جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تست تشخیص سریع مورفین در ادرار به روش مهار لاتکس آگلوتیناسیون

دکتر عظیم اکبرزاده ♦
دکتر داریوش نوروزیان □
بهرخ فرهمند •

ما یک روش شناسائی ایمونولوژیکی ساده و سریع برای تشخیص مورفین را طرّاحی کرده‌ایم که بر مبنای واکنش مهار آگلوتیناسیون لاتکس می باشد. مورفین-٦- سوکسینات (M-6-S) یکی از مشتقّات مورفین و فرم کونژوگه آن با BSA ، یعنی مورفین-٦-سوکسینات-BSA (M-6-S-BSA)، قبلاً طراحی و ساخته شد و خصوصیّات آن مورد ارزیابی قرارگرفت. تعداد مولکول (M-6-S) در مولکول کونژوگه (M-6-S-BSA) با روش اسپکتروسکوپی، ۸/۲ مول بر یک مول BSA ، تعیین شد. در کارهای قبلی مشخّص شد که مورفین-٦- سوکسینیل- BSA از لحاظ ویژگی‌های ایمونوشیمیایی دارای قابلیّت‌های مطلوب و موردنظر می باشد. در این کار ثابت شد که تست تشخیصی مهار آگلوتیناسیون لاتکس با استفاده از آنتی بادی IgG خالص‌شده بوسیله سلولز-DEAE که برعلیه مورفین-٦- سوکسینیل-BSA در بدن خرگوش بدست آمد، دارای حسّاسیتی تا ۳۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر مورفین می‌باشد. مواد مخدّر و داروهای گوناگون با غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و یا کمتر با این تست تشخیصی تداخل ندارند. مشاهده شد که بعضی از نمونه‌های ادرار با محلول آنتی‌بادی آگلوتیناسیون کاذب می‌دهد امّا این مشکل بوسیله اضافه کردن ۰/۷۸% سرم نرمال خرگوش در ادرار برطرف شد. لاتکس حسّاس‌شده در یخچال (°C ٤) به مدّت ٦ ماه پایدار است. همچنین در برابر عمل لئوفیلیزاسیون مقاوم است و قادر به تحمّل حدّاقل چهاربار عمل ذوب و انجماد می باشد. کل زمان لازم برای انجام تست با (LAIRT) پنج دقیقه می‌باشد. برای مقایسه روش ما (LAIRT) با روش EMIT (Enzyme-multiplied immunoassay)، بر روی ۱۰۰ نمونه ادرار افراد مراجعه‌کننده به آزمایشگاه بررسی انجام‌شد. نتایج بدست آمده با روش EMIT ، ۸٤ مثبت و ١٦ منفی و با روش LAIRT ، ٦٨ مثبت و ۳۲ منفی بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری را بین دو روش نشان نمی‌دهد (P> ۰/۰۵).

واژه‌های کلیدی: *مورفین؛ ایمونواسی؛ لاتکس آگلوتیناسیون.*

♦ دانشیار و عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران- رئیس بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران
□ استادیار و عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران- رئیس بخش واکسنهای باکتریایی انستیتو پاستور ایران
• محقّق بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدّمه

مورفین که یک محرّک سیستم اعصاب مرکزی می‌باشد، بطور گسترده در ایران مصرف می‌شود. مورفین در نمونه‌های ادرار افراد مصرف‌کننده وجود دارد و اعتیاد به آن در بعضی کشورها همچنان رو به افزایش است. آمار دقیقی در این رابطه وجود ندارد، امّا این موضوع محرز است که هر روز به تعداد معتادان به مورفین افزوده می شود (۱و۲).

مصرف گسترده و روز افزون مورفین بدون شک باعث ایجاد مشکلات اجتماعی زیادی شده‌است و همواره بعنوان یک معضل مهم، در جوامع درگیر، مطرح است. یک روش مواجهه با این مشکل، تهیّه روش‌های تشخیص سریع و مقرون به صرفه می‌باشد، بطوریکه بتوان برآورد دقیقی از مصرف‌کنندگان آن بعمل آورد. هزینه لازم برای انجام هر تست EMIT ، ٦ دلار آمریکا می باشد و در عین حال تجهیزات لازم برای انجام روش FPIA (فلورسانس پلاریزاسیون ایمونواسی) نسبتاً گرانقیمت است و در کشورهای در حال توسعه روش مناسبی نیست.

یک روش برای تشخیص مورفین تست مهار آگلوتیناسیون است که انجام آن ۳ ساعت طول می‌کشد (۳). زمان تست مهار آگلوتیناسیون در لوله های حاوی لاتکس نیز ۲ ساعت به طول می‌انجامد (٤). کیت‌های abuscreen که توسّط کارخانه Roche تولید می‌شوند، روش مناسبی برای تشخیص مورفین است امّا انجام هر آزمایش در ایران ٤ دلار آمریکا هزینه دارد (۵). در مقابل، زمان تست LAIRT که در بخش پایلوت بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران طراحی و انجام یافته و قابلیّت تشخیص مورفین را با حسّاسیّت زیادی دارا می‌باشد، ۵ دقیقه به طول می‌انجامد و ۰/۵ دلار هزینه دارد.

بنابراین بهره‌مندبودن از روش‌های تشخیص مورفین که ساده و سریع و ارزان باشند، در شناسائی معتادان بسیار مؤثّر است که تشخیص و تعیین واقعی افراد معتاد جامعه، سبب برنامه ریزی سالم و قابل اجرا می‌شود. در این مقاله خصوصیّات و ویژگی‌های کیت تشخیص سریع مورفین در ادرار به روش مهار لاتکس آگلوتیناسیون مورد ارزیابی قرار گرفته است (٦).

روش پژوهش

تهیّهٔ مورفین خالص: ۱۰ گرم سولفات مورفین در ۱٦۰ میلی‌لیتر آب مقطّر در دمای اتاق حل شد. PH محلول با آمونیم هیدروکساید بر روی ۸ تنظیم‌شد. سپس مولکول خالص مورفین به روش رسوب‌دادن با آمونیاک در PH=۸ کریستال شد و پس از فیلتر کردن، در دمای ٦۰°C تحت خلأ خشک شد (۲،۱ و۷).

سنتز M-6-S : M-6-S ، بوسیله حرارت دادن یک مول مورفین خالص با ۳ مول انهیدرید سوکسینیک در پیریدین خشک تهیّه شد. در این واکنش مورفین از ناحیه گروه ٦- هیدروکسی بطور انتخابی سوکسینیله می شود. ۱۲ گرم مورفین خالص را به همراه ۷/۵ گرم سوکسینیک انهیدرید در ۱۵۰ میلی‌لیتر پیریدین مخلوط می کنیم و ٤/۵ ساعت رفلاکس می‌کنیم.

این عمل در یک فلاسک ۱۰۰۰ میلی لیتری مجهز به مبرّد انجام می‌شود. پس از پایان واکنش، پیریدین را تحت خلأ، تبخیر کرده، رسوب را ۵ بار با اتانول داغ می‌شوئیم و در آخر دوبار با اتانول ٦۰ درصد کریستال می‌کنیم. از لحاظ تئوری راندمان واکنش تولید M-6-S ، ۸۵-۸۰% می‌باشد (۹-۷).

کروماتوگرافی

برای جداسازی M-6-S از مورفین به روش TLC، مناسب‌ترین حلّال اتانول، دی‌اکسان، بنزن و آمونیوم هیدروکساید (با نسبت حجمی ۸ ، ۱ ، ۱۰ ، ۱) می‌باشد. با این حلال R_f مورفین ۰/۵٦ و R_f مرفین-٦-سوکسینات ۰/۱٤ است. پس از دوبار TLC ، محصول

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

همان ایمونوگلوبولین موردنظر است بعد از دیالیز بوسیله کروماتوگرافی به روش تعویض یونی با سلولز- DEAE خالص شد (۱۶-۱٤).

بسط و توسعه تشخیص سریع مورفین به روش مهار لاتکس آگلوتیناسیون (LAIRT)

از ایمونوگلوبولین خالص‌شده توسّط سلّولز- DEAE ، جهت حسّاس کردن ذرّات لاتکس استفاده شد. ابتدا از سوسپانسیون ۱۰% ذرّات لاتکس (پلی استایرن) ۲ بار با بافر گلاسین- سالین (GBS) (pH=۸/۲) شسته شد.

پوشاندن ذرّات لاتکس با آنتی‌ژن (M-6-S-BSA) به این روش انجام شد: ۲۰۰ میکرولیتر IgG را در GBS که قبلاً غلظت آن مشخّص شده‌بود با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون لاتکس ۱۰% شسته شده، مخلوط کردیم. مخلوط را در حمّام آب گرم در ۳۷ درجه سانتیگراد بمدّت ۳۰ دقیقه انکوبه کرده، سپس دو بار با GBS شستشو دادیم. بعد از شستن، لاتکس پوشانده شده با آنتی بادی را با محلول GBS ، PH=۸/۲ که حاوی ۰/۵% سرم خرگوش طبیعی است سوسپانسیون کرده، در یخچال (٤ درجه سانتیگراد) نگهداری شد، تا در هنگام نیاز از آن استفاده شود (۱۷). در واقع پوشاندن ذرّات لاتکس با آنتی‌ژن و آنتی‌بادی با همین روش انجام می‌شود.

غلظت‌های گوناگون IgG

از IgG تخلیص‌شده با سلّولز DEAE ، رقّت‌های مختلف: ۳۰۰ و ۱۵۰ ، ۷۵ ، ۳۷/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در محلول GBS با pH=۸/۲ تهیّه کرده و مطابق بالا با ۱۰% سوسپانسیون لاتکس شسته شده کوت کردیم. بهترین غلظت IgG ، غلظتی است که بتواند کمترین مقدار M-6-S-BSA را با لاتکس آگلوتیناسیون و کمترین مقدار مورفین را در LAIRT ردیابی کند (۱۷).

پایداری سوسپانسیون لاتکس حسّاس‌شده با آنتی‌بادی

۰/۵% سوسپانسیون لاتکس حسّاس‌شده با آنتی‌بادی در محلول بافر- GBS ، (PH 8.2) که دارای ۰/۵% سرم نرمال خرگوش می‌باشد، در یخچال ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد. در این شرایط پایداری لاتکس حسّاس‌شده با آنتی‌بادی به شکل هفتگی و ماهانه بررسی شد. مقداری از آن جهت بررسی مقاومت آن در برابر ذوب و انجماد و لیوفیلیزاسیون، مورد آزمایش قرار گرفت (۱۷).

اختصاصی‌بودن LAIRT در تشخیص مورفین

جهت بررسی عملکرد اختصاصی LAIRT برای تشخیص مورفین، مطالعات و آزمایشاتی با داروهای دیگر و تعدادی از مواد مخدّر رایج بعمل‌آمد. این داروها به طور مجزا در ادرار و بافر GBS حل شدند و تداخل آنها با تست LAIRT مورد ارزیابی قرار گرفت؛ در این عمل بالاترین غلظت موادی که روی تست، تداخل ایجاد نمی‌کند ثبت شد.

جمع‌آوری نمونه‌های ادرار

نمونه‌های ادرار را در بطری‌های پلاستیکی جمع‌آوری کرده و بلافاصله در یخ خنک کرده و پس از رسیدن به آزمایشگاه نمونه ها در ۲۰°C- نگاهداری نمودیم. قبل از استفاده، نمونه ها در ۱۰۰۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند تا محلول روئی کاملاً شفاف شود (۱۷). دقت در خنک و سانتریفوژ کردن ضروری است.

تشخیص مورفین به روش EMIT

هر نمونه ادرار به صورت دوتایی برای تشخیص مورفین به روش EMIT مورد آزمایش قرار گرفت. نمونه‌هایی که با این روش برای تشخیص مورفین جواب مثبت دادند، با کیت تشخیص مورفین شرکت روش (Roche Abuscrren)، مورد کنترل قرار گرفتند. نمونه‌هایی که با این روش نیز جواب مثبت دادند، به

عنوان نمونه‌های شاهد مثبت در نظر گرفته شدند. برای نمونه‌های شاهد منفی نیز از ادرار ۱۰ نفر از پرسنل آزمایشگاه استفاده شد (۱۹و۱۸).

تعیین مقدار پروتئین

در این کار غلظت آنتی‌بادی به روش لوری و غلظت M-6-S-BSA به روش پیروگالول تعیین مقدار شد (۲۱-۲۰).

یافته‌ها

سنتز M-6-S و تهیّه فرم بهم پیوسته آن با BSA

در این کار (M-6-S) با راندمان ۸۰% سنتز و با الکل ٦٥% به شکل ذرّات سفید پنبه مانند، کریستال شد. اتصالM-6-S با BSA که در ۱ و ٤ دی‌اکسان صورت پذیرفت، منجربه بازیافت ۸٦/٥% (M-6-S-BSA) بعد از عمل دیالیز شد. ضریب خاموشی که بوسیلهٔ اندازه‌گیری OD در ۲۸۰ نانومتر، تعیین و محاسبه شد، عبارتنداز: OD برابر ۰/۳۲۵ برای BSA (۱ میلی گرم در۲ میلی لیتر)، OD برابر ۱/۱ برای M-6-S (۱ میلی گرم در۲ میلی لیتر) و OD برابر ۰/۳۷۵ برای M-6-S-BSA (۱میلی گرم در۲میلی لیتر).

تعداد مولکول‌های متّصل‌شده M-6-S به هر مولکول BSA معادل ۸/۲ مول M-6-S به ازای هر مول BSA محاسبه شد. از آنجا که هر مولکول BSA دارای ٦۰ گروه آمینی است، واکنش بهم پیوستن BSA با M-6-S تنها در ۱۳/٦% گروه‌های آمینی مولکول BSA انجام‌شده است.

تهیّه و آماده‌سازی تست LAIRT

اثر غلظت IgG در حسّاس کردن ذرّات لاتکس: در این تحقیق غلظت های مختلف IgG جهت حسّاس کردن ذرّات لاتکس بکار گرفته‌شد. بهترین غلظت IgG برای حسّاس کردن لاتکس ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. ذرّات لاتکس حسّاس‌شده با آنتی‌بادی ضدّ M-6-S-BSA، توانائی آگلوتینه کردن ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر از M-6-S-BSA ، M-6-S و مورفین را دارد. M-6-S-BSA با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در تست LAIRT برای تشخیص مورفین استفاده شد و جواب کاملاً مورد قبول بدست آمد.

اثر ادرار در تست LAIRT

بررسی‌ها و آزمایشات بر روی نمونه‌های ادرار ۲۰ زن که برای انجام تست بارداری به بیمارستان امام خمینی مراجعت کرده‌بودند و همچنین نمونه‌های ادرار ۲۰ فرد معتاد که اعتیاد آنها بوسیلهٔ تست EMIT در آزمایشگاه تأیید شده بود انجام شد.

هنگام انجام تست LAIRT ، در بعضی نمونه‌ها آگلوتیناسیون‌های غیر اختصاصی مشاهده شد. بدین ترتیب که پس از مخلوط کردن نمونه‌های ادرار بطور مستقیم با ذرّات لاتکس حسّاس‌شده با آنتی‌بادی بدون حضور آنتی ژن، آگلوتیناسیون‌های غیر اختصاصی مشاهده کردیم، با اضافه کردن سرم طبیعی خرگوش به غلظت ۰/۷۸% در ذرّات لاتکس حسّاس شده با آنتی‌بادی خرگوش جواب مثبت کاذب را حذف کردیم.

تشخیص مورفین به روش LAIRT

همانگونه که بیان شد، ذرّات لاتکس با آنتی‌بادی خالص شده بر علیه M-6-S-BSA حسّاس شدند. این لاتکس حسّاس شده با مورفین واکنش داده شد. حسّاسیّت تست LAIRT در تشخیص مورفین، ۳۰۰ نانوگرم مورفین در میلی لیتر ادرار بود. در حالیکه حدّ لازم برای تشخیص M-6-S ، ۲۵۰ نانو گرم در میلی لیتر ادرار بود.

اثر برخی از داروها و موادّ مخدّر رایج بر تست LAIRT هنگام ردیابی مورفین

داروهای مختلفی که در این کار مورد بررسی قرار گرفتند، با دوزهای معمول اثری روی تست LAIRT ندارند. استامینوفن، کافئین، همولوگهای مورفین و فنوباربیتال سدیم با غلظت کمتر از ۰/۱ میلی گرم در میلی‌لیتر باعث تداخل و مهار در تست نمی‌شوند.

پایداری ذرّات لاتکس حسّاس شده با IgG

همانطور که در قسمت مواد و روش‌ها ذکرشد، لاتکس حسّاس شده با IgG در دمای ٤ درجه سانتیگراد به مدّت حدّاقل ٦ ماه پایداری خود را حفظ می‌کند، بدون اینکه در حسّاسیّت آن برای تشخیص مورفین تغییری ایجاد شود. این ذرّات همچنین در برابر ٤ بار عمل ذوب و انجماد و لیوفیلزاسیون پایدار بودند.

جدول ۱ : نتایج تشخیص مورفین ادرار به دو روش LAIRT و EMIT

LAIRT	EMIT		Total
	-	+	
+	*7*	*61*	*68*
-	*9*	*23*	*32*
Total	*16*	*84*	*100*

مقایسهٔ تشخیص مورفین به دو روش EMIT وLAIRT

نمونه های ادرار ۱۰۰ بیمار که به آزمایشگاه رفرانس مراجعه کرده بودند جمع‌آوری شد. بیشتر نمونه‌های ادرار دارای ظاهری کدر بودند که در اثر قراردادن بر روی یخ، رسوب زیادی در آنها ایجادشد.

میانگین PH در این نمونه ها ۱/۲ ± ٦/٤٥ بود. نمونه ها با هر دو روش EMIT وLAIRT مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصله در جدول (۱) آمده است. با روش EMIT ، ٨٤ مورد مثبت و ١٦ مورد منفی مشاهده شد. در حالیکه با روش LAIRT، ٦٨ مورد مثبت و ۳۲ مورد منفی داشتیم. مقایسه نتایج دو بررسی به روش McNemar χ^2 Test ، اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان نمی‌دهد ($P<0.05$).

بحث

مسأله اعتیاد به مورفین در کشورهای در حال توسعه به ویژه ایران، بسیار جدّی و مشکل آفرین است. آمار نشان‌می دهد که حدود ۲% از مردم برای ایجاد حالت سرخوشی و نشئگی از مورفین و مشتقّات آن استفاده می‌کنند. این رقم همواره توسّط ادارهٔ مبارزه با موادّ مخدّر ایران تأیید و اعلام شده‌است. واضح است که اعتیاد به مورفین باعث عقب ماندگی هر چه بیشتر کشورهای در حال توسعه می‌شود. یک راه برای کم‌کردن مصرف مورفین و اعتیاد به آن، شناسائی معتادان باروش‌های تشخیص دقیق و متعاقباً درمان آنها می‌باشد. برای این منظور، هم اکنون روش‌های گوناگونی برای تشخیص مورفین در ادرار در دسترس است. بعضی از معایب این روش‌های تشخیص عبارتند از هزینه بالای آنها به دلیل گرانی موادّ و تجهیزات و استفاده از پرسنل متخصّص، استفاده از معرّف‌های ناپایدار و در نهایت طولانی بودن زمان لازم برای انجام تست نیز مهم است.

زمان لازم برای انجام تست باید حتّی المقدور کوتاه باشد تا افراد مورد آزمایش مجبور به صرف وقت زیادی نشوند. اینکه نمونه از بیمار گرفته شود و سپس چندین بار وی مجبور به مراجعه شود در عمل امکان‌پذیر نیست. این مشکل با طرّاحی دقیق و تولید آنتی‌بادی بر علیه مورفین برطرف می شود. در این تحقیق نشان داده شد که تغییرات ساختمانی دقیق و هوشمندانه در ماده ایمنی‌زا (M-6-S-BSA) می تواند باعث بهبود عملکرد اختصاصی آنتی‌بادی شود.

بنابراین آنتی‌بادی‌های تولیدشده بر علیه M-6-S-BSA به خوبی در برابر مورفین واکنش نشان می‌دهند.

بعلاوه آنتی‌بادی‌های بوجودآمده بر علیه ایمونوژنی که یکی از مشتقّات مورفین با استخلاف در ناحیهٔ ٦ حلقه فنیلی باشد، در برابر مورفین بطور خیلی اختصاصی عمل می‌کنند. در این مطالعه، گروه هاپتنی متّصل به BSA ، مولکول M-6-S می‌باشد که در واقع آنتی‌بادی برعلیه مولکول مورفینی که دارای یک مولکول سوکسینیل می‌باشد بوجود می‌آید.

حدّاقل غلظت مورفین در ادرار برای تشخیص، ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ادرار است. توجّه به این نکته جالب است که در حالیکه M-6-S-BSA به ندرت موجب تولید آنتی‌بادی اختصاصی (مونوکلونال) در خرگوش می‌شود، آنتی سرم (پلی کلونال آنتی بادی) با تیتر بالائی، بواسطه اثر تحریکی M-6-S-BSA بوجود می‌آید. این احتمالاً بدلیل وجود ٤ اتم فاصله بین گروه هاپتنی و پروتئین ناقل در کمپلکس مادّه ایمنی‌زا (ایمونوژن) می‌باشد.

این مسأله نشان می‌دهد که یک مادّه ایمونوژن برای داشتن کارایی و اثر مطلوب نیاز به داشتن یک حدّاقل دانسیته لیگاندی است، که این مقدار بین ۱۵-۵ گزارش شده است. بنابراین یکی از مراحل کار تعیین دانسیته لیگاندی در M-6-S-BSA به روش‌های اسپکتروفتومتری بود که پس از انجام این کار، مقدار ۸/۲ مول مولکول مورفین به ازای هر مول مولکول BSA بدست آمد.

نتایج بررسی‌های نمونه‌های ادرار بیماران مرجوعی به آزمایشگاه رفرانس که با دو روش EMIT و LAIRT انجام شد، از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد، اما به هرحال در روش LAIRT تعداد نمونه های مثبت بیشتر بود. احتمالا این مسأله به دلیل حسّاسیّت کمتر روش LAIRT نسبت به روش EMIT می‌باشد. تعداد دقیق موارد یادشده عبارت بود از ۷ مورد که با روش LAIRT نتایج مثبت داشتند امّا با روش EMIT جواب منفی بود. به هرحال این موارد ممکن است به دلیل تداخل موادّ موجود در ادرار، مثبت کاذب باشند، اگرچه جواب‌های منفی کاذب به روش EMIT را نیز نمی‌توان نادیده‌گرفت. علیرغم حسّاسیّت کمتر نسبت به مورفین در روش LAIRT ، این روش نسبت به روش EMIT دارای چندین مزیّت می‌باشد. اوّلین آنها اقتصادی بودن این روش است (تقریبا ۰/۵ دلار برای هر کیت تولید شده در انستیتوپاستور) .

همچنین این روش نیاز به تجهیزات گرانقیمت و مهارت‌های فردی برای انجام آن ندارد. معرف‌ها در شرایط نامساعد (مثل حمل و نقل و شرایط نگهداری در کشورهای در حال توسعه با آب و هوای گرم و مرطوب) کاملاً پایدار هستند. مزیّت دیگر، زمان کوتاهی است که برای انجام این تست لازم است (حدود ۵ دقیقه). با توجّه به مزایای فوق، روش تشخیص و ردیابی مورفین و شناسائی معتادان به روش LAIRT ، یک روش مفید و کارآمد در این کشور و سایر کشورها می باشد.

Abstract

Rapid Latex Agglutination Inhibition Reaction Test for Morphine in Urine

A simple and rapid immunoassay of morphine based on latex agglutination inhibition reaction has been developed . Morphine-6-succinat is a morphine derivative , and its BSA conjugates were synthesized and characterized . The hapten density in the conjugate was determined spectroscopically to be 8.2 mol/mol of BSA . It was found that morphine-6-succinyl-BSA exhibits favorable features in terms of immunogenicity and immunochemical specificity . A latex agglutination inhibition reaction test (LAIRT) using DEAE-Cellulose purified rabbit IgG against morphine-6-succinyl-BSA was found to give a sensitivity of 300 mg/ml of morphine. Various commonly used drugs and narcotics at concentrations 0.1 mg/ml or less did not interfere with the test . Interference by normal urine was observed but it could be eliminated by the inclusion of 0.78% normal rabbit serum . The sensitized latex was stable at 4°C for at least 6 months . It was also stable to lyophilization and to at least four cycles of freezing and thawing . The total test time was 5 minutes . A comparision was made between the LAIRT and EMIT on 100 urine samples collected from people who refered to governmental narcotic clinic (Reference Lab. Tehran, Iran). While the EMIT showed 84 positives and 16 negatives , the LAIRT gave 68 positives and 32 negatives . The two tests showed no significant difference ($P<0.05$).

Key words : *Morphine ; Immunoassay ; Latex Agglutination.*

منابع

1. Azim Akbarzadeh, Mohammad Mehrabi, Mahnaz Zarbakhsh and Hasan Farzaneh. (1999) J. Biotech. Appl. Biochem. (30): 139-145.
2. Azim Akbarzadeh, Dariush Norouzian, Behrokh Farahmand and Davoud Nouri Inanlou. (2002) Current Science Indian. (83): 57-60.
3. Frank L. A., and Chi-Tan L. (1997) J. of Immunology. (106): 1684-1685.
4. Robert R., Charles A. H., Hans H. (1975) Clin. Chem. (21): 139-143
5. David A. A. and John M. K. (1992) Journal of Analytical toxicology. (16): 172-175.
6. Jun-Ichi S., Noppavan J., Kunisuke N. and Tadao T. (1988) Molecular Immunology. (25): 937-943.

7. Eric J. S., William P. D. and Jacob M. H. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA. (69): 1835-1837.
8. Bruce H. W.R., Frank W. F. (1972) Science. (178): 647-648.
9. Bruce H. W., Frank W. F., Richard M. R., (1972) Science. (176): 1143-51.
10. Bernard F. E., Fellix B., Sam M. B. and Seymour L.(1957) J. Biol. Chim. (228): 713-727.
11. Sydney S. and Charles W. P. (1970) Science. (168): 1347-1348.
12. Spratt J. L. and Jones, S. B. (1976) Life Sciences. (18): 1013-1020.
13. Jay A. G., William M. B. and Richard F. V. (1983) Molecular Immunology. (20): 1419-1422.
14. Bruce H. W., Frank W. F., Josef F., and Richard M. R. (1973) Journal of immunology. (110): 667-673.
15. Helen V. V., Eleanor W. and Lawrence L. (1972) J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics (180): 514-521.
16. Sydney S., Barry B., Edward J. F. and Bernard P. (1973) Pharmacological Reviews. (25): 281-291.
17. Duangrat, M., Bongkoch, T., and Kavi, R. (1993) J. of Immunological Methods. (157): 189-195.
18. EMIT, Operator' s Manual. Palo Alto, Calif. (1972) Syva Corp.
19. Rubenstein, K. E., Schneider, R. S. and Ullman, E. F. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. (47): 846.
20. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L. and Randall. R. J. (1951) J. Biol. Chem. (193): 265-275.