

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

اساس طبقه بندی آزمایشات و کیت های تشخیصی بیوشیمی

چکیده

زمینه: آزمایشگاه های تشخیص پزشکی از کیت های آماده به مصرف استاندارد جهت تسهیل تست ها استفاده می کنند. علیرغم تنوع تولیدکنندگان، کیت ها عموماً با روش های مشابه تهیه می شوند. فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و پزشکی آزمایشگاهی به عنوان یکی از مراجع برای ارزیابی، تعیین اهداف و ارائه توصیه هایی برای انتخاب روش های آزمایش عمل می کند، اما سازمان هایی مانند انجمن بین المللی اعتبارسنجی آزمایشگاهی نیز دستورالعمل هایی را در قالب ISO 15189 منتشر کرده اند. آشنایی با پایه مولکولی کیت، تکنسین آزمایشگاه را قادر می سازد تا خطاهای احتمالی را شناسایی و عیب یابی کند. بنابراین لازم است تکنسین علاوه بر مهارت عملی، با جزئیات روش تست نیز، آشنا باشد. تاریخچه برخی روش های رایج به قرن هجدهم برمی گردد. در مطالعات قبلی تلاش کرده اند که برای یک آنالیت خاص، روش های مختلف را از نظر حساسیت و ویژگی بررسی نمایند. درحالیکه در این مطالعه ما به بازطبقه بندی روش ها بر اساس مکانیسم واکنش ها می پردازیم.

روش کار: در این مطالعه از پایگاه های اطلاعاتی PubMed و MEDLINE و دیگر پایگاه های اطلاعاتی را برای رایج ترین مقالاتی که در مورد مبانی و تئوری آزمایش و جزئیات تکنیکی روش های آزمایش بحث می کردند، جست و جو بعمل آمد و بررسی با تمرکز بر مکانیسم های کیت رایج فعلی مورد مطالعه مروری قرار گرفت.

یافته ها: بررسی روش شناسی کیت های تشخیصی پزشکی کنونی نشان داد که این کیت ها مبتنی بر روش های مختلفی هستند، اما می توان آنها را به تشخیص مبتنی بر پراکسیداز، واکنش شیمیایی، تشکیل کمپلکس، سنجش آنزیمی و سنجش ایمنی طبقه بندی کرد. با این حال با یک طبقه بندی می توان الگوهای مشابهی را بین آنها مشاهده نمود.

نتیجه گیری: بطور کلی روش انجام واکنش به نوع آنالیت بستگی دارد. بنابراین بدیهی است که روش اندازه گیری عناصر فلزی کمیاب با روش اندازه گیری آنزیم ها متفاوت است. طبقه بندی این روش ها می تواند به دانش آزمایشگاهی کمک نماید.

واژگان کلیدی: بیوشیمی، کیت، آزمایشگاه، مکانیسم واکنش

فرناز جهان بین^۱، شیوا مهران^۲، زعفر قلی نژاد^{۳*}

^۱ مربی، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
^۲ دانشجو، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران
^۳ استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه، ارومیه، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

کلیومتر 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

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، سلکاترهماتولوژی، الکتروفورز کاپیلاری 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 اتوآنالایزر همان کیت‌هایی است که بصورت دستی استفاده می‌شد. اساس کار اتوآنالایزر، 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 اتوآنالایزر 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.

روش‌ها

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 جمع‌آوری و روش‌هایی که اساس یکسان و یا مشابهی داشتند، طبقه‌بندی 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 گاهی 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 گاهی 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 تأثیر 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 محلول‌هایی 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 سوزانده 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 می تواند 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 روش های رایج در کیت های امروزی می توان ردپایی از تاریخ را در آنها مشاهده کرد. معرف اریخ (Ehrlich) برای ارزیابی اوروبیلینوژن و معرف ژافه (Jaffe) برای اندازه گیری کراتینین سرم و ادرار به کشفیات دو دانشمند آلمانی در سده 1800 برمی گردد (۱۲ و ۱۱). روش انجام یک واکنش به نوع آنالیت بستگی دارد، بعنوان مثال بدیهی است که نحوه اندازه گیری عناصر بویژه عناصر فلزی با نحوه اندازه گیری آنزیم ها متفاوت باشد. در این فصل ما به یک رویکرد کلی و طبقه بندی کلی این روش ها می پردازیم.

اندازه گیری برخی از متغیرها بر اساس واکنش های اکسیداسیون و احیا می باشد بطوریکه در ازای اکسیداسیون مولکول اندازه گیری شونده پراکسید هیدروژن تولید میشود و پراکسید هیدروژن ایجاد شده بعنوان شاخصی از غلظت مولکول اصلی، می باشد. در اندازه گیری عناصر فلزی در آزمایشگاه های تشخیص طبی، بیشتر از روش های کمپلکسومتری استفاده می شود. زیرا روش های آنالیتیکی با دستگاه های جذب اتمی و پلاسمای القا شده مزدوج دارای دقت بسیار بالا و در عین حال هزینه بالاتر هستند که مناسب ارزیابی های بالینی نیستند. به طور مثال ارزیابی کلسیم در مقادیر نانو گرم الزامی نیست (۱۳).

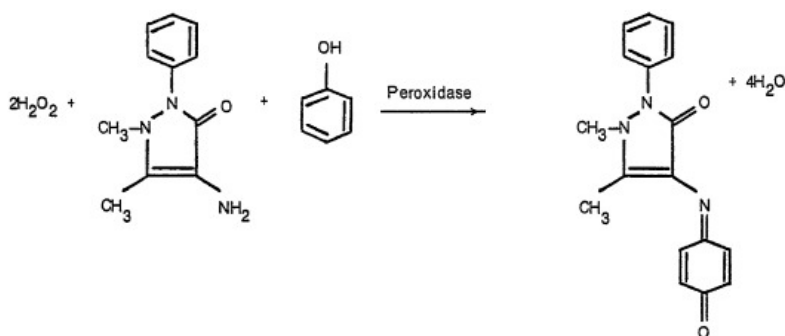
در اندازه گیری برخی از آنالیت ها یک مولکول با مولکول اندازه گیری شونده واکنش شیمیایی انجام می دهد که می توان به بیلیروبین و اوروبیلینوژن اشاره نمود. هر چند اساس اندازه گیری مولکول های پروتئینی به کمک آنتیبادی بر اساس روش هایی مثل الایزا صورت میگیرد، با این حال اندازه گیری هموگلوبین A_1C و

اندازه گیری CRP بصورت نیمه کمی با استفاده از آنتی بادی و به روش ایمونوتوربیدومتری انجام می شود. برای اندازه گیری آنزیم ها اصولاً فعالیت آنزیمی به کمک پیک سوبسترا ارزیابی می شود. گاهی سوبسترا بصورت سنتتیک مورد استفاده قرار می گیرد و گاهی سوبسترا در واقع سوبسترای واکنش طبیعی آنزیم است.

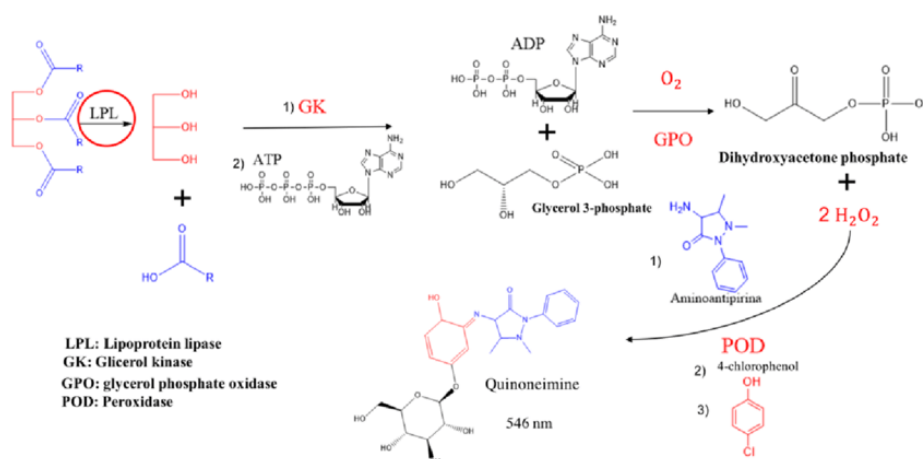
۳-۱ اندازه گیری بر اساس تولید پراکسید هیدروژن

اندازه گیری سطح سرمی گلوکز، سطح سرمی اسید اوریک، اندازه گیری مقدار کلسترول موجود در HDL به روش مستقیم و نیز مقدار تریگلیسیرید مبتنی بر تولید پراکسید هیدروژن یا H_2O_2 است (۱۴). بطوریکه غلظت H_2O_2 اندازه گیری شده متناسب با مقدار آنالیت اولیه می باشد. تقریباً در تمامی کیت ها از ۴- آمینو آنتی پیرین بعنوان عامل اصلی برای ارزیابی H_2O_2 استفاده می شود. 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 موج های 500 تا 550 نانومتر تولید می شود که با تکنیک اسپکتروفتومتری قابل ارزیابی است. لازم به توضیح است که توسعه آنزیم های پراکسیداز و ۴- آمینو آنتی پیرین تاریخچه دوپست ساله دارد (۱۶ و ۱۵) (شکل ۱). برای اندازه گیری β - دی گلوکز در سرم، اکسیداسیون گلوکز به گلوکورونیک اسید با آنزیم گلوکز اکسیداز کاتالیز می شود که طی این واکنش پراکسید هیدروژن تولید شده که متعاقباً به روش مذکور اندازه گیری می شود که معیاری از غلظت گلوکز است.

جهت اندازه گیری کلسترول، کافی است کلسترول در حضور آنزیم کلسترول اکسیداز به کلستاگلستس 3-4 -N- اون اکسید شود که طی این واکنش، H_2O_2 تولید می شود. با اندازه گیری 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 پیش نیاز، لازم است که کلسترول استر، توسط آنزیم کلسترول استراز



شکل ۱. روش ارزیابی پراکسید هیدروژن که منجر به تولید کوئینوایمین بعنوان واکنش نهایی ارزیابی آنالیت های 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 Marron, Espinosa و همکارانش (۱۹).

به کلسترول آزاد تبدیل شود (۱۸).

برای اندازه‌گیری تریگلیسرید، 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 تریگلیسرید قابل محاسبه و ارزیابی است. لازم به توضیح است که برای اکسیداسیون گلیسرول لازم است که این ماده در کربن شماره ۳ فسفوریله شود. لذا در یک مرحله پیش‌نیاز گلیسرول به کمک آنزیم گلیسرول کیناز، فسفریله می‌شود (شکل ۲).

جهت اندازه‌گیری اسیداوریک کافیت این ترکیب، اکسید شود. اکسیداسیون اسیداوریک به کمک آنزیم اوریکاز صورت می‌گیرد که سبب تولید آلانتوئین می‌شود. اما در کنار این محصول، پراکسید هیدروژن 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.

۲-۳ ارزیابی آنزیم‌ها

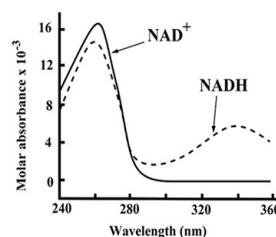
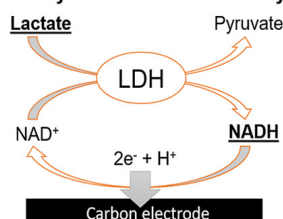
اندازه‌گیری برخی از آنزیم‌ها در خون می‌تواند به ما نشان دهد که شخص در یک ارگان خاص دچار مشکل شده است یا در سلامت به سر می‌برد. آنزیم‌ها بعنوان ابزارهایی برای یک ارزیابی آنالیت استفاده می‌شدند درحالی‌که در این بخش اندازه‌گیری فعالیت خود آنزیم بعنوان آنالیت و مقدار آنزیم کل در سرم بعنوان هدف آزمایش است. 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 سکت‌های 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 پیرووات و NADH احیا شده، لاکتات احیا شده و NAD اکسید شده را بدست می‌آوریم که مقدار NAD⁺ بعنوان معیاری از میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز ارزیابی می‌شود (شکل ۳).

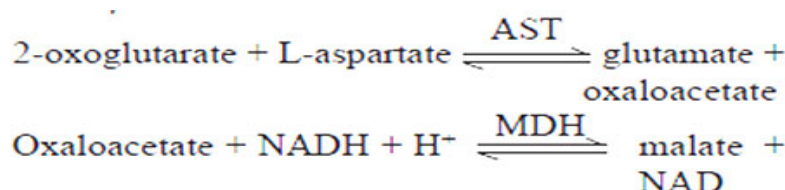
نکته جالب توجه ارزیابی آنزیم‌های ALT و AST است که از آنزیم لاکتات دهیدروژناز بعنوان ابزار اندازه‌گیری با واکنش طبیعی خود آنزیم مزدوج استفاده می‌شود. اندازه‌گیری این آنزیم‌ها در اختلالات قلبی-عروقی و اختلالات کبدی مورد توجه است. برای ارزیابی آنزیم AST یا آسپارات ترانس آمیناز ابتدا اسیدآمینه آسپارات و آفاکتو ویتارات در حضور آنزیم به گلوتمات 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 اگزالااستات 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. (شکل ۴)

برای اندازه‌گیری آلانین ترانس آمیلاز بجای AST در واکنش قبلی، آلانین می‌نشیند و از برداشته شدن آمین آلانین و انتقال آن به

❖ Catalysis method 1: LDH enzyme



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



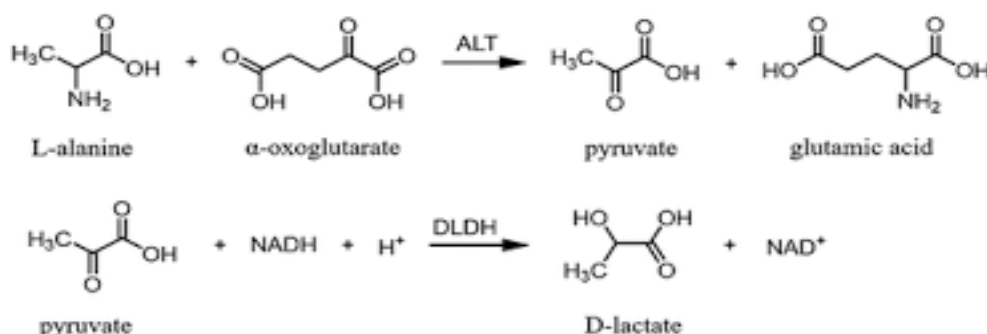
شکل ۴. روش ارزیابی AST شامل ارائه سوپسترای آسپاراتات و ارزیابی تولید NAD^+ در چند دقیقه نخست، روش ابداع شده توسط Karmen و همکارانش در سال ۱۹۵۵ (۲۴).

است (۲۶). لازم به یادآوری است که آنزیم آلکالین فسفاتاز بعنوان ابزار آنزیمی در کیت‌های الایزا کاربرد دارند که واکنش کاتالیزوری آن دقیقاً مشابه شکل زیر است (شکل ۶).

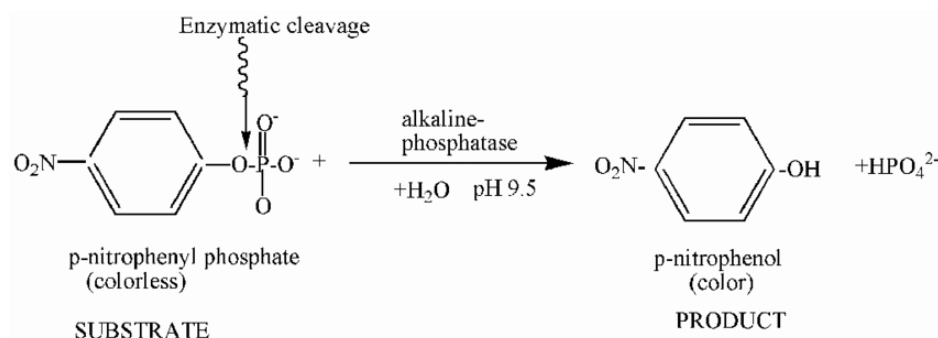
کراتین کیناز یک آنزیم مهم در ارزیابی‌های قلبی-عروقی و عضلانی و سکنه‌های مغزی می‌باشد (۲۶). شاید یکی از پیچیده‌ترین واکنش‌های آنزیمی ارزیابی فعالیت آنزیم کراتین کیناز می‌باشد. کراتین فسفات در حضور ADP سبب تولید ATP می‌شود. برای فسفریلاسیون گلوکز استفاده شده و گلوکز ۶- فسفات ایجاد می‌شود. گلوکز ۶- فسفات در حضور آنزیم گلوکز ۶- فسفات دهیدروژناز و سوپسترای 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

یک آل‌فا کتوگلوترات، پیرووات و گلوتمات تولید می‌شود. پیرووات 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 (شکل ۵).

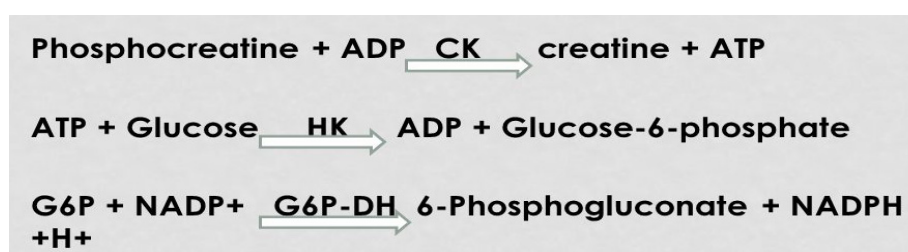
در سه واکنش آنزیمی انجام شده، سوپسترا و واکنش طبیعی آنزیم‌های ALT و AST، کمک نمود تا مقادیر آنها ارزیابی شود، درحالیکه رویکرد ما برای سایر آنزیم‌ها متفاوت است. بعنوان مثال آنزیم آلکالین فسفاتاز در داخل بدن به هیدرولیز فسفواسترهای اورگانیک در فضای خارج سلولی می‌پردازد و بعنوان کوفاکتور از روی (Zn) و منیزیم استفاده می‌نماید درحالیکه جهت ارزیابی مقادیر آلکالین فسفاتاز از سوپسترای سنتتیک فسفونیترونیل فسفات استفاده می‌شود. سوپسترای مذکور سبب تولید محصول فسفونیترونیل زرد رنگ می‌شود که در طول موج ۴۱۰ تا ۴۰۵ نانومتر قابل ارزیابی



شکل ۵. 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 Dorobanțu 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

گلوتامیل فسفو نیتروانیلید^۳ استفاده می‌شود که پس از شکسته شدن توسط آنزیم GGT (۷-گلوتامین ترنسفراز) فسفو نیتروانیلین ایجاد می‌کند که در طول موج ۴۰۵ دارای جذب است. با این حال سوبستراهای دیگری نیز مطرح شده است، بعنوان مثال سوبسترای ۷-L-گلوتامیل ۳- کربوکسی ۴- نیتروانیلین که می‌تواند طی واکنشی سبب تولید ۳- کربوکسی ۴- نیتروانیلین شود و در طول موج ۴۱۰ نانومتر دارای جذب است (شکل ۸).

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^۴ استفاده می‌شود که با Fe^{2+} واکنش می‌دهد. فرمول شیمیایی این ترکیب $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Na}_2\text{O}_6\text{S}_2$ 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).

۶- فسفات دهیدروژناز (G6PD) گاهی در انسان دچار اختلال می‌شود و از ارزیابی این آنزیم برای تشخیص بیماری فاویسم استفاده می‌شود (۲۸). گلوکز ۶- فسفات بعنوان سوبسترا و NADP بعنوان کوفاکتور در حضور آنزیم G6PD 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 (شکل ۷).

برای ارزیابی لیپاز از یک سوبسترای پیچیده استفاده می‌شود. نام سوبسترا ۱-۲، ۱-O- دی‌لاویل - RAC - گلیسرو-۳ - گولوتاریک اسید- ۶/ - متیل رزوروفیل - استر^۱ می‌باشد که در حضور محیط قلیایی و فعالیت آنزیم لیپاز نهایتاً گولوتاریک 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 گالاتو پیرانوزیل مالتو تریوزید^۲ گفته می‌شود که تحت تاثیر آنزیم آمیلاز سبب تولید ۴- کلرو نیترو فنول می‌شود که در طول موج ۴۰۵ نانومتر دارای جذب است.

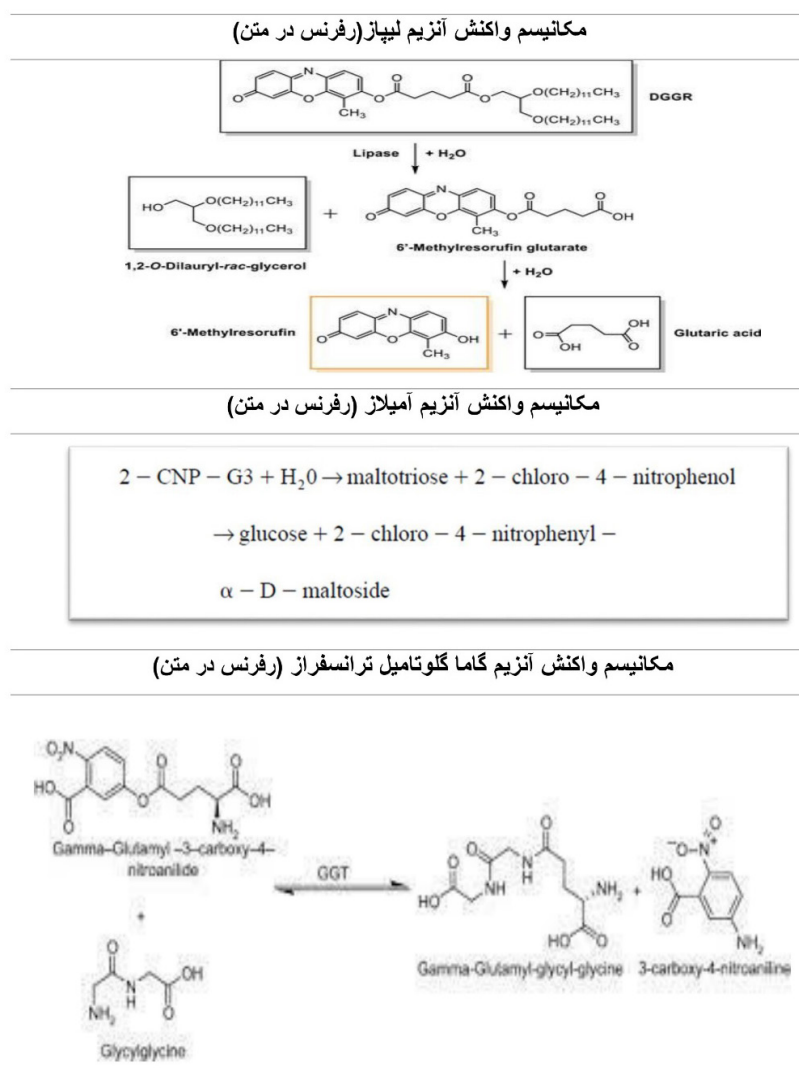
برای ارزیابی آنزیم ۷- گلوتامین ترنسفراز از سوبسترای مانند L -

۳. L-γ-glutamyl-p-nitroanilide

۴. Ferrozine

۱. Di-O-lauryl-rac-glycero-3-(glutaric, acid 6-methylresorufin)-1,2)¹¹

۲. β-2-chloro-4-nitrophenylmaltopentaoside



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

می‌شود که در طول موج ۵۴۰ نانومتر قابل ارزیابی است (شکل ۹).

تست‌های مبتنی بر واکنش‌های شیمیایی

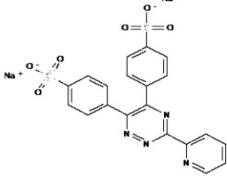
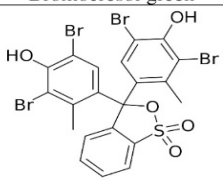
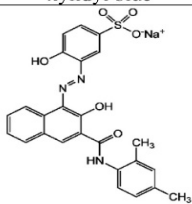
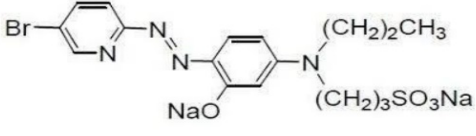
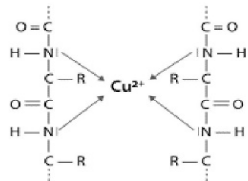
ارزیابی بعضی از متغیرهای سرمی و اداری بر اساس واکنش‌های شیمیایی است که در برخی کتب و مقالات به اشتباه تشکیل کمپلکس گفته می‌شود. بعنوان مثال روش ژافه Jaffe برای ارزیابی کراتینین یک روش کمپلکسومتری نیست، بدین معنی که معرف پیریک اسید با کراتینین واکنش شیمیایی داده و تولید رنگ می‌نماید که ارزیابی کینتیک 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 سولفانیک اسیددی یازوته سبب تولید ترکیب تغییر یافته آزو بیلی روبین 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.

برای ارزیابی مقدار روی موجود در نمونه سرمی از معرف (BRO-) $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{BrN}_4\text{Na}_2\text{O}_4\text{S}_2\text{H}_2\text{O}$ MO-PAPS-5 استفاده می‌شود. کمپلکس این ماده با روی در طول موج ۵۴۶ تا ۵۷۱ نانومتر دارای جذب نوری است.

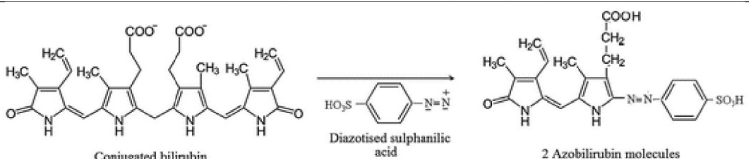
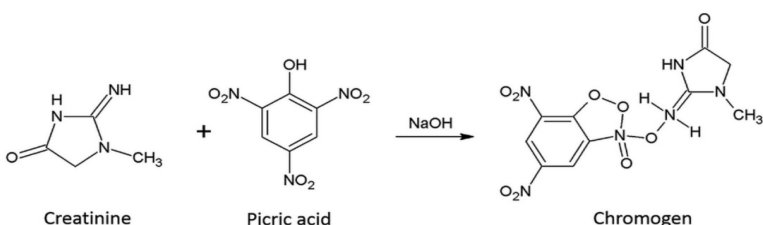
جهت ارزیابی منیزیم از زایلیدیل بلو استفاده می‌شود. این ترکیب در محیط قلیایی با منیزیم ترکیب کمپلکس قرمز رنگی را تشکیل می‌دهد که در طول موج ۵۴۶ نانومتر قابل شناسایی است.

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

۵. Bromocresol green

کمپلکسومتری		
Ferrozine	Bromocresol green	xylidyl blue
		
5-BROMO-PAPS		Biuret protein assay
		

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

تست های مبتنی بر واکنش های شیمیایی	
Diazotized sulfanilic acid & bilirubin	
	
Picric acid & creatine	
	

شکل ۱۰. اندازه گیری کراتنن و بیلی روبین با استفاده از واکنش های شیمیایی

می شود. دو تست ارزیابی نیمه کمی C reactive (protein (CRP و هموگلوبین A₁C به کمک آنتی بادی و روش ایمنوتوریدومتری ارزیابی می شوند (۳۱).

در کنار تنوع در روش های استفاده شده برای ارزیابی آنالیت ها، واحدهای آنها نیز متفاوت است. برای مثال برای گزارش مقادیر گلوکز و تری گلیسیرید از واحد mg/dl استفاده می شود. اصولاً برای گزارش آنزیم ها از واحد international unit استفاده می شود.

نتیجه گیری

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

لازم به ذکر است که معرف اریخ برای ارزیابی اوروبیلینوزن از قسمت آلدئید وارد واکنش می شود. واکنشی که مشابه واکنش این معرف با ایندول های موجود در ترکیبات سایکواکتیو می باشد (شکل ۱۰).

روش ایمنوتوریدومتری

اصولاً برای ارزیابی ترکیباتی که دارای خواص آنتی ژنیک هستند، از آنتی بادی استفاده می شود. استفاده از آنتی بادی در قالب تست های الایزا و تست های ایمنو کمی لومیسنس می تواند نتایج بسیار دقیقی داشته باشد. اما گاهی چنین دقتی وجود ندارد یا زمانبر بودن تست می تواند ارزیابی ها را با مشکل دچار کند لذا از روش های نیمه کمی استفاده

تضاد منافع

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

منابع مالی

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

روش های آزمایشگاهی در بخش بیوشیمی، اساس آزمایش ها مشابهت بالایی دارد و از اصول کاملاً منطقی پیروی می کند. شناخت این اصول به تکنسین آزمایشگاه کمک می کند تا در انجام صحیح تست و رفع خطاهای احتمالی توانمندتر باشد.

مشارکت نویسندگان

درصد مشارکت نویسندگان به ترتیب نام آنها 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. Dorobanțu I, Radu M, Hărănguș 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, Bahrani 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.