

Иммунохимические тест-системы для внелабораторной диагностики

Н.А. Таранова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33

Резюме

Обзор посвящен характеристике существующего разнообразия иммунохимических аналитических систем для внелабораторной диагностики. Определены требования к внелабораторным аналитическим системам. Охарактеризованы тенденции их развития, связанные с обеспечением экспрессности и производительности тестирования. Описаны общие принципы иммуноаналитических методов, реализуемых во внелабораторных условиях, включая иммунохроматографию, иммунофильтрацию, иммуноаффинные колонки, микрофлюидные тест-системы, портативные варианты иммуноферментного и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, оптические методы иммуноанализа на основе резонансного переноса энергии, агглютинационный иммуноанализ. Представлена сравнительная оценка преимуществ и ограничений этих методов.

Ключевые слова: экспресс диагностика, тест-системы, иммуноанализ.

Immunochemical test-systems for nonlaboratory diagnostics

N.A. Taranova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev

A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninsky prospect 33, 119071 Moscow, Russia

E-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Tel. +7 (495) 954-31-42

Fax +7 (495) 954-28-04

Abstract

The review describes variety of existing immunoanalytical systems for non-laboratory diagnostics. The criteria of portable field testing devices are defined. Actual trends in the development of novel immunoanalytical systems are characterized, with special attention to

rapidity and labour productivity. Basic principles for different kinds of out-of-lab immunoassays are described. The review contains analysis of such immunoassay formats as immunochromatography, immunofiltration, immunoaffinity columns, microfluidic test systems, portable versions of enzyme linked immunosorbent assays and polarization fluorescence immunoassays, optical immunoassays based on resonance energy transfer, and agglutination immunoassays. The comparative evaluation of the advantages and limitations of these methods is given.

Key words: rapid diagnostic test system, immunoassay

Введение

В настоящее время существует две разнонаправленные тенденции развития методов медицинской диагностики: первое направление заключается в создании сложных автоматизированных систем; второй путь – разработка методов, позволяющих проводить определения на месте отбора проб [1]. Методы, позволяющие проводить анализ вне лабораторий, приобретают все большую популярность. Такой режим исключает необходимость в дорогом стационарном оборудовании, экономит время и средства на получение результатов и принятие основывающихся на них решений [2; 3]. В большинстве внелабораторных тестов для выявления целевого соединения используется его специфическое взаимодействие с той или иной биомолекулой – реакции фермент-субстрат или фермент-ингибитор, лиганд-рецептор, антиген-антитело и др. Активно применяются иммунохимические методы, в основе которых лежит высокоспецифичное взаимодействие определяемого соединения с соответствующими антителами [4; 5].

Настоящий обзор посвящен характеристике существующего разнообразия иммунохимических аналитических систем для внелабораторной диагностики. Следует подчеркнуть, что принадлежность того или иного формата анализа к внелабораторным методам не является раз и навсегда заданным свойством, а отражает современный уровень развития технологий, возможность серийного производства тех или иных компонентов, необходимых для миниатюризации аналитической системы и в то же время обеспечения высокой точности и воспроизводимости результатов измерений. Иногда слова о внелабораторном характере разработанной тест-системы являются «обещанием на будущее», отражая лишь ее экспрессность и портативность в отсутствие технических решений для стабильного получения воспроизводимых результатов тестирования во

внелабораторных условиях. Поэтому при определении границ рассматриваемого в обзоре разнообразия необходимо установить предельные требования, отражающие практические представления о внелабораторных аналитических системах. Исходя из сложившихся в аналитической химии и клинической диагностике представлений, такими требованиями можно считать:

- 1) Портативность аналитической системы – объем, занимаемый всеми ее компонентами и дополнительными приспособлениями, необходимыми для проведения анализа и оценки его результатов, не превосходит 20 x 20 x 20 см;
- 2) Автономность – отсутствие зависимости от внешних источников энергии или иных ресурсов при проведении анализа;
- 3) Методическая простота – возможность проведения анализа сразу после прочтения инструкции, без освоения каких-либо дополнительных навыков и тренировок;
- 4) Быстрое получение результатов – временной интервал между получением тестируемой пробы и определением (качественным или количественным) в ней целевого соединения не должен превосходить 20 минут.

Соответствие этим требованиям позволяет отнести аналитические системы к тест-методам, или тестам. В соответствии с определением, принятым в аналитической химии, тест-методами (тестами) называются экспрессные, простые в реализации способы оценки присутствия и / или содержания определенного вещества в пробе [6]. Экспрессность и простота означают, что тест-методы позволяют проводить идентификацию и определение содержания аналита за минимальное время на месте отбора проб без предварительной трудоемкой пробоподготовки; при этом проведение всех стадий анализа и регистрации результатов не требует использования стационарного оборудования.

Далеко не все виды иммунохимического анализа имеют портативные варианты и допускают реализацию во внелабораторных условиях. Так, например, классический иммуноферментный анализ, капиллярный иммуноэлектрофорез, проточно-инжекционный иммуноанализ характеризуются необходимостью сложного аппаратного обеспечения и отсутствием (во всяком случае, на сегодняшний день) компактных тест-систем. Открытым является вопрос об электрохимических иммуноаналитических тест-системах. Несмотря на большое число разработок по их миниатюризации, на сегодняшний день отсутствуют общие технические решения, обеспечивающие методическую простоту использования таких систем (автономное проведение анализа при сохранении миниатюризации) и

сохранение высокой степени точности при работе с портативными системами во внелабораторных, не защищенных от внешних воздействий условиях.

В обзоре представлена характеристика общих принципов, сравнительных преимуществ и недостатков следующих групп иммуноаналитических методов:

- иммунохроматография;
- иммунофильтрация;
- тест-системы на основе иммуноаффинных колонок;
- микрофлюидные тест-системы;
- портативные варианты иммуноферментного анализа (ИФА);
- портативные варианты поляризационного флуоресцентного иммуноанализа;
- оптические методы иммуноанализа на основе резонансного переноса энергии;
- агглютинационный иммуноанализ.

Основная часть

1 Иммунохроматография

Первые разработки иммунохроматографических тест-систем появились около 30 лет назад [7; 8] и были ориентированы на клиническую диагностику. На сегодняшний день эти тест-системы широко используются для целей медицины, ветеринарии, контроля качества продуктов питания и мониторинга окружающей среды. Иммунохроматографические тест-системы (тест-полоски) относятся к гетерогенным аналитическим системам. Тест-полоска представляет собой мультимембранный композит, на определенные участки которого предварительно нанесены все необходимые для анализа иммунореагенты и их комплексы с маркером (рис. 1). Контакт с жидкой пробой инициирует движение ее компонентов вдоль мембран тест-полоски под действием капиллярных сил, сопровождающееся иммунохимическими взаимодействиями с нанесенными реагентами [9]. Результатом анализа является формирование в определенных участках тест-полоски иммунных комплексов, содержащих маркер. Исходя из наличия или отсутствия этого связывания, делается качественный вывод о присутствии в пробе аналита или о превышении им характерной для тест-системы пороговой концентрации. Возможно количественное определение содержания аналита, основывающееся на интенсивности окрашивания, флуоресценции или иной характеристики связанного маркера.

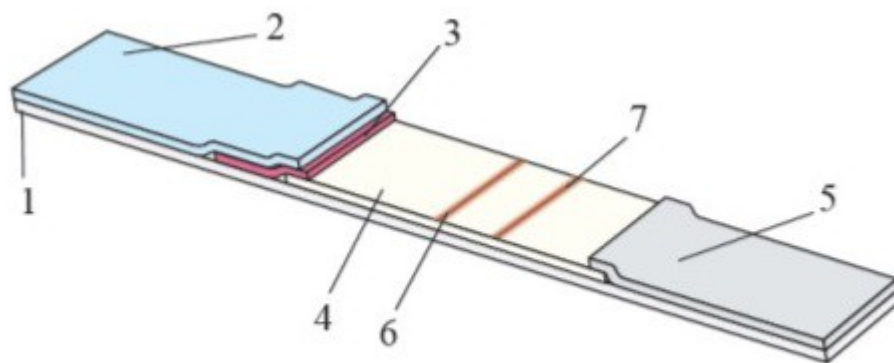


Рис. 1. Схема иммунохроматографической тест-полоски: 1 – пластиковая подложка; 2 – мембрана для пробы; 3 – мембрана для конъюгата маркера с антителами; 4 – рабочая мембрана; 5 – впитывающая мембрана; 6 – тестовая зона; 7 – контрольная зона с антивидами антителами

Существуют варианты иммунохроматографических тест-систем, в которых принцип «все реагенты предварительно нанесены на тест-полоску» не соблюдается. Для усиления детектируемого сигнала могут использоваться дополнительные реагенты, наносимые на тест-полоску после иммунохроматографии [10; 11]. Возможна также предварительная инкубация одного из иммунореагентов (например, раствора конъюгата коллоидного золота) с пробой, обеспечивающая большую глубину протекания иммунохимической реакции в гомогенных условиях по сравнению с взаимодействием при движении иммунореагентов в потоке вдоль мембран (гетерогенные условия) [12]. Эти и другие подобные им приемы усложняют тестирование, позволяя, однако, получать результаты с высокой чувствительностью. Но и такие аналитические наборы могут быть отнесены к внелабораторным тестам [13; 14].

Пределы обнаружения для иммунохроматографических тест-систем колеблются от наномолярных до микромолярных концентраций в зависимости от свойств иммунореагентов, маркера и способа детектирования [15; 16]. Использование портативных детекторов [11] позволяет в отдельных случаях снизить эти пределы до пикомолярных концентраций. Продолжительность иммунохроматографического тестирования варьирует от 5 до 20 минут [17].

Иммунохроматографические тест-системы – наиболее успешно коммерциализованный класс внелабораторных тестов. Тест-полоски для выявления

беременности, контроля употребления психоактивных соединений, диагностики инфекционных заболеваний производятся десятками фирм. Выпускаются иммунохроматографические тест-системы для контроля пищевых продуктов, сельскохозяйственного и экологического мониторинга. Ряд фирм предлагает портативные детекторы (преимущественно – фотометрические) для регистрации результатов иммунохроматографии. Существуют также российские портативные детекторы [18]. В последние годы активно ведутся разработки по использованию в качестве альтернативных детекторов серийных коммуникационных средств – смартфонов, мобильных телефонов, Google-камеры [19-21].

2 Иммунофильтрация

Одним из вариантов гетерогенного анализа является иммунофильтрация, основанная на использовании пористых мембран или пористого сорбента в качестве носителя, на котором иммобилизованы взаимодействующие с аналитом антитела [22]. Иммунофильтрационный анализ включает несколько стадий пропускания реагентов через мембрану, чередующихся с промывкой мембраны от несвязавшихся реагентов. Гетерогенные взаимодействия на этих стадиях, в отличие от ИФА, происходят под давлением или действием силы тяжести, что позволяет существенно сократить их продолжительность и затрачивать на весь анализ не более 15-20 мин.

Впервые метод иммунофильтрации был описан в работе Cleveland P.H. et al. [23], предложивших нанести вирус простого герпеса на фильтровальную бумагу и определять антитела к этому вирусу с помощью радиоактивной метки (^{125}I). Следующим этапом в развитии иммунофильтрации стало использование ферментов в качестве детектирующего реагента [24; 25]. В качестве маркеров в иммунофильтрации также могут использоваться наночастицы [25]. Применение ферментов увеличивает количество стадий и время тестирования, тогда как использование наночастиц позволяет проводить экспрессный анализ. Для ряда систем – при определении маркеров болезни Альцгеймера, возбудителей острых кишечных инфекций – показано, что иммунофильтрация (маркер – коллоидное золото) превосходит по пределу обнаружения и скорости иммуноферментные аналоги [24; 26; 27]. Дополнительное снижение предела обнаружения достигалось при использовании солей серебра [28] или золота [29], увеличивающих размеры маркерных наночастиц.

Предел детекции иммунофильтрационного анализа зависит от аффинности реагентов и скорости пропускания растворов через мембрану. Снизить этот предел можно,

используя дополнительные реагенты с высокой константой связывания, например, водорастворимые полиэлектролиты. В таких тест-системах [30-32] реакция между антигеном и антителом протекает в гомогенных условиях, а связанный с антителами полиэлектролит в ходе фильтрации с очень высокой скоростью взаимодействует с иммобилизованным на мембране противоионом (рис. 2). Иммунофильтрационные тест-системы с использованием полиэлектролитов, разработанные для определения метамфетамина, тестостерона, симазина, позволяют проводить анализ за 20 мин., включая короткую стадию трансформации ферментом-меткой субстрата с образованием на мембране осадка нерастворимого окрашенного продукта.

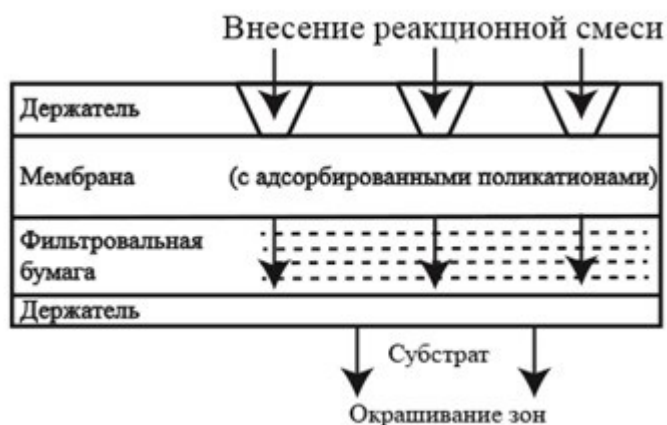


Рис. 2. Принцип иммунофильтрационного анализа, основанного на полиэлектролитном разделении, и схема устройства для его проведения (на основании материалов [30])

3 Тест-системы на основе иммуноаффинных колонок

К иммунофильтрационным тест-системам по принципу работы наиболее близки колоночные тесты, в которых роль носителя (твердой фазы) выполняет гель с иммобилизованными антителами [33-35]. Анализ с использованием иммуноаффинных колонок проводится так же, как и иммунофильтрация, и включает стадии пропускания через гель пробы, специфических реагентов и промывочных растворов. Как правило, иммуноаффинная хроматография рассматривается как предварительная стадия анализа, после которой выявление аналита проводится с использованием хроматографии высокого давления с масс-спектрометрической идентификацией. Однако существует и ряд разработок, в которых иммуноаффинная хроматография используется как самостоятельный аналитический метод. Маркерами в таких системах являются ферменты или наночастицы. Вывод о результате тестирования делается на основании появившегося

окрашивания самой колонки или элюата. Описан ряд аналитических систем на основе аффинных колонок, на определенных участках которых расположены зоны связывания [34-37].

В современной практике для тестирования с помощью иммуноаффинных колонок преобладает качественная (визуальная) регистрация. Количественная оценка результатов возможна при использовании портативных оптических детекторов [38]. Время анализа не превышает 10 мин, а предел детекции, как правило, находится в диапазоне наномолярных концентраций [39; 40].

Отметим, что для проточных методов - иммунофильтрации и иммуноаффинных колонок – существует дополнительный фактор, который, наряду с форматом анализа и аффинностью антител, вносит вклад в чувствительность детекции. В проточной системе при проведении анализа возможно концентрировать аналит из пробы. Через мембрану или колонку можно пропустить десятки миллилитров пробы, увеличивая количество молекул аналита, связанного с носителем. Дальнейший рост этого объема и соответствующее снижение предела обнаружения лимитируются неспецифическими взаимодействиями на носителе.

4 Микрофлюидные тест-системы

Микрофлюидные тест-системы представляют собой подложки с нанесенными микроканалами, по которым при проведении анализа под действием капиллярных сил или давления движутся реагенты [41]. Каналы соединяют углубления (реакторы), в которых находятся молекулы антител, вспомогательных реагентов, маркеры. Проба вносится в тест-систему и движется по каналам. Определяемые соединения связываются с антителами или антигенами, которые могут быть иммобилизованы на стенках каналов или вноситься вместе с пробой. Реагенты, связанные с носителем, затем фиксируются в определенном месте под действием электрического или магнитного поля. После этого вводится меченный маркером реагент, который связывается с образовавшимся иммунным комплексом. Содержание маркера в этой зоне связывания измеряется, и на основании полученной величины определяется содержание аналита в пробе (рис. 3) [42; 43].

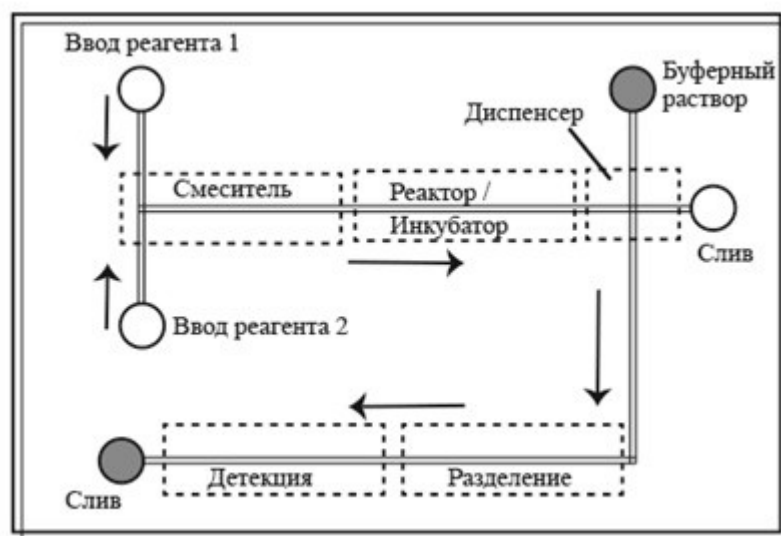


Рис. 3. Схема микрофлюидной тест-системы с указанием ее основных узлов

Существующие микрофлюидные тест-системы крайне разнообразны по геометрии (см. обзорные публикации [44-47]). Разветвленные каналы, сформированные на небольшой (несколько квадратных сантиметров) подложке, позволяют за 10-20 минут одновременно детектировать десятки соединений.

Пределы обнаружения в микрофлюидном иммуноанализе с фотометрической или флуоресцентной детекцией достигают наномолярных концентраций. Электрические методы детектирования в ряде случаев позволяют выявлять пикомолярные концентрации аналитов [48]{Tekin, 2013 #1137}. На сегодняшний день несколько фирм выпускают микрофлюидные тест-системы с колориметрической, флуоресцентной или электрохимической детекцией [44]. Предлагаемые микрофлюидные чипы позволяют проводить анализ за 10-30 мин. Для получения количественных результатов применяются портативные регистрирующие устройства, включающие источник возбуждения, детектор и компьютер.

Большинство коммерческих микрофлюидных тестов предусматривает использование вспомогательного оборудования, такого как планарный шейкер для пассивного перемешивания. В некоторых случаях используется активное перемешивание реагентов за счет электрокинетических процессов. Для введения жидкостей в микроканалы в основном применяются внешние насосы, не входящие в комплектацию теста. Однако существуют решения с электрокинетическим управлением движением жидкости, позволяющие реализовать компактные наборы [44; 49].

5 Портативные варианты иммуноферментного анализа

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) в микропланшетном варианте на сегодняшний день реализован для большого числа соединений и широко применяется в клинико-диагностической практике [50]. ИФА включает несколько стадий: предварительную иммобилизацию антител или антигена на поверхности полистиролового микропланшета; добавление пробы, содержащей аналит; введение иммунореагента, меченного ферментом; получение окрашенного продукта из субстрата в ходе ферментативной реакции. Каждая стадия анализа предусматривает инкубацию реагентов, а между стадиями проводится отмывка лунок микропланшета для отделения комплексов, иммобилизовавшихся на его поверхности, от несвязавшихся соединений. К достоинствам ИФА относится высокая чувствительность, обусловленная амплификацией сигнала с помощью фермента-маркера. Существует огромный ассортимент наборов ИФА, охватывающих широкий спектр антигенов и позволяющих работать с матриксами разной природы.

Несмотря на преимущества метода и различные способы совершенствования его методик (снижения предела обнаружения, автоматизации анализа и др.), дальнейшее расширение области применения ИФА ограничивают его два основных недостатка [50]. Во-первых, это длительное время определения (2-3 часа), вызванное необходимостью продолжительных инкубаций на каждой стадии для достижения химического равновесия в гетерогенных реакциях между иммобилизованными и находящимися в растворе иммунореагентами. Второй ограничивающий фактор – приборная регистрация результатов (оптической плотности продукта ферментативной реакции), необходимая для расчета содержания определяемого аналита.

Необходимость экспрессного тестирования вызвала появление модификаций ИФА, существенно сокращающих время определения. Опубликован ряд статей, посвященных изучению кинетики иммунохимических взаимодействий и соответствующей оптимизации методик ИФА [40]. В работах [52; 53] использование полимерных или магнитных наночастиц в качестве носителей позволяет проводить реакции в гомогенной среде, что снижает продолжительность ИФА примерно до 30 мин [54]. Fu J. с соавт. предлагают заменить ферментативный маркер на флуоресцентный краситель, что позволяет исключить стадию развития сигнала, необходимую для меток-ферментов [55].

Все эти способы позволяют сократить время анализа до 10-30 мин, но сохраняют приборную регистрацию результатов.

Альтернативный подход, реализованный для конкурентного определения низкомолекулярных соединений (микотоксины афлатоксин и фумонизин), позволяет отнести предложенный ими ИФА к внелабораторным тестам. Разработчики предлагают проводить реакции в двух лунках (проба и ячейка сравнения). Вспомогательные растворы реагентов входят в состав набора. Продолжительность стадий ИФА сокращена до 2-3 мин. Промывку лунок от несвязавшихся реагентов осуществляют вручную, используя флаконы-капельницы. Конечный результат анализа оценивается визуально. Таким образом, предложенный анализ удовлетворяет всем критериям внелабораторных тестов.

Ramachandran S. с соавт. [56] предложили автоматизированный ИФА с использованием проточного портативного устройства (рис. 4). Уникальность разработки заключается в том, что все реагенты находятся в лиофильно-высушенном состоянии (что упрощает их хранение) и растворяются при добавлении пробы. Внесение пробы в кассету – единственное действие, требуемое от оператора; все последующие процессы инициируются движением жидкости по компонентам тест-системы под действием капиллярных сил (как и в иммунохроматографии). Данная система успешно применена для определения биомаркера возбудителя малярии *Plasmodium falciparum* – белка 2, богатого гистиidiном. Результат анализа детектируется через 20 мин после введения пробы – либо качественно (по появлению окраски), либо количественно (с помощью сканера).

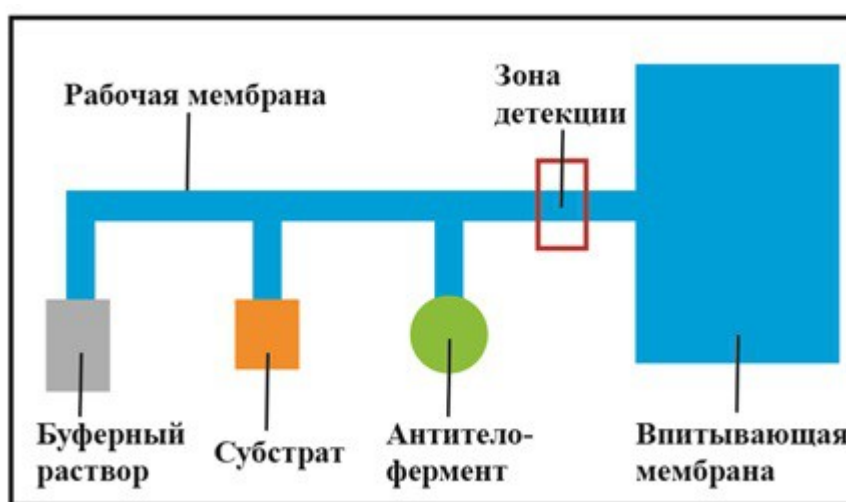


Рис. 4. Схема портативного устройства для проведения ИФА (на основании материалов [56])

6 Портативные варианты поляризационного флуоресцентного иммуноанализа

Гомогенный поляризационный флуоресцентный иммуноанализ (ПФИА) основан на изменении степени поляризации плоскополяризованного света, пропущенного через раствор, который содержит пробу, флуоресцентно меченные производные анализата (трейсеры) и специфические антитела. Деполаризация плоскополяризованного света зависит от размеров поглощающих молекул – рис. 5.

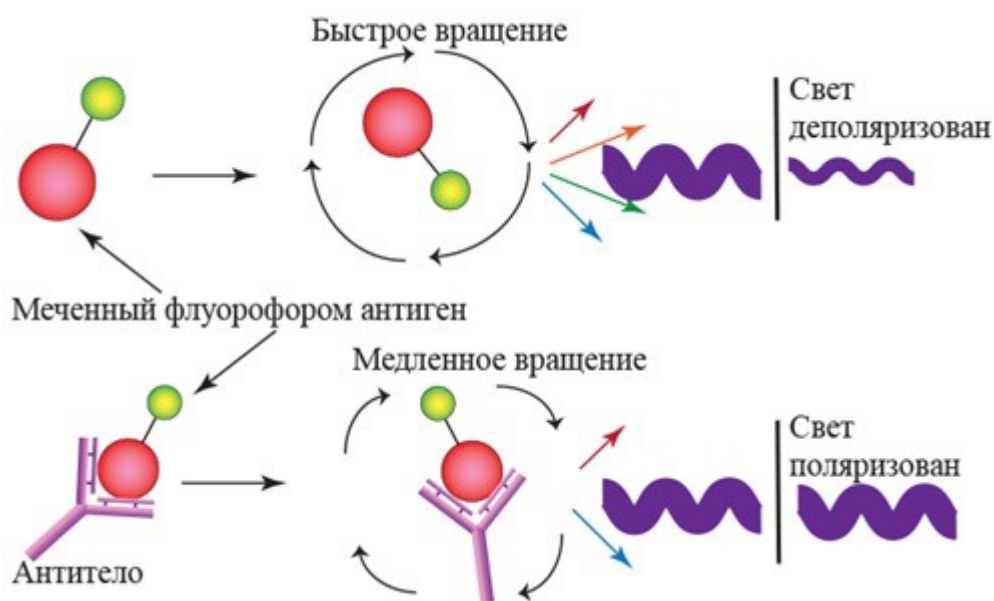


Рис. 5. Принцип ПФИА и зависимость степени деполаризации от размера комплекса

Малые молекулы (свободный трейсер) характеризуются быстрым вращением, что обеспечивает деполаризацию излучаемого света (флуоресценции). При связывании трейсера с антителом образуется комплекс, который из-за больших размеров медленно вращается и поэтому в момент эмиссии частично сохраняет ту же ориентацию, что и при поглощении света, а значит, частично сохраняет и поляризацию излучаемого света. Наличие анализата в пробе приводит к конкуренции с трейсером за связывание с антителами и, соответственно, к большей деполаризации излучаемого света. Регистрируемая величина поляризации флуоресценции отражает отношение связанных и свободных молекул трейсера в реакционной смеси, что позволяет на основании этого параметра рассчитывать концентрацию анализата в пробе [57].

Как следует из представленного выше описания, ПФИА может быть реализован лишь для детекции низкомолекулярных соединений. При больших размерах молекулы антигена трейсер будет сохранять поляризацию поглощаемого света и в свободном

состоянии, и в комплексе с антителами. Для традиционных флуорофоров в качестве предельной молекулярной массы антигена, допускающей проведение ПФИА, рассматривается величина, равная 10 кД. В последние годы этот предел удалось преодолеть за счет применения флуорофоров, характеризующихся большой временной задержкой между поглощением света и его эмиссией [57].

Иммуноанализ с регистрацией поляризации флуоресценции активно применяется в современной аналитической практике, как правило – с использованием стационарного приборного обеспечения [57-59]. Ряд компаний выпускает наборы реагентов для иммуноанализа на основе поляризации флуоресценции. В отдельных случаях ПФИА характеризуется высокой чувствительностью, позволяя детектировать пикомолярные концентрации аналита [60].

Гомогенная аналитическая реакция с быстрым достижением равновесия, отсутствие длительных инкубаций, появление в последние годы портативных детекторов поляризации флуоресценции позволяет проводить ПФИА во внелабораторных условиях и рассматривать соответствующие варианты анализа как внелабораторные методы [61; 62]. Выпускаются портативные детекторы для ПФИА и совместимые с ними наборы реагентов для определения микотоксинов и некоторых возбудителей заболеваний.

7 Оптические методы иммуноанализа на основе резонансного переноса энергии

Еще один вид гомогенного иммуноанализа, реализуемый как внелабораторные тесты, – иммуноанализ, основанный на резонансном переносе энергии между донором и акцептором. Резонансный перенос энергии Форстера (Förster resonance energy transfer (FRET)) – это безызлучательный перенос на расстояния в несколько нанометров, который происходит от возбужденного донора электронов к акцептору через диполь–дипольное взаимодействие [63]. Регистрируется этот перенос по эмиссии акцептора при длине волны, не совпадающей с пиком поглощения донора. Донорно–акцепторная пара для аналитического применения подбирается таким образом, чтобы обеспечить эффективный перенос энергии (рис. 6).

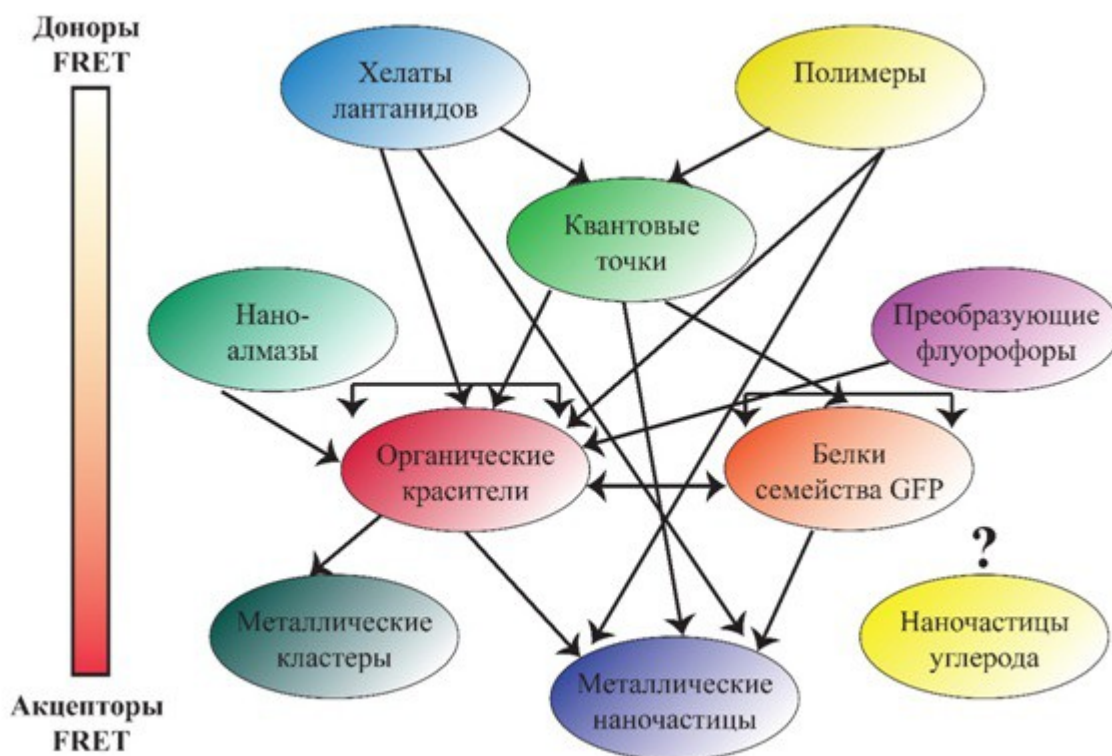


Рис. 6. Схема допустимых сочетаний доноров и акцепторов для FRET-анализа. Стрелки указывают приоритетное направление потока энергии (на основании материалов [64])

Эффективность переноса энергии обратно пропорциональна расстоянию в шестой степени [65]. Для большинства используемых пар высокая эффективность переноса достигается при сближении донора и акцептора на расстояния до 4–6 нм [66; 67], что сопоставимо с размерами антител [68]. Поэтому, пометив иммунореагенты донором и акцептором, можно регистрировать взаимодействие антиген–антитело. Если донор и акцептор в результате иммунного взаимодействия сближаются, то перенос энергии значительно возрастает. Избыточная энергия, полученная акцептором, преобразуется в детектируемую люминесценцию.

Существует несколько модификаций иммуноанализа на основе FRET. Наиболее распространена конкуренция свободного и меченого акцептором антигена за связывание с антителами, мечеными донором электронов. При отсутствии анализита в пробе донор передает энергию на акцептор (эффект FRET), флуоресценция донора не регистрируется (рис. 7, А). Присутствие анализита в пробе препятствует взаимодействию меченого антигена с антителом, что приводит к излучению энергии донором (рис. 7, Б).

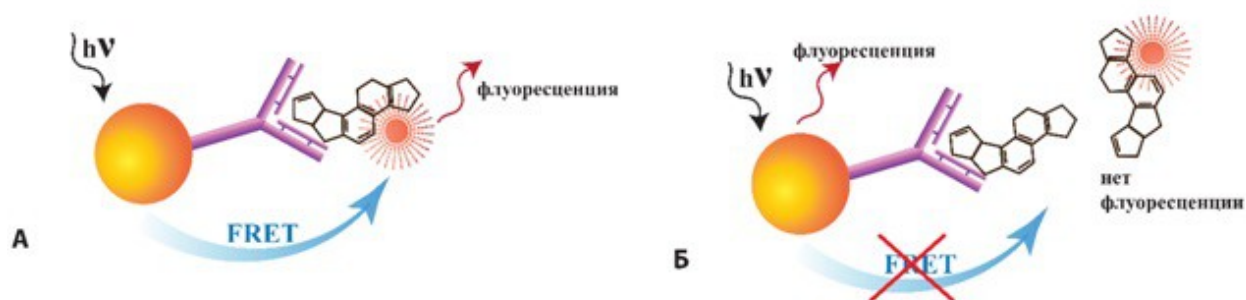


Рис. 7. Принцип конкурентного иммуноанализа на основе FRET (А – в отсутствии; Б – в присутствии определяемого соединения)

Детектируемый сигнал во FRET-анализе зависит от типа маркера: возможна флуоресценция, хемилюминесценция, биолуминесценция. В анализе применяются разнообразные флуоресцентные маркеры: белки, органические красители, наночастицы и др. [63; 69]. Используя два флуорофора, можно определять содержание аналита по соотношению интенсивностей флуоресценции при длинах волн, соответствующих максимумам излучения донора и акцептора [70].

В основе хемилюминесцентного FRET лежит использование энергии, выделяемой при реакции между пероксидом водорода и люминолом (либо его производными, эфирами щавелевой кислоты, акридинами, люцигенином и др.) [71; 72]. Маркер получает эту энергию, а затем выделяет ее в виде детектируемой люминесценции [73]. Описано несколько вариантов хемилюминесцентного FRET-анализа: антитела к определяемому соединению могут быть связаны с ферментом [73] или с производным люминола [74].

Отметим, что для проведения FRET-иммуноанализа достаточно смешать пробу с растворами маркеров. Иммунохимические взаимодействия осуществляются в растворе и не требуют длительных инкубаций, а их результат может непосредственно детектироваться без дополнительных стадий и вспомогательных реагентов.

Иммуноанализ на основе FRET характеризуется низким пределом обнаружения, вплоть до пикомолярных концентраций аналита, и экспрессностью – 15–20 мин [75–77]. Существуют коммерческие наборы для определения, например, киназ, аденозинмонофосфата, антивидовых антител. Предложены флуоресцентные детекторы, позволяющие работать с тест-системами на основе FRET [78].

8 Агглютинационный иммуноанализ

В агглютинационном анализе, появившимся более полувека назад [79; 80], регистрируется осаждение иммунных комплексов, образующихся в результате взаимодействия антител с содержащимися в тестируемой пробе молекулами антигена. Для того чтобы иммунный комплекс выпадал в осадок, антиген должен обладать несколькими сайтами связывания (молекулы антител всегда поливалентны). Агглютинация относится к гомогенным методам анализа и подразделяется на несколько видов: прямая агглютинация, латекс-агглютинация, гемагглютинация. Каждый из вышеперечисленных видов агглютинации может быть реализован в двух форматах: прямой – осаждение образованного комплекса аналита пробы и антител – и ингибирование (торможение) агглютинации [1]. Оценка результатов агглютинации осуществляется, как правило, визуально.

Метод прямой агглютинации используется для крупных антигенов и позволяет определять их только в высоких концентрациях [81]. В качестве дисперсного носителя антител в коммерческих тест-системах, как правило, применяются латексные или полистирольные частицы. Предел определения аналита с помощью латекс-агглютинации редко бывает ниже 1 нМ [82], а в большинстве случаев находится в микромолярном диапазоне [83]. Метод латекс-агглютинации широко используется для определения большого количества аналитов бактериальной природы, специфических антител (см. работу [84] как один из примеров). Применение окрашенных латексных частиц в качестве дисперсного носителя в агглютинации позволяет одновременно определять несколько аналитов с удобной визуальной детекцией [83].

Одним из методов иммуноанализа, основанных на осаждении, является гемагглютинация. В этом методе используются эритроциты крови с иммобилизованным на их поверхности антигеном. Гемагглютинация – сравнительно длительный (~1 час) и трудоемкий анализ [85]. Ограничения гемагглютинации заключаются в нестабильности эритроцитов при хранении.

Методы торможения агглютинации основаны на конкурентном взаимодействии свободного аналита и аналита, иммобилизованного на поверхности носителя, с антителами в растворе [86]. Данный подход, в отличие от традиционной агглютинации, позволяет детектировать низкомолекулярные соединения [87].

Простота реализации и экспрессность, визуальная качественная регистрация результатов позволяет отнести агглютинацию к внелабораторным тестам. Существуют коммерческие агглютинационные тест-системы, например, системы для диагностики

мононуклеоза, определения С-реактивного белка, ревматоидного фактора и др. Количественная оценка результатов агглютинации возможна при использовании турбидиметрии, однако портативные турбидиметрические детекторы с приемлемой чувствительностью и точностью измерений на сегодняшний день не разработаны.

Заключение

Как видим, иммунохимические внелабораторные тесты существенно отличаются друг от друга по сложности тестирования. Наибольший интерес представляют варианты, в которых проведение анализа не требует каких-либо действий с реагентами. Если все соединения, необходимые для формирования детектируемого комплекса, нанесены на тест-полоску или другое устройство, то всё, что должен сделать оператор, – обеспечить контакт тест-системы с характеризуемой пробой (например, окунуть тест-полоску в пробу). К таким тест-системам, наиболее эффективным с точки зрения трудозатрат, на сегодняшний день можно отнести иммунохроматографические тесты и часть микрофлюидных тест-систем.

В подавляющем большинстве тест-систем детекция формирующихся иммунных комплексов обеспечивается использованием того или иного маркера. Фактически только агглютинация корпускулярных антигенов не требует применения маркера (и при этом характеризуется довольно высокими пределами обнаружения).

Исследователи предлагают различные варианты решений, направленных на улучшение аналитических характеристик иммунохимических тест-систем. Применение новых маркеров, портативных аналитических устройств (в том числе детекторов) обуславливает существенное обновление и увеличение разнообразия доступных пользователям средств внелабораторной иммунодиагностики.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-14-01131).

Литература

1. Von Lode P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods // *Clinical Biochemistry*. 2005. Т. 38. № 7. — P. 591-606.
2. Hu J., Wang S., Wang L., Li F., Pingguan-Murphy B., Lu T.J., Xu F. Advances in paper-based point-of-care diagnostics // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. V. 54. — P. 585-597.

3. Зверева Е.А., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Экспрессное иммунохроматографическое определение антибиотиков в продуктах питания // Биозащита и Биобезопасность. 2013. Т.5. №1. — С. 24-27.
4. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2014. V. 55. — P. 81-93.
5. Wild D. The Immunoassay Handbook. Amsterdam: Elsevier, 2005.
6. Золотов Ю.А., Иванов В.М., Амелин В.Г. Химические методы анализа. — М.: «Едиториал УРСС», 2002.
7. Campbell R.L., O'Connell J.P.W., D.B. Solid phase assay with visual readout. — Patent, USA No 0154749, 1987.
8. Bloomster T.G., Rosenstein R.W. Solid phase assay employing capillary flow. — Patent, USA No 0291176 B1, 1989.
9. Wong R.C., Tse H.Y. Lateral Flow Immunoassay. — New York: Humana Press, 2009.
10. Linares E.M., Kubota L.T., Michaelis J., Thalhammer S. Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: evaluation and comparison of bioconjugates // J Immunol Methods. 2012. V. 375. № 1-2. — P. 264-270.
11. Parolo C., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes // Biosensors and Bioelectronics. 2013. V. 40. № 1. — P. 412-416.
12. Jin S., Chang Z.Y., Ming X., Min C.L., Wei H., Sheng L.Y., Hong G.X. Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies of human toxoplasmosis // Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 2005. V. 12. № 1. — P. 198-201.
13. Hoile R., Yuen M., James G., Gilbert G.L. Evaluation of the rapid analyte measurement platform (RAMP) for the detection of Bacillus anthracis at a crime scene // Forensic Science International. 2007. V. 171. № 1. — P. 1-4.
14. Bai Z., Luo Y., Xu W., Gao H., Han P., Liu T., Wang H., Chen A., Huang K. Development of a new fluorescence immunochromatography strip for detection of chloramphenicol residue in chicken muscles // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2013. V. 93. № 15. — P. 3743-3747.
15. Gordon J., Michel G. Analytical sensitivity limits for lateral flow immunoassays // Clinical Chemistry. 2008. V. 54. № 7. — P. 1250-1261.

16. Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Dzantiev B.B. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. V. 405. № 14. — P. 4997-5000.
17. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Староверова Н.П., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение иммунохроматографического анализа для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота // *Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные*. 2013. №3. — С. 15-18.
18. Старовойтова Т.А., Зайко В.В., Туголуков А.Е., Венгеров Ю.Ю., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Видеоцифровая регистрация в лабораторной диагностике: аппаратно-программные комплексы и тест-системы // *Справочник заведующего КДЛ*. 2012. № 6. — С. 35-43.
19. Coskun A.F., Wong J., Khodadadi D., Nagi R., Tey A., Ozcan A. A personalized food allergen testing platform on a cellphone // *Lab on a Chip*. 2013. V. 13. № 4. — P. 636-640.
20. O'Driscoll S., MacCraith B.D., Burke C.S. A novel camera phone-based platform for quantitative fluorescence sensing // *Analytical Methods*. 2013. V. 5. № 8. — P. 1904-1908.
21. Eriksson M., Iqbal Z. Two measurement modes for mobile phone optical sensing // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014. V. 195. — P. 63-70.
22. Morais S., Maquieira A., Puchades R. Selection and characterisation of membranes by means of an immunofiltration assay. Application to the rapid and sensitive determination of the insecticide carbaryl // *Journal of Immunological Methods*. 1999. V. 224. № 1-2. — P. 101-109.
23. Cleveland P.H., Richman D.D., Oxman M.N., Wickham M.G., Binder P.S., Worthen D.M. Immobilization of viral antigens on filter paper for a [¹²⁵I]staphylococcal protein A immunoassay: a rapid and sensitive technique for detection of herpes simplex virus antigens and antiviral antibodies // *Journal of Immunological Methods*. 1979. V. 29. № 4. — P. 369-386.
24. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. Use of the dot-immunogold assay for the rapid diagnosis of acute enteric infections // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2000. V. 27. № 2. — P. 135-137.
25. Nadala Jr E.C.B., Loh P.C. Dot-blot nitrocellulose enzyme immunoassays for the detection of white-spot virus and yellow-head virus of penaeid shrimp // *Journal of Virological Methods*. 2000. V. 84. № 2. — P. 175-179.

26. Wang C., Liu D., Wang Z. Gold nanoparticle based dot-blot immunoassay for sensitively detecting Alzheimer's disease related beta-amyloid peptide // *Chemical Communication (Camb)*. 2012. V. 48. № 67. — P. 8392-4.
27. Thiruppathiraja C., Kamatchiammal S., Adaikkappan P., Alagar M. An advanced dual labeled gold nanoparticles probe to detect *Cryptosporidium parvum* using rapid immuno-dot blot assay // *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. V. 26. № 11. — P. 4624-4627.
28. Hacker G.W., Muss W.H., Hauser-Kronberger C., Danscher G., Rufner R., Gu J., Su H., Andreasen A., Stoltenberg M., Dietze O. Electron microscopical autometallography: immunogold-silver staining (IGSS) and heavy-metal histochemistry // *Methods*. 1996. V. 10. № 2. — P. 257-269.
29. Ma Z., Sui S.F. Naked-eye sensitive detection of immunoglobulin G by enlargement of Au nanoparticles in vitro // *Angewandte Chemie International Edition*. 2002. V. 41. № 12. — P. 2176-9.
30. Yazynina E.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Izumrudov V.A., Gee S.J., Hammock B.D. Immunoassay techniques for detection of the herbicide simazine based on use of oppositely charged water-soluble polyelectrolytes // *Analytical Chemistry*. 1999. V. 71. № 16. — P. 3538-3543.
31. Zherdev A.V., Byzova N.A., Izumrudov V.A., Dzantiev B.B. Rapid polyelectrolyte-based immunofiltration technique for testosterone detection in serum samples // *Analyst*. 2003. V. 128. № 10. — P. 1275-1280.
32. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Zherdev A.V., Hennion M.C. Rapid polyelectrolyte-based membrane immunoassay for the herbicide butachlor // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. 2005. V. 26. № 3. — P. 231-244.
33. Visconti A., Pascale M., Centonze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography // *J Chromatogr A*. 1999. V. 864. № 1. — P. 89-101.
34. Beloglazova N.V., De Boevre M., Goryacheva I.Y., Werbrouck S., Guo Y., De Saeger S. Immunochemical approach for zearalenone-4-glucoside determination // *Talanta*. 2013. V. 106. — P. 422-430.
35. Sibanda L., De Saeger S., Barna-Vetro I., Van Peteghem C. Development of a solid-phase cleanup and portable rapid flow-through enzyme immunoassay for the detection of ochratoxin a in roasted coffee // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2002. V. 50. № 24. — P. 6964-6967.

36. Speranskaya E.S., Beloglazova N.V., Lenain P., De Saeger S., Wang Z.H., Zhang S.X., Hens Z., Knopp D., Niessner R., Potapkin D.V., Goryacheva I.Y. Polymer-coated fluorescent CdSe-based quantum dots for application in immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. V. 53. — P. 225-231.
37. Njumbe Ediage E., Di Mavungu J.D., Goryacheva I.Y., Van Peteghem C., De Saeger S. Multiplex flow-through immunoassay formats for screening of mycotoxins in a variety of food matrices // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012. V. 403. № 1. — P. 265-278.
38. Beloglazova N.V., Goryacheva I.Y., de Saeger S., Scippo M.L., Niessner R., Knopp D. New approach to quantitative analysis of benzo[a]pyrene in food supplements by an immunochemical column test // *Talanta*. 2011. V. 85. № 1. — P. 151-156.
39. Beloglazova N., Goryacheva I., Niessner R., Knopp D. A comparison of horseradish peroxidase, gold nanoparticles and quantum dots as labels in non-instrumental gel-based immunoassay // *Microchimica Acta*. 2011. V. 175. № 3. — P. 361-367.
40. Rokni M., Lesan S., Massoud J., Kia E., Gh. M. Comparative evaluation of fast enzyme linked immunosorbent assay (Fast-ELISA) and standard-ELISA For the diagnosis of human hydatidosis // *Iranian Journal of Public Health* 2006. V. 35. № 2. — P. 29-32.
41. Золотов Ю.А., Бельский Б.Г., Курочкин В.Е., Комяк Н.И. Микрофлюидные системы для химического анализа. М.: Физматлит, 2011.
42. Chen S.P., Yu X.D., Xu J.J., Chen H.Y. Gold nanoparticles-coated magnetic microspheres as affinity matrix for detection of hemoglobin A1c in blood by microfluidic immunoassay // *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. V. 26. № 12. — P. 4779-4784.
43. Sardesai N., Kadimisetty K., Faria R., Rusling J. A microfluidic electrochemiluminescent device for detecting cancer biomarker proteins // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013. V. 405. № 11. — P. 3831-3838.
44. Chin C.D., Linder V., Sia S.K. Commercialization of microfluidic point-of-care diagnostic devices // *Lab on a Chip*. 2012. V. 12. № 12. — P. 2118-2134.
45. Gervais L., de Rooij N., Delamarche E. Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnosics // *Advanced Materials*. 2011. V. 23. № 24. — P. H151-H176.
46. Han K.N., Li C.A., Seong G.H. Microfluidic chips for immunoassays // *Annual Review of Analytical Chemistry*. 2013. V. 6. № 1. — P. 119-141.
47. Liana D.D., Raguse B., Gooding J.J., Chow E. Recent advances in paper-based sensors // *Sensors (Basel)*. 2012. V. 12. № 9. — P. 11505-11526.

48. Tekin H.C., Gijs M.A.M. Ultrasensitive protein detection: a case for microfluidic magnetic bead-based assays // *Lab on a Chip*. 2013. V. 13. № 24. — P. 4711-4739.
49. Adel Ahmed H., Azzazy H.M. Power-free chip enzyme immunoassay for detection of prostate specific antigen (PSA) in serum // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. V. 49. — P. 478-484.
50. Crowther J.R. *The ELISA Guidebook*. Vienna: Humana Press, 2001.
51. The Kinetic ELISA Advantage in Quantitative Assays // <http://www.biotek.com/>
52. Radoi A., Targa M., Prieto-Simon B., Marty J.L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on superparamagnetic nanoparticles for aflatoxin M1 detection // *Talanta*. 2008. V. 77. № 1. — P. 138-143.
53. Tudorache M., Bala C. Sensitive aflatoxin B1 determination using a magnetic particles-based enzyme-linked immunosorbent assay // *Sensors*. 2008. V. 8. № 12. — P. 7571-7580.
54. Garden S.R., Strachan N.J.C. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxin B1 // *Analytica Chimica Acta*. 2001. V. 444. № 2. — P. 187-191.
55. Fu J., Wang Y., Cao J., Yu Z., Zhang J. A sensitive, rapid chemiluminescence ELISA for the detection of 1, 4-bisdesoxycyadox residue in chicken muscle and liver // *Analytical Methods*. 2013. V. 5. № 16. — P. 3933-3941.
56. Ramachandran S., Fu E., Lutz B., Yager P. Long-term dry storage of an enzyme-based reagent system for ELISA in point-of-care devices // *Analyst*. 2014. V. 139. № 6. — P. 1452-1462.
57. Smith D.S., Eremin S.A. Fluorescence polarization immunoassays and related methods for simple, high-throughput screening of small molecules // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008. V. 391. № 5. — P. 1499-1507.
58. Goryacheva I.Y., Rusanova T.Y., Burmistrova N.A., Saeger S. Immunochemical methods for the determination of mycotoxins // *Journal of Analytical Chemistry*. 2009. V. 64. № 8. — P. 768-785.
59. Xu Z.L., Wang Q., Lei H.T., Eremin S.A., Shen Y.D., Wang H., Beier R.C., Yang J.Y., Maksimova K.A., Sun Y.M. A simple, rapid and high-throughput fluorescence polarization immunoassay for simultaneous detection of organophosphorus pesticides in vegetable and environmental water samples // *Analytica Chimica Acta*. 2011. V. 708. № 1-2. — P. 123-129.
60. Lea W.A., Simeonov A. Fluorescence polarization assays in small molecule screening // *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2011. V. 6. № 1. — P. 17-32.

61. Gall D., Nielsen K., Bermudez M.R., Moreno F., Smith P. Fluorescence polarization assay for detection of *Brucella abortus* antibodies in bulk tank bovine milk samples // *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2002. V. 9. № 6. — P. 1356-1360.
62. Cullum M.E., Lininger L.A., McArthur A.L., Schade S.Z., Simonson L.G. Fluorescence polarization instruments and methods for detection of exposure to biological materials by fluorescence polarization immunoassay of saliva, oral or bodily fluids. 2012.
63. Sahoo H. Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2011. V. 12. № 1. — P. 20-30.
64. Alexander P.D. Nanoparticles and nanocomposites for fluorescence sensing and imaging // *Methods and Applications in Fluorescence*. 2013. V. 1. № 2. — P. 022001.
65. Kreisig T., Hoffmann R., Zuchner T. Highly efficient forster resonance energy transfer in a fast, serum-compatible immunoassay // *ChemBioChem*. 2013. V. 14. № 6. — P. 699-702.
66. Piston D.W., Kremers G.J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly // *Trends in Biochemical Sciences*. 2007. V. 32. № 9. — P. 407-414.
67. Patterson G.H., Piston D.W., Barisas B.G. Forster distances between green fluorescent protein pairs // *Analytical Biochemistry*. 2000. V. 284. № 2. — P. 438-440.
68. Silvertown E.W., Navia M.A., Davies D.R. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977. V. 74. № 11. — P. 5140-5144.
69. Willard D.M., Carillo L.L., Jung J., Van Orden A. CdSe–ZnS quantum dots as resonance energy transfer donors in a model protein–protein binding assay // *Nano Letters*. 2001. V. 1. № 9. — P. 469-474.
70. Chen G., Song F., Xiong X., Peng X. Fluorescent nanosensors based on fluorescence resonance energy transfer (FRET) // *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2013. V. 52. № 33. — P. 11228-11245.
71. Maruyama T., Sugishita H., Kujira H., Ichikawa M., Hattori Y., Motoyoshiya J. Chemiluminescence behavior of fluorescent aromatics tethered 9-methylidene-10-methylacridans involving chemiluminescence resonance energy transfer (CRET) quenching // *Tetrahedron Letters*. 2013. V. 54. № 11. — P. 1338-1343.
72. He Y., Cui H. Label free and homogeneous histone sensing based on chemiluminescence resonance energy transfer between lucigenin and gold nanoparticles // *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. V. 47. — P. 313-317.

73. Huang X., Ren J. Nanomaterial-based chemiluminescence resonance energy transfer: A strategy to develop new analytical methods // Trends in Analytical Chemistry. 2012. V. 40. — P. 77-89.
74. Qin G., Zhao S., Huang Y., Jiang J., Liu Y.-M. A sensitive gold nanoparticles sensing platform based on resonance energy transfer for chemiluminescence light on detection of biomolecules // Biosensors and Bioelectronics. 2013. V. 46. — P. 119-123.
75. Algar W.R., Tavares A.J., Krull U.J. Beyond labels: a review of the application of quantum dots as integrated components of assays, bioprobes, and biosensors utilizing optical transduction // Analytica Chimica Acta. 2010. V. 673. № 1. — P. 1-25.
76. Freeman R., Girsh J., Willner I. Nucleic acid/quantum dots (QDs) hybrid systems for optical and photoelectrochemical sensing // ACS Applied Materials and Interfaces. 2013. V. 5. № 8. — P. 2815-2834.
77. Bi S., Zhao T., Luo B. A graphene oxide platform for the assay of biomolecules based on chemiluminescence resonance energy transfer // Chemical Communications. 2012. V. 48. № 1. — P. 106-108.
78. Mannila R., Pulli T., Saari H., Tappura K., Tuppurainen J., Valimäki H., Niskanen A. Fluorescence-based fast diagnostics platform for the direct and indirect immunodiagnostic analysis methods // Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV. 2007. Proc. SPIE 6628.
79. Plotz C.M., Singer J.M. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis // American Journal of Medicine. 1956. V. 21. № 6. — P. 888-92.
80. Gella F.J., Serra J., Gener J. latex agglutination procedures in immunodiagnosis // Pure and Applied Chemistry. 1991. V. 63. № 8. — P. 1131-1134.
81. Dressler D., Dirnberger G. Botulinum toxin antibody testing: comparison between the immunoprecipitation assay and the mouse diaphragm assay // European Neurology. 2001. V. 45. № 4. — P. 257-260.
82. Ortega-Vinuesa J.L., Bastos-González D. A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. 2001. V. 12. № 4. — P. 379-408.
83. Aoki K., Itoh Y., Yoshida T. Simultaneous determination of urinary methamphetamine, cocaine and morphine using a latex agglutination inhibition reaction test with colored latex particles // Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health. 1997. V. 43. № 5. — P. 285-292.

84. Gao H., Wang W., Wang Z., Han J., Fu Z. Amorphous carbon nanoparticle used as novel resonance energy transfer acceptor for chemiluminescent immunoassay of transferrin // *Analytica Chimica Acta*. 2014. V. 819. — P. 102-107.
85. Koivunen M.E., Krogsrud R.L. Principles of immunochemical techniques used in clinical laboratories // *Lab Medicine*. 2006. V. 37. № 8. — P. 490-497.
86. Fitzpatrick J., Fanning L., Hearty S., Leonard P., Manning B.M., Quinn J.G., O'Kennedy R. Applications and recent developments in the use of antibodies for analysis // *Analytical Letters*. 2000. V. 33. № 13. — P. 2563-2609.
87. Aoki K., Kuroiwa Y. A screening method for urinary methamphetamine - latex agglutination inhibition reaction test // *Forensic Science International*. 1985. V. 27. № 1. — P. 49-56.