکس، سنجش آنزیمی و سنجش ایمنی طبقه‌بندی کرد. با این حال با یک طبقه بندی می‌توان الگوهای مشابهی را بین آنها مشاهده نمود.

نتیجه گیری: بطورکلی روش انجام واکنش به نوع آنالیت بستگی دارد. بنابراین بدیهی است که روش اندازه گیری عناصر فلزی کمیاب با روش اندازه گیری آنزیم‌ها متفاوت است. طبقه بندی این روش‌ها می‌تواند به دانش آزمایشگاهی کمک نماید.

واژگان کلیدی: بیوشیمی، کیت، آزمایشگاه، مکانیسم واکنش

Copyright 2024, Journal of Medical Council of Iran.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution–NonCommercial 4.0 International License.

مقدمه

یکی از مهارت‌های مهم در کار آزمایشگاهی، آشنایی با اساس عملکرد تجهیزات و مکانیسم عمل کیت‌ها است. استفاده از تجهیز و روش مناسب می‌تواند منجر به حصول نتایج بهتر و دقیق‌تر شود (۱). بطور کلی تجهیزات آزمایشگاه‌های تشخیص طبی را می‌توان در دو دسته پیشرفته و ساده تقسیم‌بندی کرد. تجهیزات اتوآنالایزر بیوشیمی، تجهیز کمی لومینسانس هورمون، سلکانترهماتولوژی، الکتروفورزکاپیلاری و دستگاه Real time- PCR از جمله مهمترین تجهیزات آزمایشگاه تشخیص طبی هستند (۲). دستگاه اتوآنالایزر یک ربات آزمایشگاهی است که بواسطه دو اهرم که به انتقال نمونه و محلول‌ها می‌پردازد، متغیرهای مختلف بیوشیمیایی را اندازه‌گیری میکند (۳). کیت‌های استفاده شده در اتوآنالیزور همان کیت‌هایی است که بصورت دستی استفاده می‌شد. اساس کار اتوآنالیزور، اسپکتروفتومتری است (۳).

کلمه کیت kit در لاتین به مجموعه‌ای از وسایل و تجهیزاتی که برای رسیدن به یک هدف خاص نیاز است، تعریف شده است. کیت ممکن است مجموعه‌ای از کتب، جزوات و پادکست‌هایی برای آموزش یک زبان یا قبولی در کنکور باشد یا یک مجموعه از محلول‌های آماده به کار تهیه شده توسط کارخانجات برای اندازه‌گیری یک آنالیت باشد (۴). امروزه با توسعه کیت‌های آزمایشگاهی، خطای کار کاهش و تکرارپذیری آزمایش نیز افزایش یافته است. لذا اعتماد به نتایج نسبت به زمانی که، تمامی مواد و محلول‌های آزمایشگاه توسط فرد آزمونگر تهیه می‌شد، بیشتر شده است. کیت‌ها توسط شرکت‌های مختلفی تولید می‌شود و انواع محلول، حجم آنها، اصول کار و نگهداری آنها در بروشور کیت آمده است (۵). پس از خرید کیت لازم است آزمونگر بروشور همراه را مطالعه و نگهداری و اجرای آزمایش را مطابق آن انجام دهد. در بکارگیری اتوآنالیزور لازم است تمامی اصول فوق ارزیابی شود و هرگونه عدم انطباق از کیفیت نتایج باید گزارش، بررسی و رفع شود. لذا تأکید می‌شود که کنترل کیفی تجهیزات در آزمایشگاه‌های نسل جدید، اساسی ترین وظیفه آزمونگر باشد (۶).

در این مقاله ما مروری بر مهمترین موضوعات در حوزه استفاده و مکانیسم عمل کیت‌ها تأکید می‌شود.

روش ها

در این مطالعه رایج‌ترین روش‌های استفاده از کیت‌ها در بسیاری از کشورهای داخلی و خارجی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین اطلاعات مهمی در خصوص متدولوژی انواع تست‌ها در مقالات نمایه شده در PubMed و MEDLINE و سایر پایگاه‌های اطلاعاتی جمع آوری و روش‌هایی که اساس یکسان و یا مشابهی داشتند، طبقه بندی و تشریح شدند.

یافته‌ها

اطلاعات اولیه در مورد آنالیت مورد بررسی و اختلالات بالینی مرتبط با آن بصورت بسیار مختصر در بروشور ارائه می‌شود که باید با مطالعه جامع کتب و مقالات تکمیل شود تا بتوان به اهمیت بیومارکری آنالیت مورد بررسی پی برده و اهمیت آن را در تشخیص، پیش‌آگهی و مانیتورینگ بیمار درک نمود. دمای نگهداری یکی از مهمترین اطلاعات بروشور است. اصولاً کیت‌ها در یک دمای تعریف شده نگهداری می‌شوند ولی گاهاً ترکیبات حساس به دماهای بالاتر مانند پروتئینهای استاندارد از جعبه اصلی کیت برداشته شده و در دمای پایین‌تر نگهداری می‌شوند (۷). اصولاً دمای نگهداری و آزمایش یکسان نیست لذا قبل از استفاده از کیت باید محلول‌ها به دمای آزمایش برسند. اصولاً جهت سهولت کار و کاهش خطا، تمام محلول‌های کیت آماده استفاده (ready to use) هستند ولی گاهاً به دلایلی از قبیل ناپایداری محلول یا حجم بالای محلول در صورت رقیق شدن، محلول استوک را به شکل غلیظ در کیت ارائه می‌دهند که آزمون‌گر باید قبل از استفاده، آنرا رقیق کند. بروشورهای کیت در مورد مکانیسم اندازه‌گیری نیز توضیح می‌دهد که مکانیسم اندازه‌گیری می‌تواند یک واکنش آنزیمی باشد که طی آن یک ماده دارای جذب نوری تولید می‌شود یا اتصال آنالیت با یک ماده سبب ایجاد کمپلکس دارای جذب نوری می‌شود. درک مکانیسم واکنش می‌تواند به حل مشکلات متدولوژیکی آزمایش کمک کند.

یکی دیگر از مهمترین اطلاعات بروشور، تداخل سایر مواد با آزمایش اصلی است. مقادیر بالای هموگلوبین نتایج بسیاری از تست‌ها را مختل می‌کند. مصرف داروها می‌تواند نتایج مثبت و منفی کاذبی ایجاد کند. آنتی اکسیدانها و اکسیدانها می‌توانند اندازه‌گیری‌هایی که اساس آنها اکسیداسیون و احیا است را تحت تاثیر قرار دهند.

بروشور کیت، اطلاعاتی نیز در مورد عملکرد ارائه می‌دهد، بطوریکه هر کیتی دارای یک حد تشخیص است و استفاده از کیت و گزارش نتایج کمتر از حد تشخیص، بی‌اعتبار است (۸). عملکرد کیت در غلظت‌های بالا از خطی بودن نمودار جذب/غلظت خارج می‌شود. بدین معنی که با افزایش غلظت به همان مقدار، جذب نور افزایش نمی‌یابد. در این مورد لازم است نمونه رقیق شده و مجدداً اندازه‌گیری شود. رقیق‌سازی بر اساس پروتکل کیت و با محلول هایی مانند بافر فسفات سالین، آب مقطر و سایر محلول‌های فاقد آنالیت مدنظر انجام می‌شود (۹).

اصول ایمنی در بروشور کیت مهمترین خطرات استفاده از کیت شامل سمی بودن مواد، کارسینوژن بودن، خورنده یا سوزاننده بودن و غیره را به آزمونگر یادآوری می‌کند. هر چند تلاش‌ها برای حذف خطرات و افزایش ایمنی کادر آزمایشگاه در تحقیقات متدولوژیکی بسیار با اهمیت است، ولی استفاده از روش‌های حاضر مستلزم آگاهی از الزامات ایمنی است (۱۰).

کلیات روش شناسی یا متدولوژی

آشنایی با تئوری آزمایش و جزئیات تکنیکی روش آزمایش می‌تواند آزمونگر را جهت شناسایی خطاهای احتمالی و رفع کردن آنها توانمند سازد، لذا علاوه بر مهارت عملی، در اجرای یک آزمایش، لازم است که آزمونگر با جزئیات روش آزمایش آشنا باشد. با مروری به روش‌های رایج در کیت‌های امروزی می‌توان ردپایی از تاریخ را در آنها مشاهده کرد. معرف ارلیخ (Ehrich) برای ارزیابی اوروبیلینوژن و معرف ژافه (Jaffe) برای اندازه‌گیری کراتینین سرم و ادرار به کشفیات دو دانشمند آلمانی در سده 1800 برمی‌گردد (۱۲و۱۱). روش انجام یک واکنش به نوع آنالیت بستگی دارد، بعنوان مثال بدیهی است که نحوه اندازه‌گیری عناصر بویژه عناصر فلزی با نحوه اندازه‌گیری آنزیم‌ها متفاوت باشد. در این فصل ما به یک رویکرد کلی و طبقه‌بندی کلی این روش‌ها می‌پردازیم.

اندازه‌گیری برخی از متغیرها بر اساس واکنش‌های اکسیداسیون و احیا می‌باشد بطوریکه در ازای اکسیداسیون مولکول اندازه‌گیری شونده پراکسیدهیدروژن تولید میشود و پراکسیدهیدروژن ایجاد شده بعنوان شاخصی از غلظت مولکول اصلی، می‌باشد. در اندازه‌گیری عناصر فلزی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی، بیشتر از روش‌های کمپلکسومتری استفاده می‌شود. زیرا روشهای آنالیتیکی با دستگاه‌های جذب اتمی و پلاسمای القا شده مزدوج دارای دقت بسیار بالا و در عین حال هزینه بالاتر هستند که مناسب ارزیابی‌های بالینی نیستند. به طورمثال ارزیابی کلسیم در مقادیر نانوگرم الزامی نیست (۱۳).

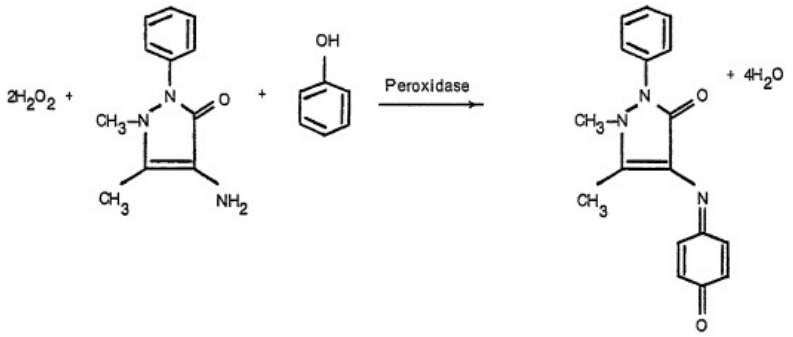
در اندازه‌گیری برخی از آنالیتها یک مولکول با مولکول اندازه‌گیری شونده واکنش شیمیایی انجام می‌دهد که می‌توان به بیلیروبین و اوروبیلینوژن اشاره نمود. هر چند اساس اندازه‌گیری مولکول‌های پروتئینی به کمک آنتیبادی بر اساس روش‌هایی مثل الایزا صورت میگیرد، با این حال اندازه‌گیری هموگلوبین A_1C و اندازه‌گیری CRP بصورت نیمه‌کمی با استفاده از آنتی‌بادی و به روش ایمینوتوربیدومتری انجام می‌شود. برای اندازه‌گیری آنزیم‌ها اصولاً فعالیت آنزیمی به کمک پیک سوبسترا ارزیابی می‌شود. گاهی سوبسترا بصورت سنتتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد و گاهی سوبسترا در واقع سوبسترای واکنش طبیعی آنزیم است.

۳-۱ اندازه‌گیری بر اساس تولید پراکسید هیدروژن

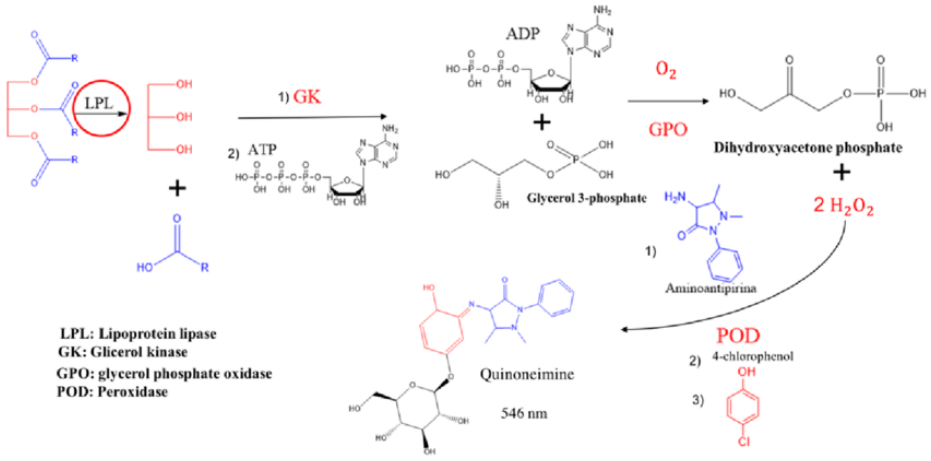
اندازه‌گیری سطح سرمی گلوکز، سطح سرمی اسید اوریک، اندازه‌گیری مقدار کلسترول موجود در HDL به روش مستقیم و نیز مقدار تریگلیسیرید مبتنی بر تولید پراکسیدهیدروژن یا H_2O_2 است (۱۴). بطوریکه غلظت H_2O_2 اندازه‌گیری شده متناسب با مقدار آنالیت اولیه می‌باشد. تقریباً در تمامی کیت‌ها از ۴– آمینو آنتی پیرین بعنوان عامل اصلی برای ارزیابی H_2O_2 استفاده می‌شود. بر اساس واکنش H_2O_2 و ۴– آمینو آنتی پیرین تحت تأثیر آنزیم پراکسیداز و در حضور فنول و کوئینوایمین دارای جذب در طول موج‌های 500 تا 550 نانومتر تولید می‌شود که با تکنیک اسپکتروفتومتری قابل ارزیابی است. لازم به توضیح است که توسعه آنزیم‌های پراکسیداز و ۴– آمینو آنتی پیرین تاریخچه دویست ساله دارد (۱۶و۱۵) (شکل ۱).

برای اندازه گیری β– دی گلوکز در سرم، اکسیداسیون گلوکز به گلوکورونیک اسید با آنزیم گلوکز اکسیداز کاتالیز می‌شود که طی این واکنش پراکسیدهیدروژن تولید شده که متعاقباً به روش مذکور اندازه گیری می‌شود که معیاری از غلظت گلوکز است.

جهت اندازه‌گیری کلسترول، کافی است کلسترول در حضور آنزیم کلسترول اکسیداز به کلستاکلستس 4- 3- N- اون اکسید شود که طی این واکنش، H_2O_2 تولید می‌شود. با اندازه‌گیری مقدار H_2O_2، مقادیر کلسترول حاصل خواهد شد. نکته قابل ذکر در این واکنش این است که کلسترول باید به شکل آزاد باشد. لذا طی یک مرحله پیش‌نیاز، لازم است که کلسترول استر، توسط آنزیم کلسترول استراز



شکل ۱. روش ارزیابی پراکسید هیدروژن که منجر به تولید کوئینوایمین بعنوان واکنش نهایی ارزیابی آنالیت‌های گلوکز، تری گلیسرید، کلسترول و اسید اوریک. شکل اقتباس از مقاله Fernando و همکارانش (۷۱).



شکل ۲. روش ارزیابی تریگلیسرید و شکل اقتباس از مقاله Espinosa, Marron و همکارانش (۱۹).

به کلسترول آزاد تبدیل شود (۱۸).

برای اندازه‌گیری تریگلیسیرید، ابتدا اسیدهای چرب از گلیسرول جدا و سپس گلیسرول اکسید می‌شود. بهازای اکسیداسیون گلیسرول، H_2O_2 حاصل می‌شود که با اندازه‌گیری H_2O_2 حاصله، مقادیر تریگلیسیرید قابل محاسبه و ارزیابی است. لازم به توضیح است که برای اکسیداسیون گلیسرول لازم است که این ماده در کربن شماره۳ فسفوریله شود. لذا در یک مرحله پیش‌نیاز گلیسرول به کمک آنزیم گلیسرول کیناز، فسفریله می‌شود (شکل ۲).

جهت اندازه‌گیری اسیداوریک کافیست این ترکیب، اکسید شود. اکسیداسیون اسیداوریک به کمک آنزیم اوریکاز صورت می‌گیرد که سبب تولید آلانتوئین می‌شود. اما در کنار این محصول، پراکسیدهیدروژن نیز تولید می‌شود (۲۰). با ارزیابی و اندازه‌گیری مقدار H_2O_2، مقادیر اسیداوریک مشخص می‌گردد.

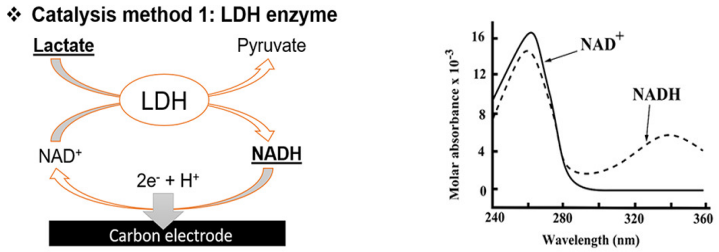
برای اندازه‌گیری کلسترول موجود در HDL یا کلسترول موجود در LDL نیز از روش اکسیداسیون کلسترول و ایجاد H_2O_2 و سنجش آن با کمک ۴-آمینو آنتی پیرین استفاده می‌شود. تفاوت در محلول‌های استخراجی است که بتواند کلسترول را از LDL جدا کند یا فقط بتواند کلسترول را از HDL استخراج نماید.

۳-۲ ارزیابی آنزیم‌ها

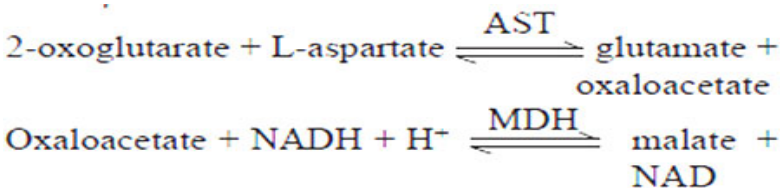
اندازه‌گیری برخی از آنزیم‌ها در خون می‌تواند به ما نشان دهد که شخص در یک ارگان خاص دچار مشکل شده است یا در سلامت به سر می‌برد. آنزیم‌ها بعنوان ابزارهایی برای یک ارزیابی آنالیت استفاده می‌شدند درحالیکه در این بخش اندازه‌گیری فعالیت خود آنزیم بعنوان آنالیت و مقدار آنزیم کل در سرم بعنوان هدف آزمایش است. در واقع در اینجا مقدار فعالیت آنزیم سنجیده می‌شود تا اینکه مقدار کل آنزیم یا غلظت آنزیم تعیین شود. در موارد بسیار محدودی واکنش طبیعی آنزیم از طریق روش‌های آزمایشگاهی، قابل ارزیابی است زیرا طی واکنش، ماده‌ای تولید یا مصرف می‌شود که با روش کالری‌متری یا طیف سنجی قابل شناسایی هستند. بعنوان مثال می‌توان به دو آنزیم لاکتات دهیدروژناز اشاره نمود. ارزیابی آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سکته‌های قلبی، اختلالات عضلانی و همچنین در سرطان‌ها اهمیت دارد (۲۱). شاید ساده‌ترین روش اندازه‌گیری یک آنزیم را در لاکتات دهیدروژناز مشاهده کنیم، بطوریکه با ارائه سوبسترای پیروات و NADH احیا شده، لاکتات احیاشده و NAD اکسید شده را بدست می‌آوریم که مقدار NAD+ بعنوان معیاری از میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز ارزیابی می‌شود (شکل ۳).

نکته جالب توجه ارزیابی آنزیم‌های ALT و AST است که از آنزیم لاکتات دهیدروژناز بعنوان ابزار اندازه‌گیری با واکنش طبیعی خود آنزیم مزدوج استفاده می‌شود. اندازه‌گیری این آنزیم‌ها در اختلالات قلبی– عروقی و اختلالات کبدی مورد توجه است. برای ارزیابی آنزیم AST یا آسپارتات ترانس آمیناز ابتدا اسیدآمینه آسپارتات و آفاکتو ویتارات در حضور آنزیم به گلوتامات و اگزالااستات تبدیل می‌شود. این واکنش در واقع انتقال یک گروه آمین می‌باشد. اگزالااستات تولید شده بعنوان معیاری از فعالیت آنزیم است. هرچند نمی‌توان اگزالااستات را بطور مستقیم ارزیابی کرد. در واکنش بعد اگزالواستات به کمک یک NADH احیا شده که در داخل بافر وجود دارد و به L- مالات احیا می‌شود. طی این واکنش NADH به NAD+ تبدیل می‌شود. مقادیر NAD+ دارای جذب نور بوده و در طول موج‌های ۳۴۰ نانومتر به اندازه‌گیری میزان جذب در یک بازه زمانی پرداخته می‌شود (۲۳). تغییرات در میزان جذب نشاندهنده میزان فعالیت AST و مقدار کلی آن است. (شکل۴)

برای اندازه‌گیری آلانین ترانس آمیلاز بجای AST در واکنش قبلی، آلانین می‌نشیند و از برداشته‌شدن آمین‌آلانین و انتقال آن به



شکل ۳. روش ارزیابی لاکتات دهیدروژناز شامل ارائه سوبسترای پیروات و ارزیابی تولید +NAD در چند دقیقه نخست، شکل اقتباس از مقاله Rosati و همکارانش (۲۲).

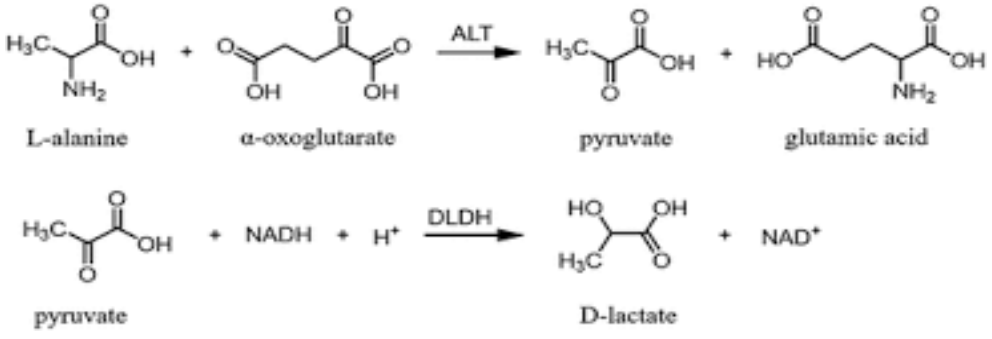


شکل ۴. روش ارزیابی AST شامل ارائه سوبسترای آسپارتات و ارزیابی تولید +NAD در چند دقیقه نخست، روش ابداع شده توسط Karmen و همکارانش در سال ۱۹۵۵ (۲۴).

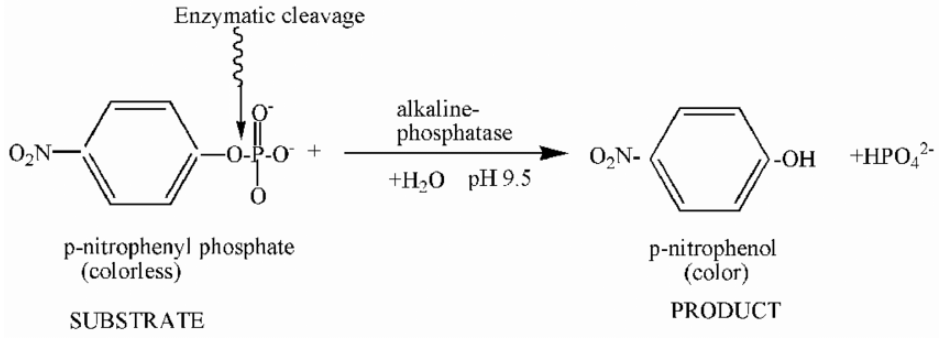
یک آلفا کتوگلوتارات، پیروات و گلوتامات تولید می‌شود. پیروات در حضور NAD+ به L- لاکتات احیا می‌شود و در قبال آن NADH به NAD+ تبدیل می‌شود که دارای جذب نوری در طول موج ذکر شده است (شکل۵).

در سه واکنش آنزیمی انجام شده، سوبسترا و واکنش طبیعی آنزیمهای ALT و AST، کمک نمود تا مقادیر آنها ارزیابی شود، درحالیکه رویکرد ما برای سایر آنزیم‌ها متفاوت است. بعنوان مثال آنزیم آلکالین فسفاتاز در داخل بدن به هیدرولیز فسفواسترهای اورگانیک در فضای خارج سلولی می‌پردازد و بعنوان کوفاکتور از روی (Zn) و منیزیم استفاده می‌نماید درحالیکه جهت ارزیابی مقادیر آلکالین فسفاتاز از سوبسترای سنتتیک فسفونیتروفنیل فسفات استفاده می شود. سوبسترای مذکور سبب تولید محصول فسفونیتروفنول زرد رنگ می‌شود که در طول موج ۴۱۰ تا ۴۰۵ نانومتر قابل ارزیابی است (۲۶). لازم به یادآوری است که آنزیم آلکالین فسفاتاز بعنوان ابزار آنزیمی در کیتهای الایزا کاربرد دارند که واکنش کاتالیزوری آن دقیقا مشابه شکل زیر است (شکل۶).

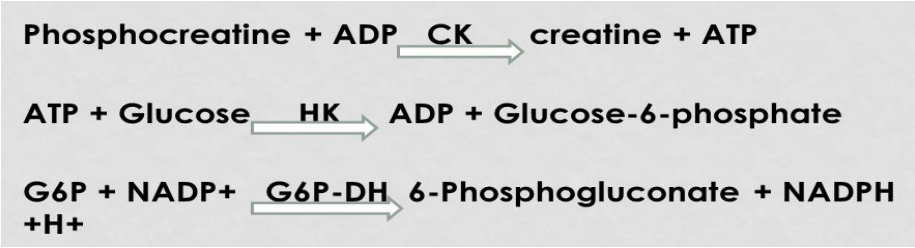
کراتین کیناز یک آنزیم مهم در ارزیابی‌های قلبی–عروقی و عضلانی و سکته‌های مغزی می‌باشد (۲۶). شاید یکی از پیچیده‌ترین واکنش‌های آنزیمی ارزیابی فعالیت آنزیم کراتین کیناز می‌باشد. کراتین فسفات در حضور ADP سبب تولید ATP می‌شود. ATP برای فسفریلاسیون گلوکز استفاده شده و گلوکز –۶ فسفات ایجاد می‌شود. گلوکز –۶ فسفات در حضور آنزیم گلوکز –۶ فسفات دهید روژناز و سوبسترای NADP سبب تولید NADPH می‌شود که مقادیر NADPH به طریقی نشان‌دهنده میزان فعالیت کراتین کیناز می‌باشد. برای اندازه‌گیری مقدار NADPH، طول موج ۳۴۰ نانومتر استفاده می‌شود. نکته قابل توجه این است که آنزیم گلوکز



شکل۵. روش ارزیابی ALT تولید +NAD در چند دقیقه نخست، شکل اقتباس از مقاله Sun و همکارانش(۲۵).



شکل ۶. روش ارزیابی آلکالین فسفاتاز تولید محصول رنگی سنتتیک، شکل اقتباس از مقاله Dorobanłu و همکارانش (۲۷).



شکل ۷. روش ارزیابی کراتین کیناز و تولید NADPH بعنوان ماده قابل ارزیابی و واکنش آخر برای ارزیابی خود آنزیم گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز در بیماران فاویسم

۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) گاهی در انسان دچار اختلال می شود و از ارزیابی این آنزیم برای تشخیص بیماری فاویسم استفاده می‌شود (۲۸). گلوکز ۶- فسفات بعنوان سوبسترا و NADP بعنوان کوفاکتور در حضور آنزیم G۶PD سبب تولید NADPH می‌شود که مقدار NA-DPH در صورت فقدان فعالیت آنزیم مشاهده نمی‌شود. لازم به ذکر است در برخی از موارد NADPH تشکیل کمپلکس آبی رنگ می‌دهد که می‌توان آنرا در ارزیابی تغییر رنگ آبی به قرمز مورد ارزیابی قرارداد. تغییر رنگ طی ۱۰ دقیقه تا ۴ ساعت نشان‌دهنده وضعیت کمبود آنزیم است (شکل۷).

برای ارزیابی لیپاز از یک سوبسترای پیچیده استفاده می‌شود. نام سوبسترا ۱-۲،۱-O- دیلایول - RAC - گلیسرو-۳ - گولوتاریک اسید- ۶/ - متیل رزوروفیل - استر[1] می‌باشد که در حضور محیط قلیایی و فعالیت آنزیم لیپاز نهایتاً گلوتاریک اسید و متیل رزوروفین تولید می‌کند. ترکیب اخیر در طول موج ۵۷۲ نانومتر قابل شناسایی است. برای ارزیابی آنزیم آمیلاز از یک سوبسترای مستقیم بنام ۲ کلر و ۴ نیتروفنیل a- دی مالتوتریوزید استفاده می‌شود. گاهی ماده سوبسترا تحت عنوان ۲- کلرو ۴- نیروفنیل گالاکتو پیرانوزیل مالتو تریوزید[2] گفته می‌شود که تحت تاثیر آنزیم آمیلاز سبب تولید ۴- کلرو نیترو فنول می‌شود که در طول موج ۴۰۵ نانومتر دارای جذب است.

برای ارزیابی آنزیم γ- گلوتامین ترنسفراز از سوبسترایی مانند L - گلوتامیل فسفو نیتروانیلید[3] استفاده می‌شود که پس از شکسته شدن توسط آنزیم GGT (γ-گلوتامین ترنسفراز) فسفو نیترو انیلین ایجاد می‌کند که در طول موج ۴۰۵ دارای جذب است. با این حال سوبستراهای دیگری نیز مطرح شده است، بعنوان مثال سوبسترای L-γ-گلوتامیل ۳- کربوکسی ۴- نیترو انیلین که می‌تواند طی واکنشی سبب تولید ۳- کربوکسی ۴- نیترو انیلیل شود و در طول موج ۴۱۰ نانومتر دارای جذب است (شکل۸).

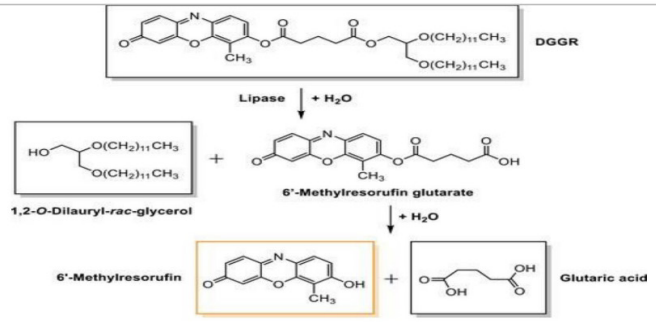
روش کمپلکسومتری Complexometry

روش کمپلکسومتری یا ایجاد کمپلکس و ارزیابی تغییرات رنگ و تغییرات حالت بعنوان روش دیگری از ارزیابی‌های آزمایشگاهی می‌باشد که البته شاید بتوان این روش-ها را برای مواد معدنی (Min-erals) بیشتر مطرح دانست.

جهت ارزیابی آهن از ترکیب فروزین[4] استفاده می‌شود که با Fe^{2+} واکنش می‌دهد. فرمول شیمیایی این ترکیب $C_{20}H_{12}N_4Na_2O_6S_2$ است. لازم به ذکر است که قبل از ارزیابی آهن، یون‌های آهن باید از ترانسفرین جدا شود که از محیط اسیدی ضعیف برای این موضوع استفاده می‌شود. همچنین Fe^{3+} به Fe^{2+} باید احیا شود که از اسید آسکوربیک استفاده می‌شود. کمپلکس آهن-فروزین در طول موج ۶۰۰ نانومتر دارای جذب نوری است (۲۹).

۱. Di-O-lauryl-rac-glycero-3-(glutaric, acid 6-methylresorufin)-1,2)[11]
۲. β-2-chloro-4-nitrophenylmaltopentaoside
۳. L-γ-glutamyl-p-nitroanilide
۴. Ferrozine

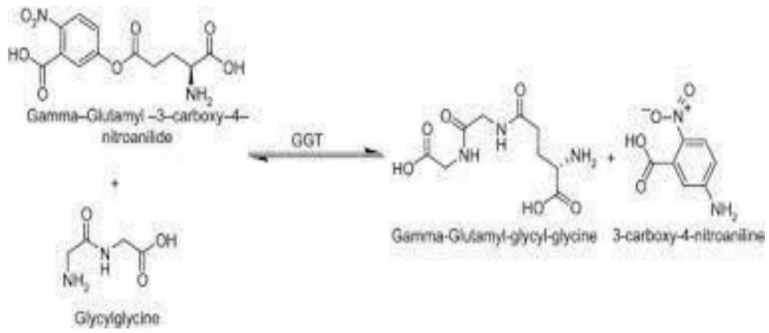
مکانیسم واکنش آنزیم لیپاز(رفرنس در متن)



مکانیسم واکنش آنزیم آمیلاز (رفرنس در متن)

$$2-CNP-G3+H_20 \rightarrow \text{maltotriose} + 2-\text{chloro}-4-\text{nitrophenol}$$
$$\rightarrow \text{glucose} + 2-\text{chloro}-4-\text{nitrophenyl}-$$
$$\alpha-D-\text{maltoside}$$

مکانیسم واکنش آنزیم گاما گلوتامیل ترانسفراز (رفرنس در متن)



شکل ۸. سوبستراهای سنتیک و مکانیسم واکنش‌های سه آنزیم لیپاز، آمیلاز و گاما گلوتامیل ترانسفراز

برای ارزیابی مقدار روی موجود در نمونه سرمی از معرف (BRO-MO-PAPS-5 ($C_{17}H_{19}BrN_4Na_2O_4S_2H_2O$ استفاده می‌شود. کمپلکس این ماده با روی در طول موج ۵۴۶ تا ۵۷۱ نانومتر دارای جذب نوری است.

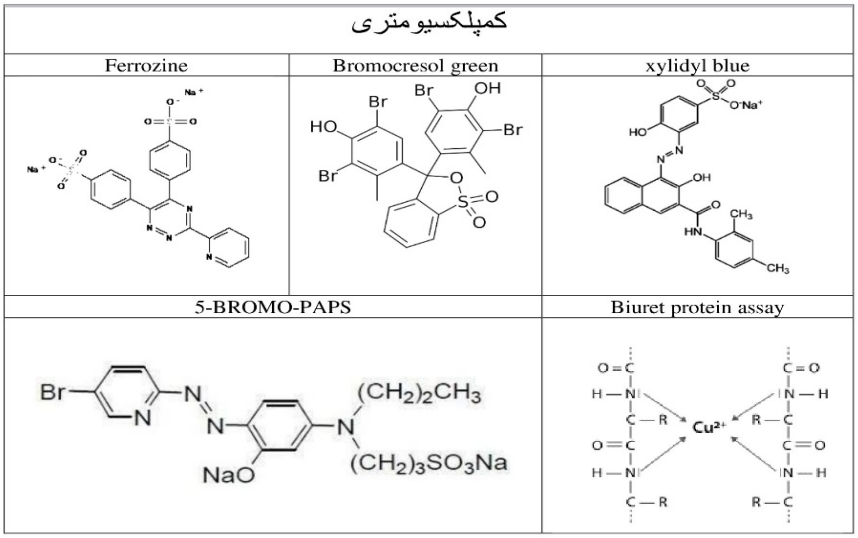
جهت ارزیابی منیزیم از زایلیدیل بلو استفاده می‌شود. این ترکیب در محیط قلیایی با منیزیم ترکیب کمپلکس قرمزرنگی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۵۴۶ نانومتر قابل شناسایی است.

لازم به توضیح است اساس اندازه‌گیری آلبومین و توتال پروتئین نیز به روش کمپلکسومتری بر می‌گردد. بعنوان مثال برای اندازه‌گیری آلبومین از محلول حاوی برمو کروزل گرین[۵] استفاده می‌شود که سبب ایجاد کمپلکس می‌شود. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار توتال پروتئین در روش بیوره از معرفی حاوی Cu^{2+} استفاده می‌شود که با تشکیل کمپلکس با پروتئین در pH قلیایی سبب ایجاد رنگ آبی می‌شود که در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل ارزیابی است (شکل ۹).

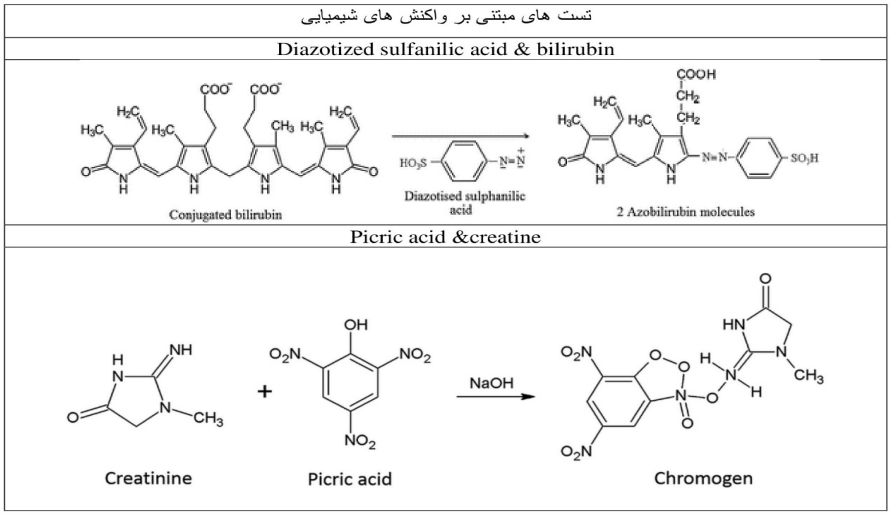
۵. Bromocresol green

تستهای مبتنی بر واکنشهای شیمیایی

ارزیابی بعضی از متغیرهای سرمی و ادراری بر اساس واکنش‌های شیمیایی است که در برخی کتب و مقالات به اشتباه تشکیل کمپلکس گفته می‌شود. بعنوان مثال روش ژافه Jaffe برای ارزیابی کراتینین یک روش کمپلکسومتری نیست، بدین معنی که معرف پیریک‌اسید با کراتینین واکنش شیمیایی داده و تولید رنگ می‌نماید که ارزیابی کینتیک تغییرات رنگ در طول موج ۵۰۰ نانومتر در مقابل نمونه بلانک به ما مقادیر کراتینین را نشان می‌دهد (۳۰). همچنین مقادیر ارزیابی بیلی روبین در حضور سولفانیک‌اسیددی یازوته سبب تولید ترکیب تغییر یافته آزوبیلی‌روبین می‌شود که مبتنی بر یک واکنش شیمیایی و نه تشکیل کمپلکس ساده می‌باشد. آنچه که برای ارزیابی بیلی روبین ایجاد می‌شود در طول موج ۵۵۰ نانومتر دارای جذب نوری است.



شکل ۹. ترکیبات مورد استفاده در روش کمپلکسیومتری جهت ارزیابی آهن، روی، منیزیم، آلبومین و پروتئین



شکل ۱۰. اندازه گیری کراتنین و بیلی روبین با استفاده از واکنش‌های شیمیایی

لازم به ذکر است که معرف ارلیخ برای ارزیابی اوروبیلینوژن از قسمت آلدهید وارد واکنش می‌شود. واکنشی که مشابه واکنش این معرف با ایندول‌های موجود در ترکیبات سایکواکتیو می‌باشد (شکل ۱۰).

روش ایمینوتوربیدمتری

اصولاً برای ارزیابی ترکیباتی که دارای خواص آنتی‌ژنیک هستند، از آنتی‌بادی استفاده می‌شود. استفاده از آنتیبادی در قالب تست‌های الایزا و تست‌های ایمینوکمی‌لومیسنس می‌تواند نتایج بسیار دقیقی داشته باشد. اما گاهی چنین دقتی وجود ندارد یا زمانبر بودن تست می‌تواند ارزیابی‌ها را با مشکل دچار کند لذا از روش‌های نیمه کمی استفاده می‌شود. دو تست ارزیابی نیمه‌کمی C reactive (protein (CRP و هموگلوبین A۱C به کمک آنتی‌بادی و روش ایمینوتوربیدومتری ارزیابی می‌شوند(۳۱).

در کنار تنوع در روش‌های استفاده شده برای ارزیابی آنالیت‌ها، واحدهای آنها نیز متفاوت است. برای مثال برای گزارش مقادیر گلوکز و تری گلیسیرید از واحد mg/dl استفاده می‌شود. اصولاً برای گزارش آنزیم‌ها از واحد international unit استفاده می‌شود.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه حاکی از آن است که علیرغم تنوع ظاهری در

روش‌های آزمایشگاهی در بخش بیوشیمی، اساس آزمایش‌ها مشابهت بالایی دارد و از اصول کاملاً منطقی پیروی می‌کند. شناخت این اصول به تکنسین آزمایشگاه کمک می‌کند تا در انجام صحیح تست و رفع خطاهای احتمالی توانمندتر باشد.

مشارکت نویسندگان

درصد مشارکت نویسندگان به ترتیب نام آنها است.

تضاد منافع

نویسندگان این مقاله، وجود هر گونه تضاد منافع را رد می‌نمایند.

منابع مالی

برای پروژه منتج به این مقاله هیچ پژوهانه ای دریافت نشده است.

منابع

1. Lumbreras-Lacarra B, Ramos-Rincón JM, Hernández-Aguado I. Methodology in diagnostic laboratory test research in clinical chemistry and clinical chemistry and laboratory medicine. Clin Chem. 2004 Mar;50(3):530-6.

2. Naugler C, Church DL. Automation and artificial intelligence in the clinical laboratory. Crit Rev Clin Lab Sci. 2019 Mar;56(2):98-110.

3. Armbruster DA, Overcash DR, Reyes J. Clinical Chemistry Laboratory Automation in the 21st Century - Amat Victoria curam (Victory loves careful preparation). Clin Biochem Rev. 2014 Aug;35(3):143-53.

4. Warner M. Diagnostic kits and the clinical chemist. Br Med J. 1980 Feb 2;280(6210):329-30.

5. Guiding principles and recommendations on labelling of clinical laboratory materials: a WHO memorandum. Bull World Health Organ. 1978;56(6):881-5.

6. Whitby LG, Mitchell FL, Moss DW. Quality control in routine clinical chemistry. Adv Clin Chem. 1967;10:65-156.

7. Lyons KE, Fouhy F, O' Shea CA, Ryan CA, Dempsey EM, Ross RP, Stanton C. Effect of storage, temperature, and extraction kit on the phylogenetic composition detected in the human milk microbiota. Microbiologyopen. 2021 Jan;10(1):e1127.

8. Tholen DW, Linnet K, Kondratovich M, Armbruster DA, Garrett PE, Jones RL, Kroll MH, Lequin RM, Pankratz TJ, Scassellati GA, Schimmel H. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI EP17-A. 2004;24:34.

9. Jhang JS, Chang CC, Fink DJ, Kroll MH. Evaluation of linearity in the clinical laboratory. Arch Pathol Lab Med. 2004 Jan;128(1):44-8.

10. Mohanraj DD, Sara DS, Ramesh G. Labour Welfare Measures On Employee Job Satisfaction Of Lab Technician During The Covid 19 Pandemic. Int J of Aquatic Science. 2021 Jun 1;12(3):2805-12.

11. Delanghe JR, Speeckaert MM. Creatinine determination according to Jaffe-what does it stand for? NDT Plus. 2011 Apr;4(2):83-6.

12. GLENNER GG, LILLIE RD. The histochemical demonstration of indole derivatives by the post-coupled p-dimethylaminobenzylidene reaction. J Histochem Cytochem. 1957 May;5(3):279-96.

13. Yang HS, LaFrance DR, Hao Y. Elemental Testing Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry in Clinical Laboratories. Am J Clin Pathol. 2021 Jul 6;156(2):167-175.

14. Dhruvaraj M. Role of peroxidase in clinical assays: a short review. Journal of Clinical Nutrition. 2017;3(2):14.

15. Krainer FW, Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. Appl Microbiol Biotechnol. 2015 Feb;99(4):1611-25.

16. Saito Y, Mifune M, Nakashima S, Odo J, Tanaka Y, Chikuma M, Tanaka H. Determination of Hydrogen Peroxide with Phenol and 4-Aminoantipyrine by the Use of a Resin Modified with Manganese-Tetrakis (sulfophenyl) porphine. Analytical sciences. 1987 Apr 10;3(2):171-4.

17. Fernando CD, Soysa P. Optimized enzymatic colorimetric assay for determination of hydrogen peroxide (H2O2) scavenging activity of plant extracts. MethodsX. 2015 May 18;2:283-91.

18. Warnick GR, Remaley AT. Measurement of cholesterol in plasma and other body fluids. Curr Atheroscler Rep. 2001 Sep;3(5):404-11.

19. Espinosa-Marrón A, Laviada-Molina H, Moreno-Enríquez A, Sosa-Crespo IF, Molina-Segui F, Fernanda Villaseñor-Espinosa M, Antonio Ciau-Mendoza J, Alfredo Araujo-León J. Serum Fatty Acids Chemical Characterization after Prolonged Exposure to a Vegan Diet. J. Food Nutr. Res. 2019;7:742-50.

20. Zhao Y, Yang X, Lu W, Liao H, Liao F. Uricase based methods for determination of uric acid in serum. Microchimica Acta. 2009 Jan;164:1-6.

21. Hemalatha T, UmaMaheswari T, Krithiga G, Sankaranarayanan P, Puvanakrishnan R. Enzymes in clinical medicine: an overview. Indian J Exp Biol. 2013 Oct;51(10):777-88.

22. Rosati G, Gherardi G, Grigoletto D, Marcolin G, Cancellara P, Mammucari C, Scaramuzza M, De Toni A, Reggiani C, Rizzuto R, Paccagnella A. Lactate Dehydrogenase and Glutamate Pyruvate Transaminase biosensing strategies for lactate detection on screen-printed sensors. Catalysis efficiency and interference analysis in complex matrices: from cell cultures to sport medicine. Sensing and bio-sensing research. 2018 Nov 1;21:54-64.

23. Mayevsky A, Rogatsky GG. Mitochondrial function in vivo evaluated by NADH fluorescence: from animal models to human studies. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 Feb;292(2):C615-40.

24. Karmen A, Wroblewski F, Ladue JS. Transaminase activity in human blood. J Clin Invest. 1955 Jan;34(1):126-31.

25. Sun Y, Gao G, Cai T. Enzymatic characterization of D-lactate dehydrogenase and application in alanine aminotransferase activity assay kit. Bioengineered. 2021 Dec;12(1):6459-6471.

26. Levy M, Heels-Ansdell D, Hiralal R, Bhandari M, Guyatt G, Yusuf S, Cook D, Villar JC, McQueen M, McFalls E, Filipovic M, Schünemann H, Sear J, Foex P, Lim W, Landesberg G, Godet G, Poldermans D, Bursi F, Kertai MD, Bhatnagar N, Devereaux PJ. Prognostic value of troponin and creatine kinase muscle and brain isoenzyme measurement after noncardiac surgery: a systematic review and meta-analysis. Anesthesiology. 2011

Apr;114(4):796-806.

27. Dorobanłu I, Radu M, Hărănguş L, Corol DI. Synthesis and Characterization of the Enzymatic Marker Nandrolone-3-Carboxymethyloxime-Alkaline Phosphatase to Be Used In Elisa Technique for Assays of Nandrolone from Biological Samples. Rom J Biophys. 2007;17(1):45-54.

28. Luzzatto L, Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. N Engl J Med. 2018 Jan 4;378(1):60-71.

29. Pehkonen S. Determination of the oxidation states of iron in natural waters. A review. Analyst. 1995;120(11):2655-63.

30. Mohabbati-Kalejahi E, Azimirad V, Bahrami M, Ganbari A. A review on creatinine measurement techniques. Talanta. 2012 Aug 15;97:1-8.

31. Whicher JT, Price CP, Spencer K. Immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for proteins. Crit Rev Clin Lab Sci. 1983;18(3):213-60.