بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر Cut-off سامانه تشخیص سریع مورفین بر پایه روش(Lateral Flow Assay (LFA

حسنا شاملواحمدی [۱]، محمد هیئت [۲]،حمید راشدی [۱]، غلام رضا اولاد [۲]، علی محمد لطیفی [۲*]، رشید حیدری مقدم [۳]

۱) دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده های فنی، دانشگاه تهران

۲) مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

۳) دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۷

چکیده

مقدمه: Lateral Flow Assay یک تست تشخیص سریع اعتیاد است که کاربرد فراوانی در زمینه شناسایی افراد معتاد دارد. اما مسئله سطح تشخیص این سیستم همواره به عنوان محدودیتی برای آن مطرح بوده است. مطالعه حاضر به بررسی چگونگی بهبود این پارامتر و حساسیت سامانه می پردازد.

مواد و روش ها: pH کانژوگاسیون، OD ماده کانژوگه و غلظت BSA- مورفین در باند تست بر سطح تشخیص این سامانه مؤثرند. جهت تعیین pH بهینه از کیت«Gold in a box» استفاده شد. با اعمال محلول مورفین در غلظت های مختلف، ابتدا با فرض یک غلظت ثابت برای BSA- مورفین، OD بهینه تعیین شد و سپس با ثابت گرفتن مقدار OD، غلظت بهینه BSA- مورفین به دست آمد. در ادامه تأثیر دو فاکتور بلوکه نمودن لایه کانژوگه و افزودن قند به ماده کانژوگه نیز بررسی شد.

یافته های پژوهش: pH=۸/۴ و OD=۱ به عنوان pH و OD بهینه تعیین شد. غلظت بهینه BSA- مورفین در باند تست نیز ۰/۵ mg/ml به دست آمد. با اعمال شرایط بهینه، سطح تشخیص سامانه به ۲۵ ng/ml رسید و از مقایسه نتایج حاصل از کیت های بهینه سازی شده با یک نوع کیت استاندارد، حساسیت و اختصاصیت نتایج برابر ۱۰۰ و ۹۹ درصد برآورد شد.

بحث و نتیجه‌گیری: یافتن فاکتورهای اثرگذار بر عملکرد روش تشخیصی لترال فلو و بهینه سازی آن ها می تواند راهکاری مؤثر جهت افزایش حساسیت و کاهش سطح تشخیص این سامانه باشد.

واژه های کلیدی: تشخیص مورفین، OD ماده کانژوگه، pH کانژوگاسیون، سامانه LFA، بهینه سازی

* **نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج) تهران

Email: amlatify@yahoo.com

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

مقدمه

مورفین یک اپیوئید بسیار قوی است که از تریاک به دست می آید و مهم ترین ترکیب مؤثره آن است. مورفین محرک سیستم اعصاب مرکزی است و تأثیر آن کاهش احساس درد و ایجاد حالت سر خوشی می باشد. بخش اعظم مورفین در کبد متابولیزه می شود و تا ۷۲ ساعت پس از مصرف، در ادرار فرد مصرف کننده قابل تشخیص است.(۱،۲)

هر چند آمار دقیقی وجود ندارد اما متأسفانه این موضوع محرز است که اعتیاد معضلی جهانی شده و هر روز به تعداد معتادان افزوده می شود و بدون شک همین مسئله، مشکلات اجتماعی فراوانی را در جوامع درگیر از جمله کشور ما ایجاد می نماید.

ضمن این که باید مصرف بی رویه و خودسرانه داروهای حاوی مواد مخدر از جمله استامینوفن کدئین، ترامادول و دیفینوکسیلات و وابستگی ایجاد شده افراد مصرف کننده نسبت به این داروها را نیز به عنوان یک معضل جدید خاطر نشان کرد.

یک راهکار جهت مواجه با این مشکلات، استفاده از تست های تشخیصی ساده، سریع و ارزان است که قادرند بدون نیاز به پرسنل آموزش دیده یا دستگاه خاصی اعتیاد یا عدم اعتیاد افراد مظنون را تعیین کرده و برآورد دقیقی از تعداد مصرف کنندگان این ماده مخدر به عمل آوردند. بدین ترتیب برنامه ریزی جهت درمان و پیشگیری از افزایش بیش از پیش تعداد این افراد با دقت بیشتری امکان پذیر می گردد.

تست(Lateral Flow Assay (LFA کلیه ویژگی های ذکر شده را دارد و این مزایای قابل توجه، روش فوق را به یک شیوه تشخیصی بسیار رایج در زمینه های مختلف پزشکی، کشاورزی، صنایع غذایی و... تبدیل کرده است،(۳،۴). البته این روش معایبی نیز دارد، که عمدتاً به محدود بودن سطح تشخیص(cut off) این روش و امکان پذیر نبودن استفاده مجدد از آن مربوط می شود.(۵)

نحوه عملکرد استریپ های LFA به این ترتیب است که این فرایند تشخیصی با اضافه نمودن مقدار کمی از نمونه مورد سنجش(که در مطالعه حاضر ادرار بوده است) بر روی بخشی از استریپ که آن را لایه نمونه می نامند آغاز می گردد. نمونه پس از گذراندن مراحلی در این لایه، از طریق خاصیت موئینگی به سمت جلو حرکت کرده و به لایه دوم به نام لایه کانژوگه-جایی که ماده کانژوگه قرار دارد- می رسد. ماده کانژوگه ماهیتی جز ذرات کوچک معرفی که به یک عنصر تشخیصی چسبیده اند ندارد. هنگامی که نمونه به لایه کانژوگه می رسد، مواد کانژوگه خشک شده را از جا کَنده و با خود به جلو می‌برد. در این هنگام آنالیت های موجود در نمونه در صورت وجود، با مواد کانژوگه اندرکنش می دهند و هر دو با هم به سمت لایه بعدی یعنی لایه آنالیتیکال حرکت می کنند.(۸-۶)

اصلی ترین لایه در سیستم لترال فلو لایه آنالیتیکال است. در این ناحیه معمولاً ۲ باند به نام های تست و کنترل تثبیت می شود و بر اساس مشاهدات صورت گرفته از این لایه نتیجه تست ارزیابی می گردد. در نهایت نمونه به لایه چهارم به نام لایه جاذب می رسد و در آن جا جذب می گردد. با این کار از بازگشت آن به لایه های قبلی و ایجاد پاسخ خطای کاذب جلوگیری می شود. نمایی کلی از یک سامانه LFA را در شکل شماره ۱ می بینیم.(۹،۱۰)

در این پژوهش جزئیات ساخت کیت تشخیص سریع مورفین بر پایه روش LFA بیان شده است. ضمن این که فاکتورهای مؤثر بر سطح تشخیص این کیت که عبارتند از pH کانژوگاسیون و OD ماده کانژوگه، غلظت BSA-مورفین در باند تست، لزوم بلاک نمودن لایه کانژوگه و کیفیت رهایش ماده کانژوگه ازآن بررسی و بهینه سازی شده اند.

مواد و روش ها

ساخت ماده کانژوگه: ماده کانژوگه حاصل کانژوگاسیون یک معرف با آنتی بادی مونوکلونال ضد مورفین می باشد که در این پژوهش نانو ذرات کلوئیدی طلا با OD=۱/۱ و اندازه ذرات ۴۰ nm به عنوان معرف انتخاب شد. مرحله اول کار جهت تهیه ماده کانژوگه، تنظیم pH نانو ذرات بود. بهترین pH ای که در آن کانژوگاسیون آنتی بادی با نانو ذرات به خوبی صورت می پذیرد pH ایزوالکتریک آنتی بادی است. برای تعیین این pH ازکیت«gold in a box» ساخت شرکت Bioassay استفاده شد.

جهت اطمینان از صحت pH ایزوالکتریک به دست آمده، یک مرحله تأیید نهایی توسط دستگاه طیف سنج مرئی-فرابنفش انجام شد. بدین صورت که ماده کانژوگه با pH اپتیمم تهیه شد و میزان جذب آن در دو طول موج ۵۸۰ nm و ۵۲۰ با میزان جذب نانو ذرات خام در این طول موج ها مقایسه گردید.

تهیه لایه کانژوگه: پس از تعیین pH مناسب ml ۳ از محلول نانو ذره طلا در فالکونی ریخته شده و pH اپتیمم،

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

با افزودن محلول پتاسیم کربنات تنظیم شد. سپس ۱۰µl آنتی بادی مونوکلونال ضد مورفین بدان افزوده و ۳۰ دقیقه زمان داده شد. مرحله بعد بلاکینگ سطح نانو ذرات بود که با افزودن ۳۰۰ µl محلول w/vBSA ۱۰ درصد، صورت گرفت. ماده کانژوگه بلاک شده در دو تیوب ۱/۵ ml ریخته شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، با نیروی ۷۵۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی خارج گردید و رسوب نانو ذرات در ته تیوب با محلول BSA ۱۰ درصد در بافر فسفات دوباره به حالت معلق درآورده شد. در مرحله بعد جهت بالا بردن کیفیت ماده کانژوگه و سهولت رهاسازی آن از لایه کانژوگه، ۰/۰۳ gr سوکروز و ۰/۰۱۵gr تری هالوز بدان افزوده شد. بدین ترتیب ۳۰۰ µl ماده کانژوگه با ۱۰=OD آماده گردید.

سپس نوار پشم شیشه ای که به عرض ۹ mm و طول دلخواه برش داده شده بود در بافر بلوکه کننده غوطه ور شده و بلاک گردید. با توجه به این که یکی از مراحل بهینه سازی کار، تعیین OD مناسب برای ماده کانژوگه می باشد نیاز است ماده کانژوگه با OD های مختلف تهیه شود. لذا ماده کانژوگه با OD های ۲،۳،۴،۱ با افزودن بافر فسفات در مقادیر معین به ماده کانژوگه اصلی تهیه شده و هر یک روی نوارهای پشم شیشه ای که در مرحله قبل بلاک شده بودند ریخته شد. بدین ترتیب ۴ لایه کانژوگه با OD های مختلف به دست آمد.

ایجاد باندهای تست و کنترل: ۴ نوار به طول ۵ cm از بکینگ، کاغذ نیتروسلولزی و نوار سلولزی برش داده شد و لایه ها به دقت در جای خود روی بکینگ سوار شد. سپس محل باندهای تست و کنترل که به فاصله ۸ mm و ۱۳ از ابتدای کاغذ نیتروسلولزی فاصله دارند علامت گذاری شد. آن چه در باند تست تثبیت می شود با توجه به رقابتی بودن تست تشخیص مورفین کمپلکس BSA- مورفین است.

یکی دیگر از مراحل بهینه سازی آن است که غلظت BSA- مورفین بهینه در باند تست تعیین شود. در مرحله اول ساخت استریپ ها که به منظور به دست آوردن OD بهینه ماده کانژوگه انجام شد، در باند تست از غلظت پیش فرض ۲ mg/ml برای BSA- مورفین استفاده گردید و در مرحله دوم برای بهینه سازی غلظت BSA-مورفین در باند تست پس از یافتن OD بهینه ماده کانژوگه، غلظت های مختلف(۰/۵ mg/ml و ۱ و ۱/۵) BSA- مورفین تثبیت گردید و توان هریک مورد ارزیابی قرار گرفت.

در باند کنترل همه استریپ ها که ۵ mm از باند تست فاصله دارد آنتی بادی پلی کلونال ضد آنتی بادی موشی با غلظت ۱ mg/ml تثبیت شد. با استفاده از کاتر استریپ هایی با عرض ۴ میلی متر برش داده، به طور دقیق لیبل زده و تا مرحله تست نهایی در محل مناسبی نگهداری شدند.

تست نوارها جهت بهینه سازی OD کانژوگه و غلظت BSA- مورفین در باند تست: به منظور تست نوارها ابتدا به استریپ هایی که OD کانژوگه آن ها متفاوت بود، غلظت های مختلفی از محلول مورفین(۰/۵ mg/ml، ۰/۰۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۰۵، ۰/۰۰۰۰۲۵ ، ۰/۰۰۰۰۰۵) اعمال شد و توان تشخیصی هر یک از استریپ ها بدین وسیله مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از گذشت حدود ۲ دقیقه مشاهدات یادداشت شد.

سپس جهت یافتن غلظت بهینه BSA- مورفین در باند تست، استریپ هایی که با OD بهینه ماده کانژوگه و غلظت های مختلف BSA-مورفین در باند تست ساخته شده بودند با غلظت های مختلف محلول مورفین مورد ارزیابی قرار گرفتند و بدین ترتیب غلظت بهینه آنالیت در باند تست نیز تعیین شد. تأثیر بلاک نمودن لایه کانژوگه قبل از اعمال ماده کانژوگه به آن و اثر افزودن سوکروز و تری هالوز به ماده کانژوگه بر کیفیت رهایش آن از لایه نیز در ادامه بررسی شدند. بدین ترتیب که یک مجموعه کیت بدون بلاک نمودن لایه کانژوگه و یک سری دیگر بدون افزودن سوکروز و تری هالوز به ماده کانژوگه تهیه شده و سطح تشخیص و کیفیت رهاسازی ماده کانژوگه در آن ها به طور جداگانه با کیت های دیگر مقایسه شد.

جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت کیت ها، هماهنگی های لازم با آزمایشگاهی که در زمینه انجام تست اعتیاد روی ادرار افراد مراجعه کننده فعالیت داشت صورت گرفت. ۴۲ کیت تشخیص مورفین با توجه به نتایجی که از بهینه سازی ها به دست آمده بود ساخته شد. ۴۲ نمونه ادرار نیز که مثبت یا منفی بودن آن ها توسط کیت های تجاری مورد استفاده در آزمایشگاه تعیین شده بود از آزمایشگاه دریافت گردید. با اعمال این نمونه ها به کیت های بهینه سازی شده و مقایسه نتایج با بررسی های آزمایشگاه، حساسیت و اختصاصیت کیت ها با فرمول های مربوطه محاسبه شد.

یافته های پژوهش

مقدار pH ایزوالکتریک آنتی بادی موشی که pH بهینه کانژوگاسیون می باشد برابر ۸/۴ به دست آمد. در مرحله

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

تعیین صحت این نتیجه نیز با توجه به این که در طول موج ۵۲۰ nm مقدار جذب نانو ذره خام و نانو ذره ای که در pH اپتیمم با آنتی بادی موشی کانژوگه شده بود اختلاف قابل توجهی نداشت و این نتیجه برای طول موج ۵۸۰nm نیز صادق بود، می توان نتیجه گرفت که بر اثر کانژوگاسیون، ساختار نانو ذرات ثابت مانده و دچار تجمع و در اصطلاح aggregation که منجر به تغییر رنگ محلول از قرمز به بنفش می شود نشده است،(۱۱،۱۲)، این مشاهدات تأیید کرد که pH انتخاب شده جهت تهیه ماده کانژوگه بسیار مناسب است و این یکی از مهم ترین مراحل کار بود.

نتایج حاصل از مشاهدات صورت گرفته از تست نوارها با محلول مورفین نیز حاکی از آن بود که سطح تشخیص مجموعه کیت های با ماده کانژوگه با OD=۱، ۲۵ ng/ml، کیت های با OD=۲، ۵۰ ng/ml و کیت های با OD=۳ و OD=۴، ۵۰۰ ng/ml می باشد.(شکل شماره ۲) لذا OD=۱ به دلیل داشتن بهترین سطح تشخیص، مناسب ترین غلظت جهت ساخت ماده کانژوگه است. تست نوارهای با غلظت BSA- مورفین مختلف در باند تست نیز بیانگر آن بود که غلظت ۱ mg/ml از BSA- مورفین از بقیه مناسب تر است.(شکل شماره ۳)

پس از مقایسه کیت های بهینه شده با کیت استاندارد آزمایشگاه نیز نتیجه از این قرار بود که کیت های بهینه شده ۳۰ مورد از نمونه های ادرار منفی را به درستی منفی تشخیص دادند و نتیجه ۹ مورد از نمونه های مثبت نیز به درستی توسط آن ها مثبت تشخیص داده شد و تنها در سه مورد بین نتایج حاصل از کیت های بهینه شده و نتایج آزمایشگاه که به عنوان استاندارد فرض شده بود مغایرت وجود داشت.

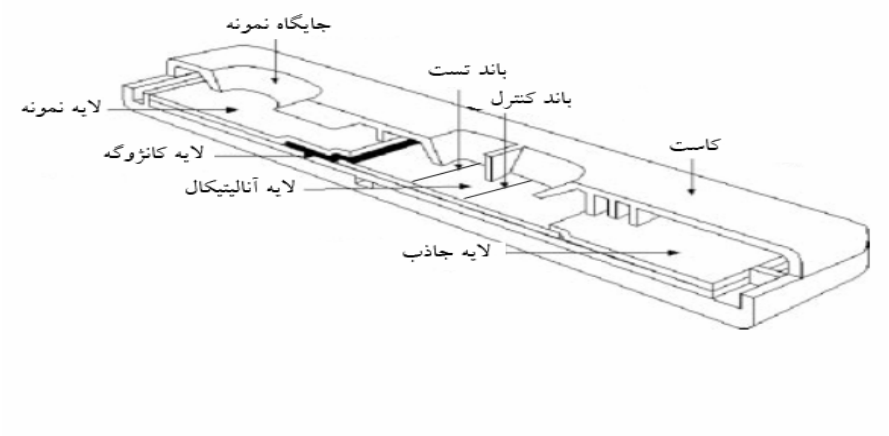
بدین ترتیب طبق روابط موجود جهت تعیین حساسیت و اختصاصیت که در جدول شماره ۱ آمده است، مقدار این دو شاخص به ترتیب برابر ۱۰۰ و ۹۹ درصد محاسبه گردید.

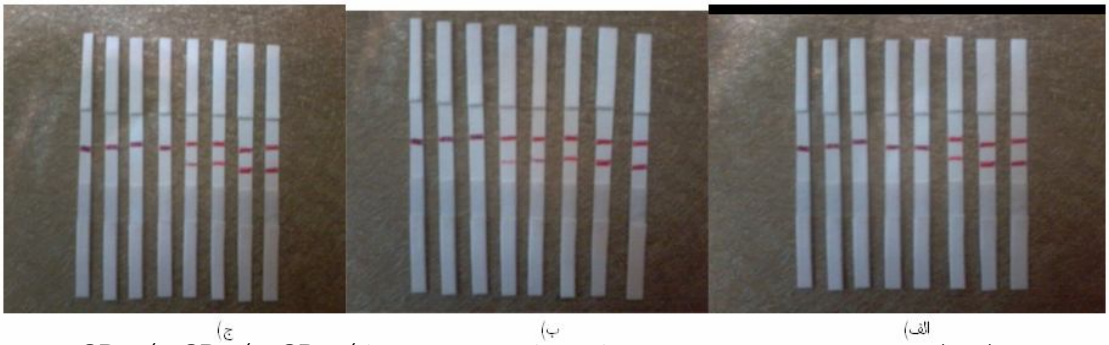
جدول شماره ۱. مقایسه نتایج حاصل از کیت های بهینه سازی شده با کیت استاندارد

	نتایج حاصل از کیت استاندارد		
	شرایط منفی	شرایط مثبت	
نتایج حاصل از کیت ها	(FP) مثبت کاذب ۳	(TP) مثبت صحیح ۹	نتایج مثبت
	(TN) منفی صحیح ۳۰	(FN) منفی کاذب ۰	نتایج منفی
	اختصاصیت = TN/TN+FP ۳۰/۳+۳۰=۰/۹۹×۱۰۰=٪۹۹	حساسیت = TP/TP+FN ۹/۹+۰=۱×۱۰۰=٪۱۰۰	

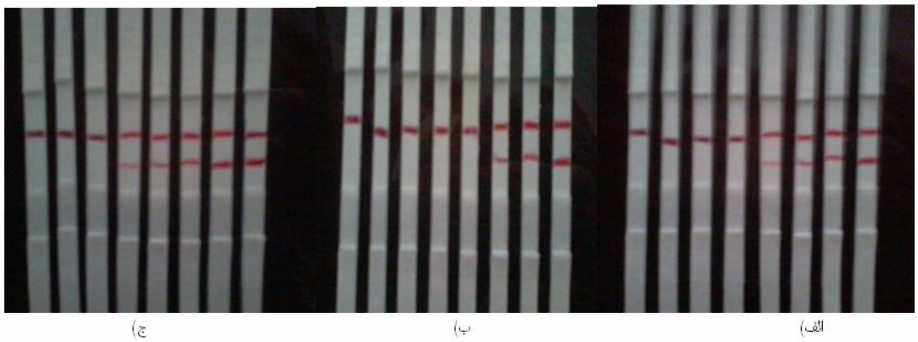
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

شکل شماره ۱. جایگاه لایه نمونه، لایه کانژوگه، لایه آنالیتیکال و لایه جاذب در یک سیستم LFA.(۱۶)





شکل شماره ۲. نتیجه حاصل از اعمال محلول مورفین سولفات به کیت های با الف) ۱=OD، ب)۳=OD، ج) ۲=OD



شکل شماره ۳. نتیجه حاصل از اعمال محلول مورفین سولفات به کیت های با ۱=OD و BSA-مورفین با غلظت های الف)۱ ب)۰/۵ و ج)۱/۵ mg/ml

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

بحث و نتیجه‌گیری

همان طور که گفته شد روش تشخیصی(LFA) با توجه به دارا بودن مزایای ویژه خودکارایی بسیاری در زمینه تشخیص سریع و دقیق معتادین دارد. اما هنوز هم در زمینه سطح تشخیص(cut off) این روش جای کار وجود دارد و نیاز است با بررسی و بهینه سازی فاکتورهای مؤثر بر سطح تشخیص آن، در جهت هر چه کامل تر شدن این روش تشخیصی گام برداشت.

از جمله فاکتورهای مؤثر بر سطح تشخیص این نوع سامانه ها، کیفیت بالا و عملکرد مناسب ماده کانژوگه می باشد. در این پژوهش یکی از اهداف ما پرداختن به همین مطلب بود.

ماهیت ماده کانژوگه چیزی جز نانو ذرات طلا که به عنوان معرف استفاده می شوند و آنتی بادی ای که بر سطح این نانو ذرات کانژوگه می شود نیست. البته معرف های دیگری نیز وجود دارند،(۱۳،۱۴)، اما نانو ذرات طلا به دلیل داشتن ویژگی هایی چون امکان تهیه آسان، پایداری قابل توجه حتی پس از گذشت مدت زمان طولانی از تولید آن، بازدهی بالا به هنگام کانژوگاسیون با پروتئین ها و... ترجیح داده می شوند.(۱۲،۱۵)

این که نانو ذرات طلا در چه pH ای به آنتی بادی ضد مورفین کانژوگه شوند اهمیت زیادی دارد. بهترین pH برای کانژوگاسیون، pH ایزوالکتریک آنتی بادی است. زیرا پایین تر از این نقطه آنتی بادی بار مثبت دارد و با نانو ذرات طلا که بار منفی دارند به شدت واکنش داده و لذا نانو ذرات دچار تجمع شدید می شوند. همین امر سبب می شود پس از ریختن ماده کانژوگه روی لایه پشم شیشه ای، ماده کانژوگه به خوبی روی لایه حرکت نمی کند و رنگ حاصل از آن بر روی نوار بسیار تیره می شود. بالاتر از نقطه pI آنتی بادی، پروتئین بار منفی دارد و نانو ذرات را دفع می کند. لذا کانژوگاسیون به خوبی صورت نمی گیرد،(۸). بدین ترتیب بخشی از بررسی های ما به یافتن pI آنتی بادی اختصاص پیدا کرد و pH بهینه به دست آمد. علاوه بر این، OD ماده کانژوگه نیز بر چگونگی عملکرد آن اثرگذار است. به طوری که اگر بیش از حد نیاز باشد ضمن این که در بهبود سطح cut off سامانه هیچ تأثیری ندارد منجر به پدیده ای مشابه prozone که در روش های آگلوتیناسیون رخ می دهد می گردد. یعنی در حالی که نمونه اعمال شده به سامانه مثبت است به دلیل بیشتر بودن تعداد آنتی بادی های موجود در ماده کانژوگه نسبت به آنتی ژن های تثبیت شده در باند تست، پاسخ به صورت منفی کاذب رؤیت می شود.

تنظیم غلظت BSA- مورفین در یک مقدار بهینه نیز موضوع سوم بهینه سازی کار بود. در صورتی که غلظت BSA- مورفین تثبیت شده از حد لازم بیشتر باشد پدیده ای مشابه postzone رخ می دهد که این بار به علت زیاد بودن تعداد آنتی ژن ها پاسخ منفی کاذب ایجاد می شود.(۱۶)

عمده تحقیقاتی که در زمینه بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر سطح تشخیص سامانه LFA انجام شد توسط Se-Hwan Paek و همکاران جهت تشخیص باکتری سالمونلا بود که بهینه سازی pH کانژوگاسیون، مقدار آنتی بادی لازم جهت تهیه ماده کانژوگه، نوع بافری که در قسمت های مختلف کار مورد استفاده قرار می گیرد و ضخامت لایه آنالیز از جمله فاکتورهایی بود که مورد بررسی آن ها قرار گرفت،(۸). Lyubavina و همکاران مشابه این بهینه سازی ها را اما با وسعت کمتر و فقط با بررسی تأثیر OD ماده کانژوگه و غلظت BSA- مورفین در باند تست، درباره سامانه تشخیص مورفین انجام دادند،(۴). اما مزیت پژوهش حاضر در آن است که، ضمن آن که در انجام بهینه سازی ها روش هایی ابتکاری را به کار بسته است، در عین حال مجموعه مطالعات قبلی را به هم پیوند داده و ارتباطی منطقی میان نتایج حاصل از آن ها برقرار نموده است، ضمناً به بررسی فاکتورهایی پرداخته که پیش از این مورد توجه نبوده اند. مانند تأثیر افزودن قندهای سوکروز و تری هالوز به ماده کانژوگه که ضمن داشتن اثر محافظت کنندگی از کارایی و فعالیت آنتی بادی کانژوگه شده و افزایش مدت زمان قابل استفاده بودن کیت، در رهاسازی کامل و سریع ماده کانژوگه از لایه پشم شیشه ای نیز مؤثر هستند یا تأثیر بلاک نمودن لایه کانژوگه قبل از اعمال ماده کانژوگه به آن که بر کیفیت رهاسازی ماده کانژوگه اثرگذار است.

جهت تثبیت آنتی ژن و آنتی بادی پلی کلونال در باندهای تست و کنترل نیز شیوه ای ساده و ابتکاری به کار بسته شده است. چرا که برای ایجاد این باندها نیاز به دستگاه های خاصی است که قادرند ماده مورد نظر را به صورت یک باند بسیار ظریف روی سطح بپاشند. اما به علت عدم دسترسی به این دستگاه ها، طی یک روش ابداعی از یک مهر ژلاتینی برای قرار دادن BSA- مورفین و آنتی مورفین آنتی بادی روی سطح کاغذ نیتروسلولزی استفاده شد. هر چند بازدهی کار در مقایسه با عملکرد دستگاه های

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

خودکار کمتر می باشد اما برای ساخت کیت ها در مقیاس آزمایشگاهی روش نتیجه بخشی است. در نهایت انجام بهینه سازی های فوق، سطح تشخیص کیت تشخیص مورفین را تا حد زیادی ارتقاء داد به گونه ای که مقدار آن به حدود ۲۵ ng/ml رسید.

انجام یک بررسی میدانی و تعیین حساسیت و اختصاصیت کیت های ساخته شده در شرایط بهینه از طریق مقایسه نتایج با یک کیت استاندارد نیز بخش پایانی کار بود. نتیجه این بررسی ها حساسیت کیت ها را ۱۰۰ و اختصاصیت آن را برابر ۹۹ درصد گزارش نمود. به این ترتیب نتیجه بخش بودن بهینه سازی های صورت گرفته در مراحل مختلف کار به اثبات رسید و این دستاورد قابل توجهی در زمینه ارتقاء عملکرد تست تشخیص سریع مورفین بر مبنای روش LFA بود.

با این حال هنوز هم ارتقاء سطح تشخیص سامانه LFA جهت استفاده در زمینه های مختلف جای بررسی دارد و امید است با هر چه کامل تر شدن این روش و برطرف شدن محدودیت های آن، امکان بهره گیری از این روش سودمند در تشخیص ترکیبات مختلف بیش از پیش فراهم آید.

References

1.Kilpatrick GJ, Smith TW. Morphine-6-glucuronide: Actions and mechanisms. Med Res Rev 2005;25:521-44.

2.Janssen PA. A review of the chemical features associated with strong morphine-like activity. Brit J Anaesthes 1962;34: 260-8.

3.Nig S. Detection and serogroup differenttiation of Salmonella spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol 1996;62:2294-302.

4.Lyubavina I. An express morphine assay in aqueous samples by immunochromatography using monoclonal antibodies labeled with colloidal gold. Russ J Bioorg Chem 2005;31: 99-103.

5.Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. Analyt Bioanalyt Chem 2009;393: 569-82.

6.Laitinen M, Sojakka KM, Vuento M. Thin-layer affinity chromatography in analysis of protein–ligand affinity. Analyt Biochem 1996;243: 279-82.

7.Chen R. An internal clock reaction used in a one-step enzyme immunochromatographic assay of theophylline in whole blood. Clin Chem 1987;33: 1521-5.

8.Paek SH. Performance control strategies of one-step immuno-chromatographic assay system for Salmonella typhimurium. Hayan Publication; 1999.

9.O'Keeffe M, Laitinen M, Sojakka KM, Vuento M. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. J Immunol Method 2003;278: 117-26.

10.van Amerongen A. Quantitative computer image analysis of a human chorionic gonadotropin colloidal carbon dipstick assay. Clinica Chimica Acta 1994;229: 67-75.

11.Baudhuin P. Molecular interactions between colloidal gold, proteins, and living cells. Coll Gold 1989; 1:2-8.

12.Roth J. The silver anniversary of gold: 25 years of the colloidal gold marker system for immunocytochemistry and histochemistry. Histochem Cell Biol 1996;106: 1-8.

13.Gussenhoven GC. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. J Clin Microbiol 1997;35: 92-7.

14.Van Amerongen A. Colloidal carbon particles as a new label for rapid immunochemical test methods: quantitative computer image analysis of results. J Biotechnol 1993; 30:185-95.

15.Albrecht RM, Simmons S, Pawley J. Correlative video-enhanced light microscopy, high voltage transmission electron microscopy, and field emission scanning electron microscopy for the localization of colloidal gold labels. Oxford University Press: New York; 1993.P.151.

16.Butch AW. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon. Clin Chem 2000;46:1719-20.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

Optimization of Effective Parameters on Cut-off of Rapid Detection System of Morphine Based on Lateral Flow Assay (LFA) Method

*Shamloo Ahmadi H[1], Heiat M[2], Rashedi H[1], Olad G[2], Latifi A[2]**

(Resived: June 13, 2013 Accepted: December 18, 2013)

Abstract

Introduction: Lateral flow assay method is a test for rapid detection of morphine that has many applications in identification of addicts. However, detection level of the system has limited its application. This research examined how to improve the detection level and sensitivity of this system.

Materials & Method: pH of conjugation, OD of conjugated material and concentration of morphine-BSA in the test band were effective on the detection level of this system. To determine optimum pH, a commercial kit (Gold in a box) was used. By applying various concentrations of morphine solution, and considering a constant concentration of morphine-BSA, the optimal OD was set. Then, the optimal concentration of morphine-BSA was obtained for a fixed amount of OD. Effect of blocking the conjugated pad and addition of sugar to the conjugated substance were also studied.

Findings: Optimum values of pH and OD was pH=8.4 and OD=1. Optimum concentration of morphine-BSA in the test band was obtained to be 0.5 mg/ml. Cut-off value of optimized kit attained to 25 ng/ml. After comparing the results with a standard kit, sensitivity and specificity of the optimized kits were 100 ٪ and 99 ٪, respectively.

Discussion & Conclusion: Finding and optimizing the effective factors on the performance of diagnostic lateral flow method can be an effective strategy to increase the sensitivity and reduce the detection level of this system.

Keywords: Morphine detection, OD Of conjugated material, pH of conjugation, LFA system, optimization

1. Dept of Chemical Engineering, Technical Faculty Campus, Tehran University, Tehran, Iran
2. Applied Biotechnology Research Center, Baqiatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Faculty of Health, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]