

SİĞİRLARIN SERUM FERRİTİN SEVİYESİNİ TAYİN ETMEK İÇİN FERRİTİN RADIOİMMUNOASSAY (RIA) YÖNTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ¹.

Nurcan Çetinkaya²

The development of Ferritin radioimmunoassay (RIA) Method for the determination of the levels of bovine serum ferritin.

Summary: Ferritin was isolated and purified from bovine spleen and used in the development of bovine serum ferritin radioimmunoassay (RIA) method. During the isolation and purification of ferritin, purity control was shown with iron: protein ratios and 6 % polyacrylamide disc gel electrophoresis (PAGE). The iron: protein ratio of bovine spleen ferritin after the Sephadex G-200 column chromatography was found to be 0,153. Protein staining of 6 % PAGE gels of ferritin showed six, four and three bands after $(NH_4)_2SO_4$, saturation and dialyzing, Sepharose 6B-100 and Sephadex G-200 column chromatography respectively: However, three bands were observed with iron staining for all of steps on PAGE. The iodination efficiencies of ferritin by direct and indirect iodination methods were calculated to be 17 % and 8 % respectively. Bovine antiferritin antibodies were raised in rabbits showed 40 % binding of a serum dilution 1:10.000 in a titre determination using double antibody assay procedure. RIA standard curve was constructed for measuring bovine serum ferritin levels between 2-400 ng / ml. In order to validate and to show reliability of the developed ferritin RIA method, sensitivity, specificity, accuracy, precision and reproducibility of the method were investigated. The mean normal serum ferritin level of ten bulls was $40 \pm 2,4$ ng / ml by the new developed bovine serum ferritin RIA method.

Özet: Ferritin, sığır dalağında izole edildi, saflaştırıldı ve sığırların serum ferritin seviyesini tayin etmek için radioimmunoassay (RIA) yönteminin geliştirilmesinde kullanıldı. Ferritin izolasyonu ve

¹ Nurcan Çetinkaya'nın Doktora tezinden hazırlanmıştır ve bu araştırma TAEK tarafından desteklenmiştir.

² Dr., TAEK Lalahan Hayvan Sağlığı Nükleer Araştırma Enstitüsü, Ankara.

saflandırılması sırasında saflık kontrolü demir: protein oranları ve % 6'lık poliakrilamid disk gel elektroforez (PAGE) ile gösterildi. Sephadex G-200 kolon kromatografisinden sonra-sığır dalağı ferritininin demir: protein oranının 0,153 olduğu bulundu. Ferritinin % 6'lık PAGE gellerinin protein boyaması $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturasyonu ve dializden, Sepharose 6B-100 ve Sephadex G-200 kolon kromatografilerinden sonra sırasıyla altı, dört ve üç bant gösterdi. Oysa, PAGE'de bütün basamakların demir boyaması ile üç bant gözlemlendi. Ferritinin direk ve indirek iyotlama yöntemleri ile iyotlanma verimlerinin sırasıyla % 17 ve % 8 olduğu hesaplandı. Tavşanlarda üretilen sığır antiferritin antikoru, çift antikorlu titre tayini yönteminde 1:10.000 antiserüm seyreltmesi ile % 40 bağlanma gösterdi. RIA standart eğrisi 2-400 ng/ml arası sığır serum ferritin seviyelerini ölçmek için çizildi. Geliştirilen ferritin RIA yönteminin geçerli kılmak ve güvenilirliğini göstermek için yöntemin duyarlılığı, özgüllüğü, doğruluğu, presiyonu ve tekrarlanabilirliği incelendi. Yeni geliştirilen sığır serum ferritini RIA yöntemi ile on boğa serumunda normal serum ferritin seviyesi $40 \pm 2,4$ ng/ml olarak tayin edildi.

Giriş

Sığırların demir durumunu anlamada kullanılan alışılmış ve duyarlı olmayan ölçümler olan demir parametreleri (hemoglobin, hematokrit ve kırmızı kan hücreleri sayımları gibi) demir eksikliğini ortaya çıkarmada etkin değildir. Ancak anemi oluşuktan sonra bu ölçümler kesin sonuç vermektedir. Kemik iliği biyopsisi aneminin teşhisinde iyi bir kriter olmakla birlikte travmatiktir ve pratik değildir (2). İnsanlarda demir eksikliği anemisinin ilk safhalarda kolay ve kesin teşhisi, 1972'de Addison ve arkadaşlarının (1) serum ferritin seviyesini ölçmek için radioimmunoassay (RIA) yöntemini geliştirmeleri ile mümkün olmuştur. Ferritin, yüksek molekül ağırlıklı (460.000 dalton) olan demir depo proteinidir. Ferritin başlıca retiküloendotelial ve karaciğer hücrelerinin sitoplazmasında, kemik iliği ve dalakta bulunur. Zengin demir içeren ferritinin başlıca görevi demir depolamak ve gerek duyulduğunda organizmanın demir ihtiyacını karşılamaktır (13). Serum demiri ve toplam demir bağlama kapasitesi (TIBC) tayinleri demir eksikliği anemisinin kesin teşhisinde yararlı olabilmekte ancak demir depolarının tamamen tüketildiği durumlarda duyarlı ve doğru sonuçlar vermektedirler (8, 18).

İnsan hekimliğinde serum ferritin seviyelerini tayin etmek için RIA, immunoradiometric assay (IRMA) ve enzyme immunoassay (EIA) yöntemleri geliştirilmiş ve ng/ml çok küçük derişimlerin doğru ve hassas tayinlerinin yapılması sağlanmıştır (11, 19, 20, 21). Serum ferritin düzeyi ile vücut depo demiri miktarı arasında iyi bir korelasyon olduğu bulunmuş ve 1 ng/ml serum ferritininin 8 mg depo demirine karşılık geldiği belirtilmiştir (16). Serum ferritin seviyesini tayin etmek çok duyarlı olan RIA, IRMA ve EIA gibi yöntemlerin geliştirilmesi ile insanlarda demir metobolizması araştırmalarında büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (22). Ancak insan hekimliğinde kullanılmak amacıyla üretilen RIA, IRMA ve EIA kitleri sığırların serum ferritin seviyelerini tayin etmek için kullanılamamaktadır (14). Bu nedenle, sığırlarda serum ferritin seviyelerini tayin etmek amacıyla ferritin-RIA yöntemi geliştirildi ve yöntemin geçerliliği gösterildi.

Geliştirilen ferritin-RIA metodu sığırlarda, demir eksikliği anemisinin erken teşhisinde, depo demir miktarını hesaplamada, rasyona demir eklemesinin gerekli olup olmadığına karar vermede, demir durumları ile hastalıklar (kronik enfeksiyon, kronik inflamasyon ve malignansi vs.) arasındaki ilişkileri belirlemede ve demir metobolizması ile ilgili araştırmalarda kullanılabilir.

Materyal ve Metot

Linder ve Munro'nun (17), Çetinkaya ve arkadaşlarının (14) metodlarından yararlanılarak ferritin sığır dalağından ayrıldı ve saflandırıldı. Ferritin ¹²⁵I ile işaretlenmesinde direk (12, 10) ve indirek iyotlama (3, 15) yöntemleri kullanıldı. 1 ml (1 mg/ml) saf olarak elde edilen ferritin çözeltisi 1 ml Freund's Complete Adjuvant ile beyaz viskoz emülsiyon oluncaya kadar iyice karıştırıldı ve iki tavşanın sırt bölgesine deri içine en az 10 farklı yere enjekte edildi. İkinci enjeksiyon başlangıç immünizasyondan üç hafta sonra her bir tavşana 0,2 mg/ml ferritin yine aynı şekilde hazırlanarak enjekte edildi. İkinci enjeksiyondan bir hafta sonra kulak venasından kan alınarak serumlarında antikor titrasyon testleri yapıldı. Ferritin enjeksiyonları ve kan alma işlemlerine uygun titrede antikor üretilinceye kadar devam edildi.

Antikor Titrasyon Testi: Test tüpleri (13 x 100 cm) sırasıyla aktivite, özgül olmayan bağlanma (normal tavşan serumu) ve 1:400,

1:800, 1:600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600 ve 1:51200 antiserum derişimlerini koymak için numaralandı. Antikor titrasyon testi 3 günde tamamlandı. Birinci gün iki test tüpüne % 0,9 NaCl içeren 0,01 M, pH 7 fosfat tamponu- 0,5 M EDTA (PBS-EDTA) ile yukarıda verilen derişimlerde seyreltilmiş antiserumlardan sırasıyla her birinden 200 μ l, ayrı ayrı tüplere kondu. Toplam aktivite tüpleri hariç diğerlerine 500 μ l % 0,1 gelatin ve % 0,9 NaCl içeren 0,01 M pH7 fosfat tamponundan (PBS-gel) eklendi. Daha sonra tüplerin herbirine 100 μ l PBS-gel içinde 30.000 cpm aktivite olacak şekilde hazırlanmış 125 I işaretli ferritin çözeltisi eklendi ve + 4°C'da bir gün inkübe edildi. İkinci gün, toplam aktivite tüpleri hariç diğerlerine 1:30 (v / v) oranında seyreltilmiş ikincil antikor (anti-tavşan gama globulün) çözeltisinden 200 μ l eklenip karıştırıldı ve + 4°C'da bir gün inkübe edildi. Üçüncü gün toplam aktivite tüpleri hariç diğerlerine 3 ml PBS eklendi karıştırılmadan 1500 g'de 30 dakika santrifüj (Beckmann, TJ-6) edildi. Süpernatant döküldü ve oluşan immün çökelekteki 125 I'in aktivitesi gama sayacında (Packard, 5110) sayıldı. Yüzde bağlanmalar (% B) hesaplandı ve % B'ler antiserum derişimlerine karşı grafik çizildi. Optimum bağlama bölgesindeki (% 25-% 45 arası) antikor derişimleri RIA standart eğrisinin çizilmesinde kullanıldı.

RIA Standart Eğrisinin Çizilmesi: Antikor titrasyon testinde % 25 bağlanma veren 1:5000 antikor titresi ile % 45 bağlanma veren 1:12800 antikor titreleri RIA standart eğrisinin çizilmesinde kullanıldı. Ferritin standartları 2, 5, 10, 20, 50, 150, ve 400 ng/ml olarak PBS-EDTA içinde hazırlandı. Normal sağlıklı sığırlardan (20 baş) alınan kanların serumları ayrılarak birleştirildi ve iki kısma ayrıldı (Serum I ve Serum II olarak numaralandı). Herbir standart eğri çizilmesi deneyinde kontrol serumları olarak kullanıldı.

Toplam aktivite, normal tavşan serumu, tampon kontrol, standart, serum I ve serum II tüpleri numaralandı. 1: 400 (V / V) oranında PBS-EDTA ile seyreltilmiş normal tavşan serumu tüplerine 700 μ l ve tampon kontrol tüplerine 700 μ l PBS kondu. Standart tüplerine herbir standarttan 200 μ l kondu. 1:500 (V / V) oranında PBS-EDTA ile seyreltilmiş antiserumdan toplam aktivite ve normal tavşan serumu tüpleri hariç diğerlerine 100 μ l aktivite (30000 cpm / 100 μ l) kondu, tüpler iyice karıştırılarak + 4°C'da bir gün inkübe edildi. İkinci ve üçüncü gün yapılan işlemler antikor titrasyon testinde olduğu gibi yapıldı. Sayım sonuçlarından hesaplanan % B'lar ferritin

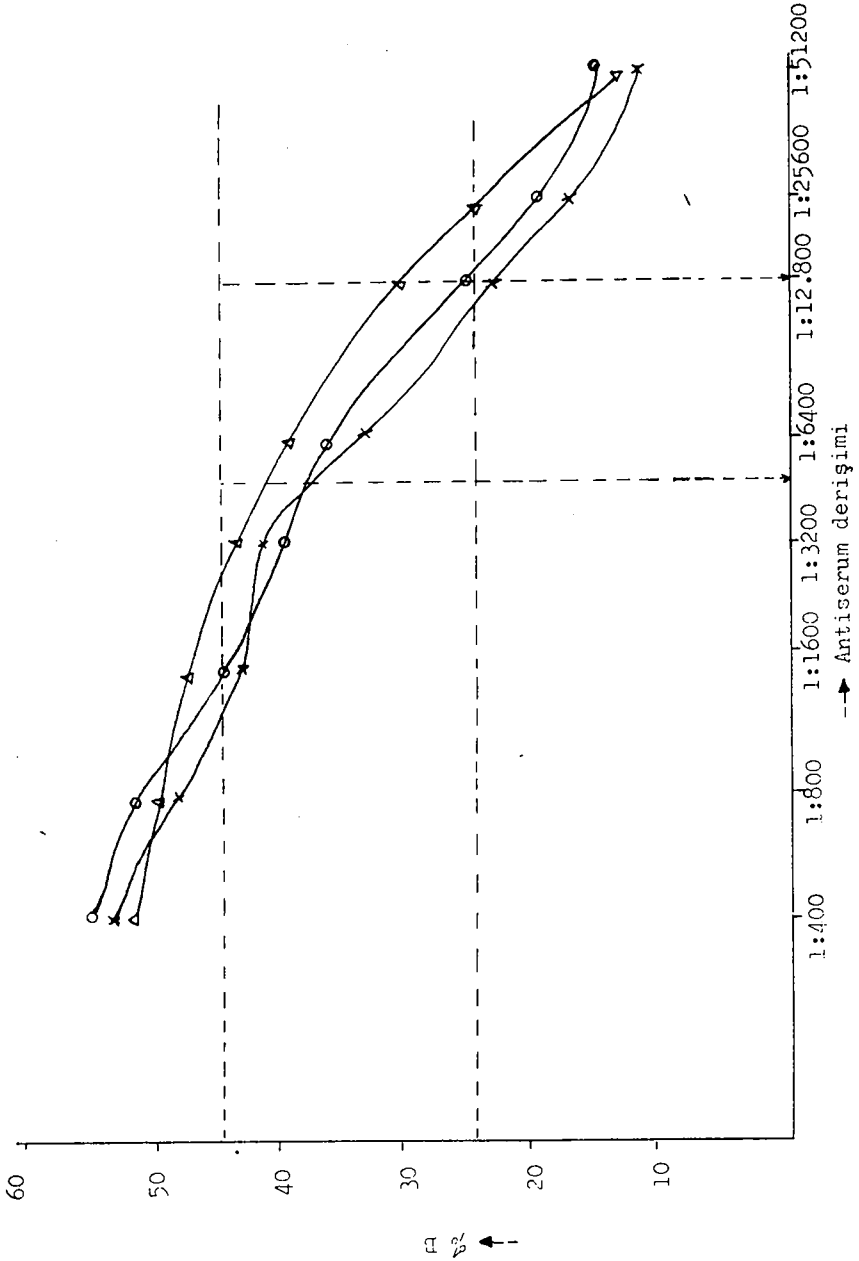
standartlarına karşı yarı grafik kağıdına geçirildi ve serum I ve serum II'nin % B'larına karşılık gelen ferritin seviyeleri ng / ml ferritin olarak grafikten okundu.

RIA yönteminin güvenilirlik deneyleri; duyarlılık, özgüllük, doğruluk, presisyon ve tekrarlanabilirlik testleri ile yapıldı.

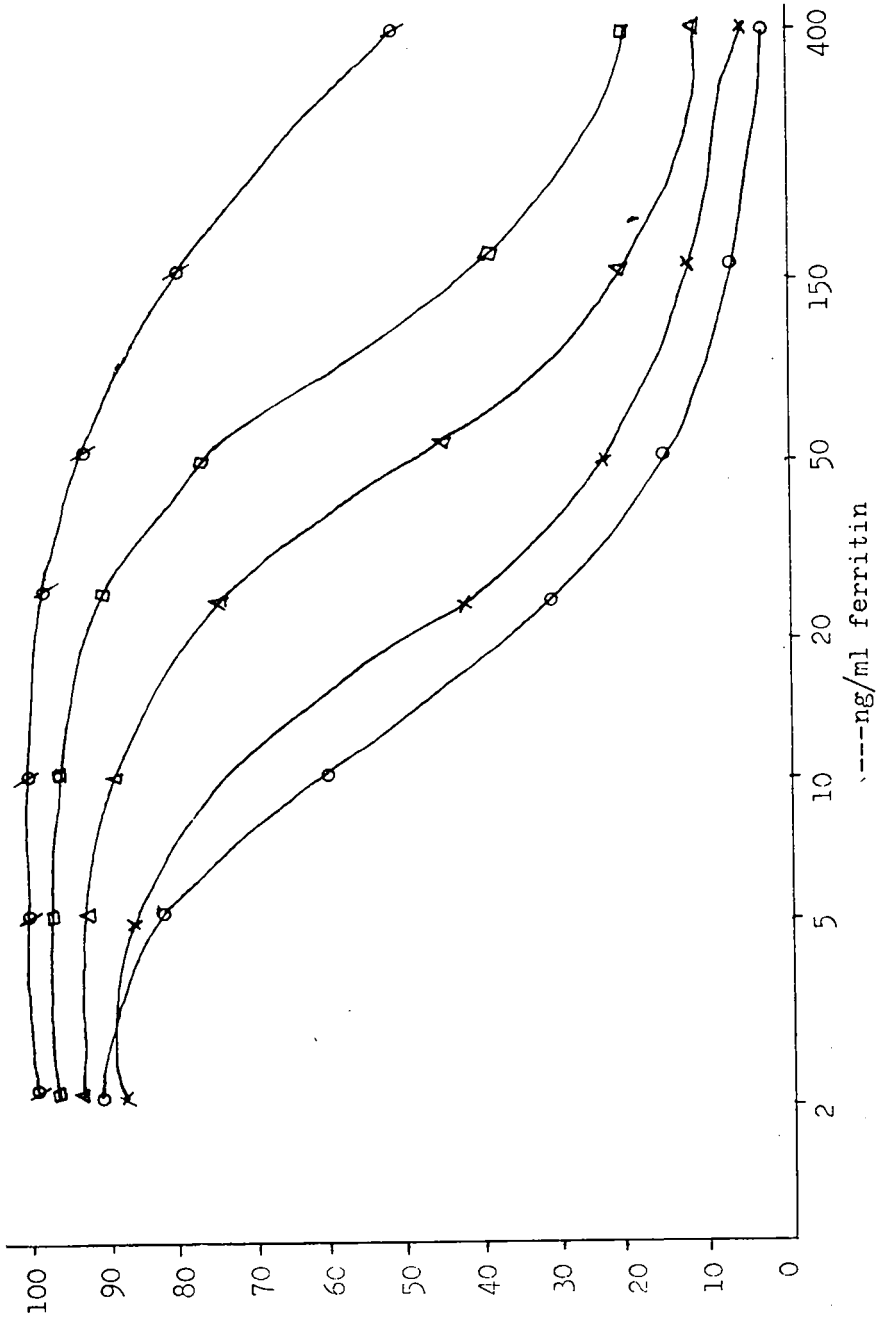
Bulgular

Ferritinin izolasyonu suda çözünürlüğünden, ısıya dayanıklılığından (60–70°) ve % 75'lik $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ile özgül çökmesinden yararlanılarak yapıldı. Isıtmanın ferritin moleküllerine etkisinin incelenmesinde ferritin moleküllerindeki değişmeler 80°C'den sonra geriye döndürülebilir (irreversible) olmadı. Çözünmez granüller meydana geldi. Amonyum sülfat saturasyonundan sonra ferritin Sepharose 6B–100 ve Sephadex G–200 kolonlarından geçirilmesinden sonra saf ferritin elde edildi. Saflık kontrolü % 6'lık poliakrilamid gel elektroforez (PAGE), ile yapıldı. % 6'lık PAGE gellerinde protein boyaması ile $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ve diyaliz basamağından sonraki, Sepharose 6B–100 ve Sephadex G–200 kolon kromatografileri ferritin fraksiyonları örneklerinde sırasıyla altı, dört ve üç bant gözlemlendi. Diğer taraftan aynı basamaklardan alınan örneklerin PAGE gellerinin demir boyamasında bütün örnekler için üç bant gözlemlendi. Ferritinin saflığı ayrıca izolasyon sırasında çeşitli basamaklardan alınan örneklerde demir ve protein tayinleri yapıp demir, protein oranları ve % Femiktarları hesaplanarak kontrol edildi. Amonyum sülfat saturasyonuna takiben yapılan diyalizden sonraki, Sepharose 6B–100 ve Sephadex G–200 kolon kromatografileri ferritin fraksiyonlarından alınan örneklerde demir: protein ve % Fe miktarları sırasıyla $0,025 \pm 0,007$, % 2,6; $0,067 \pm 0,005$, % 6,8 ve $0,153$, % 15,3 hesaplandı. Saf olarak elde edilen sığır dalağı ferritinini direk iyotlanması ile % 17, indirek iyotlanması ile % 8 bağlanma verimleri hesaplandı. Antikor üretiminde başlangıç immünizasyonundan ikinci, üçüncü ve dördüncü aylar sonunda tavşanlardan alınan serumlarda yapılan antikor titrasyon testi sonuçlarını gösteren eğriler Şekil 1'de gösterildi. Bağlanmanın % 25–45 bulunduğu 1:5000– 1:12800 arasındaki antikor titreleri RIA standart eğrisinin çizilmesinde kullanıldı.

Ferritin–RIA standart eğrileri 1: 4000, 1:5000, 1:6400, 1:10.000 ve 1:12.800 antikor titreslerinde 2, 5, 10, 20, 50, 150 ve 400 ng / ml



Şekil 1. Antiserum derişimine karşı % B'ların yarı logaritmik grafik kağıdına geçirilme-
siyle elde edilen antikor titrasyon eğrileri. (x-x) 2. ay, (0|0) 3. ay, (v-v) 4. ayda tavşanlardan
alınan serumlar.



Şekil 2. Sığır ferritin antiserumunun 1: 4000 (∅ / ∅), 1: 5000 (□ - □), 1: 6400 (V - V), 1: 12800 (X - X) ve 1: 10000 (0 - 0) antikor derişimleri için sığır dalağı ferritini standartları (2-400 ng / ml) ile çizilen standart eğrileri.

ferritin standartlarına karşı % B'lar yarı-logaritmik grafik kağıdına çizildi (Şekil 2). Çizilen eğrilerin duyarlılıkları 1:4000 titrede 50 ng / ml, 1:5000 titrede 20 ng / ml, 1:6400 titrede 10 ng / ml, 1:12.800 titrede 5 ng / ml, ve 1:10.000 titrede 2ng / ml bulundu. Sığır dalağı ferritinine karşı üretilen antikorun sığır ferritinine karşı immünolojik olarak özgül olduğu at ve insan dalağı ferritinleri ile çapraz reaksiyon vermemeleri ile gösterildi. RIA yönteminin doğruluğu nicel verim deneyleri ile incelendi. % Nicel verim % 95-104 arası ortalama % 100,7 hesaplandı. Yöntemin tekrarlanabilirliği deneyler arası ve deney içi sapmalar hesaplanarak belirlendi. Deney içi sapmalar (% CV = 1,0) deneyler arası sapmalardan (% CV = 6,2) daha küçük elde edildi.

Sığır serum ferritinini tayin etmek için geliştirilen RIA yöntemi ile 10 boğa serumunda ortalama $40 \pm 2,5$ ng / ml ferritin seviyeleri tayin edildi.

Tartışma ve Sonuç

Ferritinin izolasyonu sırasında sıcaklığın sığır dalağı ferritin moleküllerine etkisinin incelenmesi sonunda ısıtma basamağında 70°C'in üzerine çıkışmamasına dikkat edilmesi gerekli olduğu görüldü. Çünkü 70°C'in üzerinde ferritin molekülleri denatüre olmaktadır. Granic (9) sıcaklığın at dalağı ferritini üzerine etkisini incelemiş ve sığır dalağı ferritin moleküllerinin sıcaklıkla değişimine benzer sonuçlar vermiştir.

İzolasyon sırasında saflık kontrolü % 6'lık PAGE ile yapıldı ve saf ferritin hem demir hemde protein boyamasında monomer, dimer ve trimerleri gösteren üç band oluşturduğu gözlemlendi. Çetinkaya ve arkadaşları (4) saf sığır dalağı ferritin % 6'lık PAGE gellerinde hem protein hemde demir için boyanan üç bant gösterdiklerini bildirmişlerdir.

Ferritinin saflığı ayrıca demir: protein oranı veya % Fe miktarı hesaplanarak da gösterildi. Ferritinin saflık derecesi arttıkça demir: protein oranı dolayısıyla % Fe miktarı artmaktadır. Amonyum sülfat saturasyonunu takiben yapılan diyalizden sonra elde edilen ferritin % Fe miktarı % 2,6 iken son saflandırma basamağı olan Sephadex G-200 kolon kromatografisi ferritin fraksiyonunda % 15,3 bulundu. Daha önce benzer izolasyon yöntemi ile koyun dalağı ferritini için % 21 (6) ve sığır dalağı ferritini için % 16 (4) değerleri bildirilmiştir ki bizim bulduğumuz sonuca yakındır.

Saf olarak elde edilen sığır dalağı ferritinin direk iyotlanması ile % 17, indirek iyotlanması ile % 8 bağlanma verimleri hesaplandı. Direk iyotlama (kloramin-T) yöntemi, uygulanması kolay, ucuz ve yüksek verimli olması nedeniyle indirek iyotlama (Bolton-Huntei) yöntemine (3) tercih edildi. Başlangıç immünizasyondan ikinci, üçüncü ve dördüncü aylar sonunda alınan serumlarda yapılan antikor titrasyon testi sonuçlarının gösterildiği Şekil 1'in incelenmesinden de görüleceği gibi ikinci, üçüncü ve dördüncü aylar sonundaki serumların antikor titreleri arasında belirgin bir farklılık yoktur. Bağlanmanın % 25-45 bulunduğu 1:5000-1:12.800 arasındaki antikor titrelerinin RIA standart eğrisinin çizilmesinde kullanılmasının nedeni Reimers (23) tarafından açıklanmıştır, bu aralıkta optimum duyarlılık ve presisyon sağlanmaktadır. Çizilen RIA eğrilerinin 1:4000, 1:5000, 1:6400, 1:10.000 ve 1:12.800 antikor titrelerinde duyarlılıkları sırasıyla 50, 20, 10, 5 ve 2 ng/ml ferritin bulundu (Şekil 2). Duyarlılığı en iyi olan eğri 1:10.000 antikor titresi ile çizilen eğridir. İnsan serum ferritinini tayin etmek için geliştirilen RIA yönteminin duyarlılığı 2,4 ng/ml olarak verilmiştir (19, 21). Bizim çizdiğimiz RIA standart eğrisinin duyarlılığı sığırlarda demir eksikliğinin erken safhada teşhisi için uygundur. Son zamanlarda süt ineklerinde serum ferritin seviyesini tayin etmek için IRMA geliştirilmiş fakat yöntemin güvenilirlik testleri ile ilgili bilgiler verilmemiştir (7). Sığır dalağı ferritinine karşı üretilen antikor at ve insan dalağı ferritinleri ile çapraz reaksiyon vermediğinden immünolojik olarak türe özgüdür.

Geliştirilen RIA yöntemi ile \pm % 5 doğrulukta tayin yapılması mümkündür. Yüzde nicel verim % 95-104 arası ortalama % 100,7 hesaplandı. İnsan serum ferritinini tayin etmek için geliştirilen RIA'nın % nicel verimi % 95-118 arası ortalama % 102 verilmiştir (24). Tekrarlanabilirliği gösteren deney içi sapmalar (% CV = 1,0) deneyler arası sapmalardan (% CV = 6,2) daha küçük bulundu. Geliştirilen yöntemin presisyonunu gösteren sapmalar insan ferritini RIA yöntemi için verilen değere (23) yakın bulundu.

Demir eksikliği durumunda serum ferritini ortalama 4-8 ng/ml olarak belirtilmiştir (1, 5). Serum ferritin seviyesini $40 \pm 2,4$ ng/ml olarak tayin ettiğimiz 10 boğada bu durumda demir eksikliği yoktur. Sonuç olarak sığır serum ferritinini tayin etmek için geliştirdiğimiz RIA yöntemiyle sığırlarda demir eksikliğinin erken safhada teşhisi mümkün olacaktır. Diğer taraftan sığırlarda demir metabolizmasını incelemeyle ilgili araştırmalarda kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Addison, G.M., Beamish, M.R., Hales, C.N., Hodgkins, M.R., Jacobs, A., and Lievelen, P. (1972). *An immunoradiometric assay for serum ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload.* J. Clin. Pathol. 25, 326-329.
2. Bezkorovaing, A. (1980) *Biochemistry of Non Heme Iron plenum Press, N.Y.*, pp 207,
3. Bolton, A.E., and Hunter, W.M. (1973). *The labellings of proteins to high specific activities by conjugation to a 125 I-containing acylating agent.* Biochem. J., 133, 529-539.
4. Çetinkaya, N. Lengemann, F.W., and Kogan, P. (1958). *Isolation, purification and characterization of bovine spleen ferritin.* Comp. Biochem. and Physiol. 80B, 773-778.
5. Dempster, W.S., Steyn, D.L., Knight, G.J., Heese, and Der, H. (1974). *Immunoradiometric assay of serum ferritin as a practical method for evaluating iron stores in infants and children.* Med. Lab. Sci. 34, 337-344.
6. Farah, M.O., Legemann, F.W., Kogan, P. and Çetinkaya, N. (1984). *Isolation of sheep spleen ferritin.* 37, 1-6.
7. Furugouri, K., Miyata, Y., and Shiyimaya, K., (1932). *Ferritin in blood serum of dairy cows.* J. Dairy Sci. 65, 1529-1534.
8. Goldie, D.J., and Thomas, M.M. (1978). *Measurement of serum ferritin by radioimmunoassay.* Ann. Clin. Biochem. 15, 102-108.
9. Granick, S. (1942). *Physical and chemical properties of horse spleen ferritin.* J. of Biol. Chem. 146, 451-461.
10. Greenwood, F.C., Hunter, W.M. and Glover, J.S. (1963). *The preparation of 131 I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity.* Biochem. J. 89, 114-123.
11. Halliday, J.W., Gera, K.L., Powell, L.W. (1975). *Solid phase radioimmunoassay for serum ferritin.* Clin. Chim. Acta, 58, 207-210.
12. Hunter, W.M. and Greenwood, F.C. (1962). *Preparation of Iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.* Nature, 194, 495-496.
13. Jacobs, A., and Worwood, M. (1975). *Ferritin in serum. Clinical and Biochemical implications* N. Engl. J. Med. 292, 951-953.
14. Legemann, F.W., Lopera, J.A., Kalfelz, F.A., and Lengemann, Jr. F.W. (1982). *Ferritin in cattle serum.* IAEA - TECDOC - 267, Vienna, 123-134.
15. Lengemann, F.M. (1982). *Labelling of antigens by iodination,* FAO / IAEA Interregional Radioimmunoassay Training Course, Cornell Univ. Atpaca, N.Y. USA, 7-16 July.
16. Letsky, E.A., Miller, F., Worwood, M., and Flynn, D.M. (1974). *Serum ferritin in children with thalassaemia regularly transfused.* J. Clin. Pathol. 27, 652-655.
17. Linder, M.C., and Munro, H.N. (1972). *Assay of thissue ferritin,* Anal. Biochem. 48, 266-278.

18. Lloyd, D.A., and Valberg, L.S. (1977). *Serum ferritin and body iron status after gastric operations*. Am. J. Div. Dis. 2d, 598-601.
19. Mazza, J., Barr, R.M., McDonald, J.M.D. (1978). *Usefulness of the serum ferritin concentration in the detection of iron deficiency in a general hospital*. Can. Med. Assoc. J. 119, 884-889.
20. Miles, L.E.M., Lipschitz, D.A., Bieber, C.P., and Cook, J.D. (1974). *Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay*. Analyt. Biochem. 61, 209-224
21. Powell, L.W. Halliday, J.W., and Cowlshaw, J.L. (1978). *Relationship between serum ferritin and total body iron stores in idiopathic hemochromatosis* Gut, 19, 538-542.
22. Reeves, W.B., and Haurani, F.I. (1980). *Clinical Applicability and usefulness of ferritin measurements*. Ann. of Clin. and Lab. Sci. 10, 529-535.
23. Reimers, T.J. (1982). *Theoretical Aspects of Radioimmunoassay Training-Course*. FAO / IAEA Interregional Radioimmunoassay Training Course, Cornell Univ. Ithaca, N.Y., USA, 7-16 July.
24. Wide, L., Birgegard, G. (1977). *Radioimmunoassay techniques*. Upsala J. Med. Sci. 8d, 15-20.