

FLUOROMETRÍA EN TIEMPO RETARDADO: CONCEPTOS GENERALES Y APLICACIONES EN MEDICINA VETERINARIA

Time-resolved fluorometry: General concepts and applications in Clinical Pathology.

Parra M^a D.*, Martínez-Subiela S., Cerón J. J.*

Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad de Veterinaria. 30100 Campus de Espinardo. Murcia

*Autor de referencia: jjceron@um.es

RESUMEN

La fluorometría en tiempo retardado es una tecnología novedosa que surge con la intención de reemplazar al radioinmunoanálisis y se presenta como una posible alternativa al ELISA. Este sistema de detección ha permitido el desarrollo de inmunoensayos altamente sensibles en los que antígenos o anticuerpos son marcados con quelatos de lantánidos, emisores de fluorescencia susceptible de ser cuantificada. Su gran sensibilidad hace que sea una herramienta eficaz en el análisis de compuestos que se encuentran en pequeñas concentraciones en diferentes fluidos orgánicos, tales como orina, sangre o saliva. Los crecientes avances en esta metodología han proporcionado ensayos ultrarápidos y ultrasensibles para la determinación de proteínas de fase aguda y marcadores de infarto de miocardio en medicina humana, mientras que en medicina veterinaria una de sus principales aplicaciones se centra en la determinación de hormonas.

Palabras clave: TRF, europio, DELFIA, lantánido, quelato.

ABSTRACT

Time-resolved fluorometry is a novel technology that emerges to replace radioimmunoassay and appears as a feasible alternative to ELISA. This detection system has led to the development of highly sensitive immunoassays in which antigens or antibodies are labelled with lanthanide chelates, which emit fluorescence capable of being quantified. The high sensitivity makes this technology very useful in the measurement of substances present in small quantities in different organic fluids, such as urine, blood or saliva. Recent advances in fluorometry have provided ultrarapid and ultrasensitive assays for the quantification of acute phase proteins and myocardial infarction markers in human medicine, whereas in veterinary medicine one of its main applications focuses on hormones determination.

Key words: TRF, europium, DELFIA, lanthanide, chelate.

1. INTRODUCCIÓN

El comienzo del empleo de la fluorescencia en inmunología data de 1941 cuando Coons y colaboradores marcaron por primera vez anticuerpos con compuestos fluorescentes para visualizar antígenos. A partir de los años ochenta, la determinación fluorométrica con sus aplicaciones en fluoroinmunoensayos homogéneos y en técnicas *in situ* (inmunocitoquímica, citometría de flujo), empezó a ser considerada como un sistema de detección muy sensible e incluso como una alternativa para reemplazar a los marcadores radiactivos en el campo de los inmunoensayos. De hecho, la detección fluorométrica es una técnica extremadamente sensible, de manera que un compuesto fluorescente puede ser excitado más de 200.000 veces en un segun-

do y producir aproximadamente el mismo número de fotones emitidos.

Sin embargo, los fluoroinmunoensayos de compuestos biológicos estuvieron durante mucho tiempo limitados por el background o fluorescencia residual producida por la unión no específica de los compuestos fluorescentes a determinados componentes del ensayo o el equipo, tales como los propios anticuerpos, plásticos, lentes, espejos...etc. Era evidente pues, que para que la fluorimetría pudiera sustituir el conteo radiactivo, la señal específica tenía que ser separada de las interferencias de fondo o bien ser ampliada varios órdenes de magnitud. Una de las alternativas más exitosas para solventar el problema fue el desarrollo de la **fluorimetría en tiempo retardado (TRF)**. En este sistema la señal se distingue del background resi-

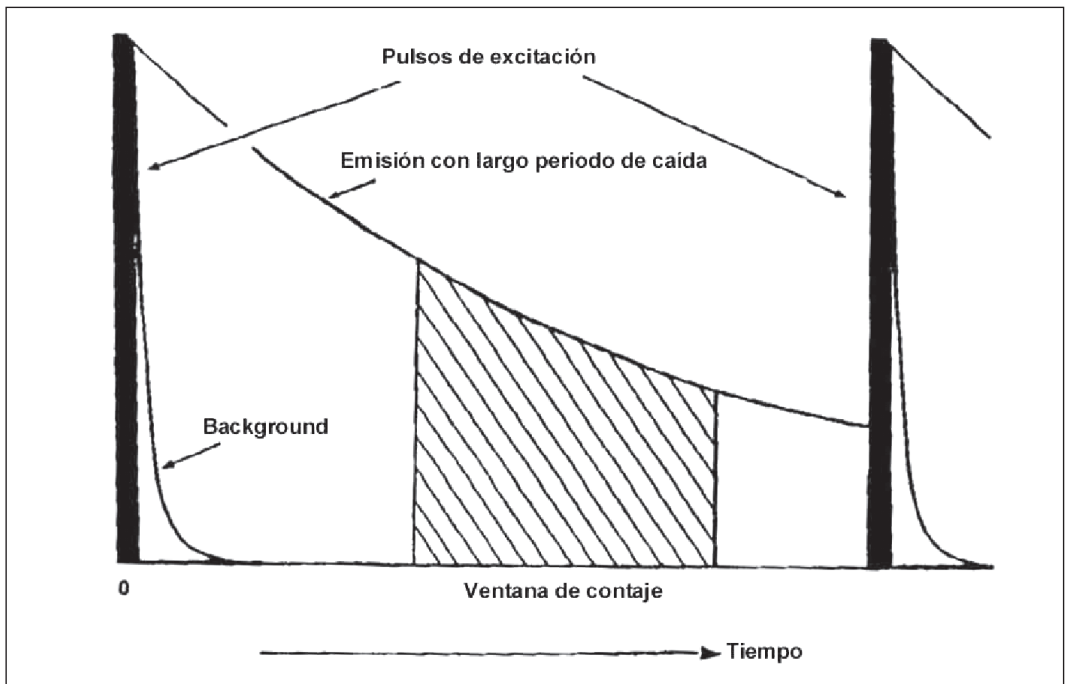


Figura 1: Principio de la fluorimetría en tiempo retardado. Las barras negras verticales representan pulsos de excitación de la sonda fluorescente. Tras el primer pulso se produce un espectro de emisión con largo periodo de caída; también se puede apreciar que la ventana de contaje queda retrasada con respecto a dicho pulso para evitar así el background.

dual por resolución temporal, es decir, la fluorescencia no es medida inmediatamente después de la excitación del compuesto fluorescente, sino que se deja pasar un cierto tiempo (400 microsegundos en el caso de compuestos marcados con europio) que permite excluir el background de corta duración (Figura 1).

2. LANTÁNIDOS COMO MARCADORES.

Para un uso práctico, los marcadores fluorescentes empleados deben tener un tiempo de estado excitado en el rango de 10 microsegundos a 10 milisegundos. Aparte de algunos compuestos fosforescentes como las metaloporfirinas, sólo los quelatos de lantánidos, fundamentalmente los de europio (III) (Eu^{3+}), terbio(III) (Tb^{3+}), samario(III) (Sm^{3+}) y diprosio(III) (Dy^{3+}), muestran una emisión de larga duración, que hace de ellos los candidatos ideales para los inmunoensayos fluorométricos en tiempo retardado (Hemmilä et al., 1995).

Los lantánidos son elementos situados en la parte más baja de la tabla periódica de los elementos y deben usarse asociados a **quelatos**, que son moléculas orgánicas en las que se pueden diferenciar tres partes (Figura 2), cada una

de ellas con una función específica. Dichas funciones son:

1. *Unión lantánido-molécula.* Disponen de un grupo reactivo ($\text{S}=\text{C}=\text{N}-$) que se une a los grupos $-\text{NH}_2$ de las proteínas y posibilita la unión de los iones de lantánidos a la biomolécula que va a ser marcada (anticuerpo, hapteno).
2. *Transferencia de energía al lantánido.* Presentan una región que tiene como función absorber la luz de excitación siendo capaces de transferir energía al ión del lantánido en cuestión, el cual producirá un espectro de emisión específico.
3. *Protección del lantánido.* Constan de una serie de grupos quelantes que actúan protegiendo al ión en soluciones acuosas, ya que éstas debilitan su fluorescencia.

Uno de los grupos de quelatos más ampliamente utilizados en los inmunoensayos basados en fluorometría en tiempo retardado han sido los derivados de poliaminocarboxilatos, como el EDTA (ácido etilendiaminatetraacético), DTTA (ácido dietilelntriaminatetraacético) o DTPA (ácido dietilelntriamina-pentacético)

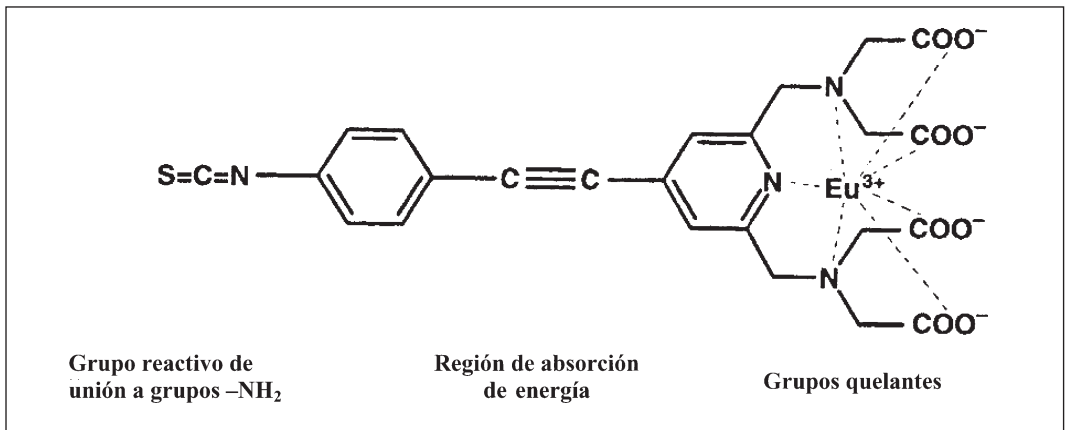


Figura 2. Representación esquemática de un quelato de lantánido que podría ser utilizado como marcador en un ensayo de bioafinidad.

Cuadro 1: Comparación de la sensibilidad de las técnicas ELISA y TRF en la determinación de distintos compuestos biológicos

Ensayo	Sensibilidad TRF	Sensibilidad ELISA
<i>Francisella tularensis</i>	8 pg/ml 48 CFU/ml	16 ng/ml 9,4 x 10 ⁴ CFU/ml
Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i>	10 pg/ml 2,2 x 10 ⁸ moléculas/ml	30,5 pg/ml 6,6 x 10 ⁸ moléculas/ml
Toxina botulínica A	200 pg/ml 2,4 x 10 ⁸ moléculas /ml	4 ng/ml 4,8 x 10 ⁹ moléculas/ml

Cuadro 2: Componentes y propiedades de la solución intensificadora DELFIA

COMPONENTE	PROPIEDADES
Tampón acidificado	Disocia los iones de los quelatos, pero permite la formación de nuevos quelatos.
β-NTA	Quelato que absorbe la energía de excitación y la transfiere al ión de europio.
TOPO	Mejora el movimiento de los quelatos dentro de las micelas, intensifica la fluorescencia y prolonga su duración.
Triton X-100	Solubiliza los compuestos formados y proporciona condiciones óptimas para la fluorescencia.

(Mukkala et al., 1989). Otros grupos de quelatos de lantánidos son los criptatos (comercializados por CIS-Bio International y Packard Instruments), la terpiridina, el 4,7-bis (clorosulfonil)-1,10-phenanthroline-2,9-ácido dicarboxílico (BCPDA) (de CyberFluor Inc, Toronto, Canada) y LANCE (comercializado por Perkin Elmer) (Selvin, 2002).

3. VENTAJAS SOBRE MÉTODOS TRADICIONALES

Diversos autores como Adlercreutz et al. (1998) o Lövgren y Peterson, (2000) han señala-

do que la fluorometría en tiempo retardado ofrece numerosas ventajas sobre métodos tradicionales entre las que se incluyen:

1. *Alta sensibilidad.* En general la característica más relevante de esta metodología es la elevada sensibilidad que proporciona en comparación con otras técnicas como el radioinmunoensayo o el enzimoimmunoensayo. De hecho, esta propiedad ha sido destacada por numerosos autores (McNair et al., 1995; Yuan et al., 1997), y algunos hablan incluso de técnica supersensible (Soukka et al., 2001) o ultrasensible (Tarkkinen et al.,

2002). Su gran sensibilidad hace que sea una herramienta eficaz en la determinación de compuestos que se encuentran en pequeñas concentraciones en diferentes fluidos orgánicos tales como orina, saliva o líquido cefalorraquídeo; incluso puede ser empleada en el seguimiento de sustancias secretadas por cultivos celulares (Kropf et al., 1991). En el cuadro 1 se compara la sensibilidad de las técnicas ELISA y fluorometría en tiempo retardado en la determinación de distintos compuestos biológicos (Peruski et al., 2002).

2. *Estabilidad de reactivos.* Los reactivos tienen una vida media larga, lo que supone una ventaja de la fluorometría sobre el radioinmunoanálisis, cuyos reactivos presentan una vida limitada.
3. *Carencia de efectos nocivos por radiación.* El radioinmunoensayo constituye un peligro potencial debido a la radiación y requiere laboratorios especiales, por lo que hay ciertas limitaciones para su utilización; sin embargo, la fluorometría está exenta de estos caracteres negativos.
4. *Posibilidad de automatización.* Los ensayos desarrollados recientemente han hecho posible que el usuario sólo necesite identificar y colocar la muestra en los sistemas automáticos para comenzar el proceso de medida. El aparato se hace cargo de todo lo demás, por lo que no es necesario un personal entrenado y especializado.
5. *Posibilidad de medir analitos en sangre entera.* Los últimos quelatos de lantánidos producidos han permitido el análisis de muestras de sangre entera, además de las convencionales de suero y plasma, con el consiguiente ahorro de tiempo a la hora de procesar las muestras. Estos quelatos tampoco se ven afectados por las interferencias causadas por hemólisis, lo que constituye un gran avance para la cuantificación de determinados compuestos como la haptoglobina, cuyo método de análisis tradi-

cional no permitía el empleo de muestras hemolíticas.

6. *Determinación simultánea de varios compuestos.* Ésta ha sido posible gracias a que los quelatos de lantánidos presentan picos de fluorescencia a longitudes de onda bien diferenciadas. Normalmente se emplean combinaciones de dos lantánidos, fundamentalmente europio y samario (Aggerbeck et al., 1996; Barnard y Kohen, 1998; Matsumoto et al., 1999; Kimura et al., 2000), aunque también se ha empleado el combinado europio-terbio (Eriksson et al., 2000) e incluso se han realizado ensayos con cuatro marcadores: Eu^{3+} , Tb^{3+} , Sm^{3+} , Dy^{3+} (Xu et al., 1992). Las ventajas conseguidas con este tipo de ensayo incluyen:
 - ahorro de tiempo, reactivos y trabajo.
 - reducción de costes globales.
 - empleo de muestras de volumen limitado, muy interesante en neonatos o en animales de pequeño tamaño.
7. *Amplio rango de ensayo.* Se han obtenido ensayos que permiten medir concentraciones desde microgramos a miligramos (Tarkinen et al., 2002).

4. INMUNOENSAYOS BASADOS EN FLUOROMETRÍA EN TIEMPO RETARDADO

Tradicionalmente los inmunoensayos estaban basados en el marcaje de antígenos o anticuerpos con isótopos radioactivos, en el caso del radioinmunoensayo (RIA) o con enzimas, en el sistema de detección conocido como ELISA.

En el fluoroinmunoensayo en tiempo retardado antígenos, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos (Eriksson et al., 2000) son marcados con quelatos de lantánidos, que bien desarrollan fluorescencia gracias a una solución intensificadora o bien presentan fluorescencia intrínseca estable, sin la necesidad de ninguna intensificación (Pettersson et al., 2000).

Todos los inmunoensayos que emplean fluorimetría en tiempo retardado se pueden dividir en dos grandes grupos:

- *competitivos*, basados en el marcaje de antígenos, normalmente de pequeño tamaño, que en el caso de la fluorimetría en tiempo retardado se denominan fluoroinmunoensayos propiamente dichos y abreviadamente se conocen con las siglas **TR-FIA** (Figura 3).
- *no competitivos o tipo sándwich*, basados en el marcaje de anticuerpos en lugar de antígenos y a los que nos referimos como ensayos inmunofluorométricos o **TR-IFMA** (Figura 4), son los ensayos de elección para antígenos de gran tamaño. Pueden ser varias órdenes de magnitud más sensibles que los ensayos competitivos y se caracterizan por una especificidad elevada, optimización de ensayo simple y rango de ensayo amplio.

4.1. Fluoroinmunoensayos comercializados.

A pesar de las últimas novedades surgidas en el campo de los fluoroinmunoensayos en tiempo retardado, podemos simplificar y dividir los sistemas disponibles a nivel comercial en dos grandes grupos (Degan et al., 1999):

1. El primer sistema, **DELFI**A engloba inmunoensayos basados en el principio de «intensificación disociativa de la fluorescencia» y en fluorimetría en tiempo retardado, siendo el europio el marcador de elección (Morton y Diamandis, 1990) y un derivado del EDTA o el ácido N¹-(p-isotiocianatobencil)-dietilelenti-*am*ina-N¹,N²,N³,N⁴-tetracético, los quelatos más empleados en esta metodología. Dichos quelatos dan lugar a complejos no-luminosos con Eu³⁺, que se emplean para marcar antígenos o anticuerpos. Una vez finaliza la reacción antígeno-anticuerpo se añade una solución intensificadora (Cuadro 2) que es capaz de liberar los iones de Eu³⁺ al medio acuoso. Por otra parte, ciertos

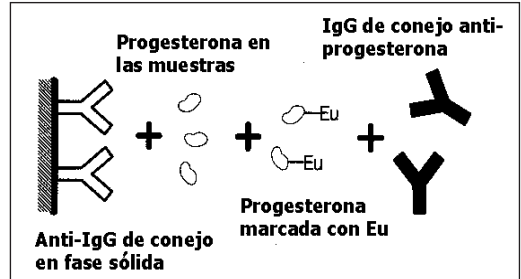


Figura 3: Ejemplo de un ensayo competitivo para progesterona.

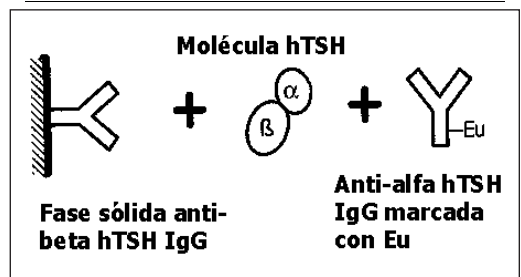


Figura 4: Ejemplo de un ensayo no competitivo para TSH humana.

componentes de la solución, entre los que se incluye un segundo quelato (β -NTA), son responsables de la formación de nuevos complejos altamente fluorescentes y de la creación de un ambiente micelar que protege a los iones de europio del ambiente acuoso y posibilita el desarrollo de la fluorescencia (Hemmilä y Harju, 1995).

El único inconveniente del sistema descrito es que es vulnerable a la contaminación exógena por europio procedente de material de laboratorio contaminado (Ci et al., 1995) y también presenta un background elevado debido al exceso de β -NTA libre en la solución final (Yuan et al., 1998).

2. El segundo sistema, **CyberFluor Inc**, emplea un quelato diferente, el BCPDA, que es capaz de absorber y transmitir energía lumino-

sa al ión de Eu^{3+} y el estreptavidin (SA) marcado, que es el reactivo de detección universal junto a anticuerpos biotinilados (Morton y Diamandis, 1990; Scorilas et al., 2000). La fotoluminiscencia es medida en fase sólida, una vez que los pocillos han sido secados mediante aire a presión, por lo que el background es menor que en el sistema anterior, ya que no hay exceso de ligando en solución. Sin embargo, la fluorescencia del marcador es mucho más débil (Yuan et al., 1998).

3. También podemos encontrar inmunoensayos que emplean una combinación de los dos sistemas tradicionales, como es el de Kropf et al., (1991), primariamente basado en el método de CyberFluor pero con medición de la fluorescencia en solución, análogamente al sistema DELFIA.

4.2. Fluoroimmunoensayos según el soporte

Tradicionalmente todos los inmunoensayos basados en fluorometría en tiempo retardado son llevados a cabo en una configuración similar al ELISA, de manera que se emplean **placas de microtitulación** recubiertas y todas las operaciones son realizadas en el mismo soporte, incluyendo la medición final de la fluorescencia (Figura 5).

Dentro de los ensayos en placa hay que destacar la creación de los denominados inmunoensayos de un sólo paso, todo en uno, de química seca (Lövgren et al., 1996). Estos ensayos contienen todos los reactivos necesarios (anticuerpos de captura y anticuerpos o haptenos marcados con quelatos de lantánidos) en forma seca, de forma que para comenzar el inmunoensayo sólo se necesita añadir la muestra y un tampón (Figura 6).

Recientemente se ha desarrollado un nuevo sistema denominado Innotrac Aio! (all-in-one) que emplea una especie de **lápiz que contiene pocillos**, similares a los de las placas, de forma superpuesta (Pettersson et al., 2000) y permite



Figura 5: **Placas de microtitulación empleadas rutinariamente en inmunoensayos basados en fluorometría en tiempo retardado.**

una automatización completa del análisis de muestras (Figura 7).

Otro tipo de soporte opcional a los pocillos o tiras de microtitulación son las **micropartículas** (Figura 8), que han posibilitado el desarrollo de ensayos de bioafinidad cuantitativos en un formato miniaturizado. Estos ensayos se caracterizan por ser extremadamente sensibles, y con gran probabilidad permitirán la fabricación de ensayos múltiples para la determinación simultánea de distintos analitos, ya que es posible identificar de forma individual micropartículas específicas frente a un analito en concreto (Lövgren et al., 1997; Tarkkinen et al., 2002).

5. FLUORÍMETROS

El examen visual de muestras marcadas con reactivos fluorescentes se venía realizando con microscopios de fluorescencia, proporcionando unos resultados semi-cuantitativos y subjetivos. La necesidad de determinar la fluorescencia de forma cuantitativa, con elevada sensibilidad y reproducibilidad, llevó a la creación de sistemas de detección luminosos capaces de registrar la fluorescencia específica con elevada resolución: los fluorímetros (Figura 9). Dichos instrumentos básicamente constan de una lámpara flash de xenón UV (también puede ser láser) que pro-

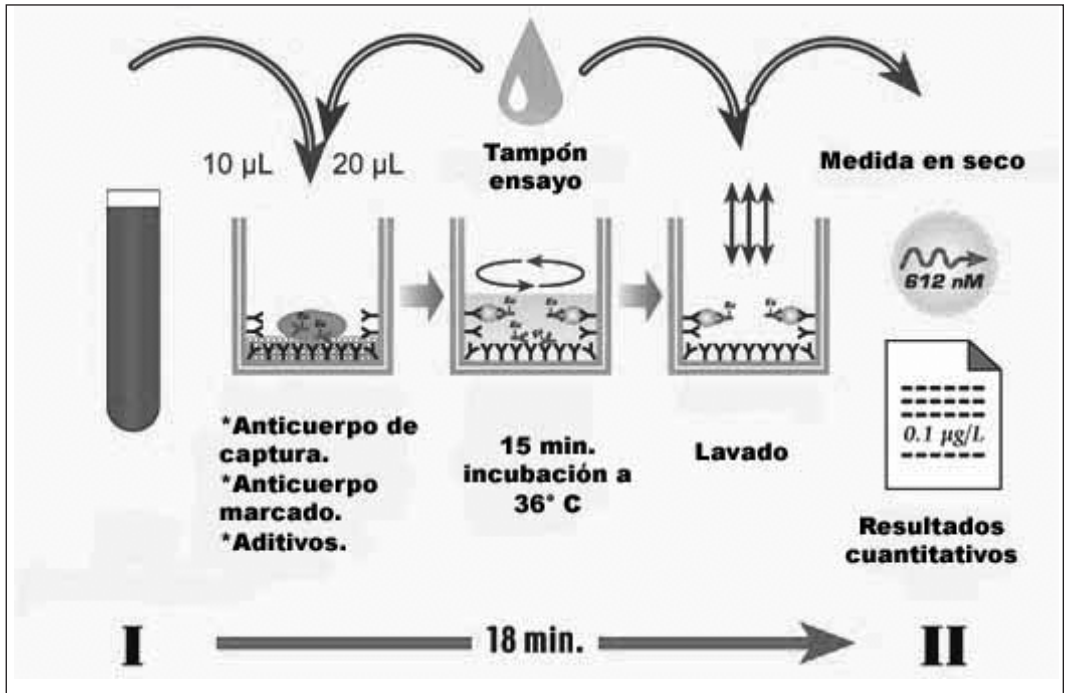


Figura 6: Representación esquemática del funcionamiento del sistema Aio.



Figura 7: Reactivos empleados en el formato AIO, que incluye lápices que contienen pocillos con todos los reactivos en forma seca.

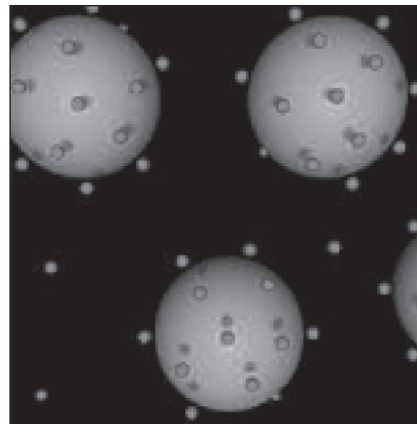


Figura 8: Micropartículas empleadas en fluorimetría en tiempo retardado.

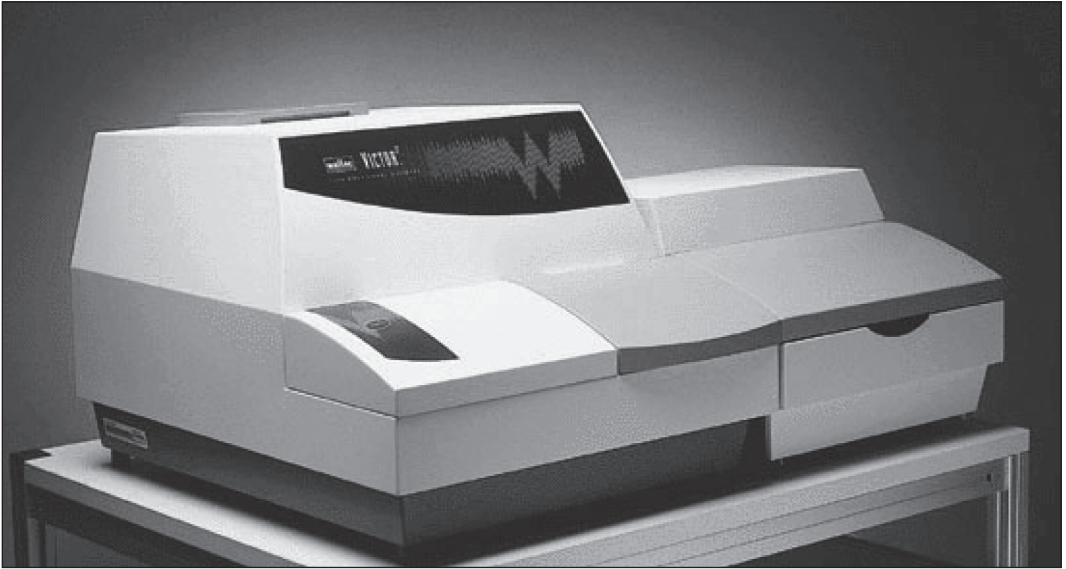


Figura 9: **Fluorímetro VICTOR 1420 (PerkinElmer Lifesciences, Wallac Oy; Turku, Finlandia).**

duce una luz de excitación la cual pasa a través de un filtro. Esta luz es dirigida mediante un sistema de lentes y espejos a la muestra contenida en un pocillo, excitando al lantánido de la misma. La excitación conlleva la emisión de luz que a través de otra serie de lentes y filtros llegará a un fotomultiplicador que realizará la lectura.

6. APLICACIONES PRÁCTICAS

La fluorimetría en tiempo retardado es una técnica de actualidad que está proporcionando excelentes resultados en la determinación de numerosos compuestos tanto en medicina humana como veterinaria, entre los que destacan (Figura 10):

1. Hormonas, tales como: cortisol (Diamandis et al., 1988), tiroxina (Papanastasiou-Diamandis et al., 1989), LH y FSH (Menjívar et al., 1993), insulina (Storch et al., 1993), hCG

(Stenman et al., 1994) o 21-deoxicortisol (Fiet et al., 2000), todas ellas en medicina humana. Por otra parte, la fluorimetría se ha aplicado en el campo de la veterinaria para medir androstenona porcina (Tuomola et al., 1997), cortisol bovino (Erkens et al., 1998) y cortisol y tiroxina libre canina (Parra et al., 2004).

El análisis de algunos de estos compuestos es de gran utilidad en el diagnóstico de numerosas endocrinopatías, tales como el hipoadrenocorticismo, síndrome de Cushing o el hipotiroidismo.

2. Proteínas de fase aguda, entre las que se incluyen la haptoglobina bovina (McNair et al., 1995, 1997) o la proteína C-reactiva humana (Tarkkinen et al., 2002), con un ensayo que permite la medición de la proteína en tan sólo 2 minutos. Estas proteínas de fase aguda son marcadores de inflamación o daño tisular y están siendo ampliamente utilizadas para el diagnóstico, así como para la

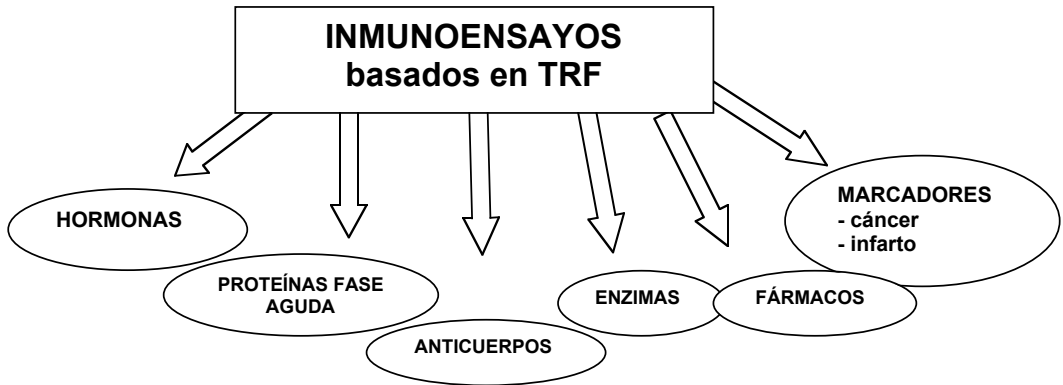


Figura 10: Aplicaciones de la fluorimetría en tiempo retardado en inmunoensayos para la detección de diversos compuestos.

monitorización y evaluación de la respuesta al tratamiento de diversas enfermedades (Martínez-Subiela et al., 2002).

3. **Marcadores tumorales.** El análisis de distintos compuestos como la enterolactona (Adlercreutz et al., 1998), los fitoestrógenos (Uehara et al., 2000) o el antígeno prostático específico (PSA) (Soukka et al., 2001) es otra de las aplicaciones de esta metodología en medicina humana.
4. **Marcadores de infarto de miocardio.** Los últimos avances se centran en el desarrollo de ensayos rápidos y ultrasensibles como el desarrollado por Pettersson et al., (2000) para la determinación de mioglobina, creatín quinasa y troponina en 15 minutos.
5. **Anticuerpos.** La fluorimetría en tiempo retardado se ha empleado igualmente para la detección de anticuerpos de la difteria y el tétanos (Aggerbeck et al., 1996), inmunoglobulinas E, relacionadas con varias alergias (Yuan et al., 1997), IgGs frente a *Chlamydia pneumoniae* (Wong et al., 1999), anticuerpos frente a la rubeola (Maple y Jones 2002) o anticuerpos frente a agentes infecciosos como *Francisella tularensis*, neurotoxina A/B de *Clostridium botulinum* y enterotoxina

B de *Staphylococcus aureus* (Peruski et al., 2002).

6. **Otros compuestos,** como la proteína plasmática A asociada a la preñez que permite descartar síndrome de Down (Qin et al., 1997), determinados fármacos (Kimura et al., 2000) o enzimas como la creatín quinasa porcina (Tuomola et al., 2002) también han sido cuantificados mediante TRF.

CONCLUSIÓN

La fluorimetría en tiempo retardado es una tecnología con un futuro prometedor. Actualmente existen numerosas líneas de investigación que buscan la creación de inmunoensayos ultrasensibles, rápidos y totalmente automatizados basados en esta metodología. Probablemente el gran interés que suscita esta sistema en medicina humana, pronto se verá reflejado en numerosas aplicaciones veterinarias tanto en el campo de pequeños como grandes animales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggerbeck H., Norgaard-Pedersen B., Heron, I. 1996. Simultaneous quantitation of diphthe-

- ria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J. Immunol. Methods* 190: 171-183.
- Adlercreutz H., Wang G.J., Lapcik O., Hampl R., Wähälä K., Mäkelä T., Lusa K., Talme M., Mikola H. 1998. Time-resolved Fluoroimmunoassay for plasma Enterolactone. *Anal. Biochem.* 265: 208-215.
- Barnard G., Kohen F. 1998. Monitoring ovarian function by the simultaneous time-resolved fluorescence immunoassay of two urinary steroid metabolites. *Clin. Chem.* 44: 1520-1528.
- Ci Y., Yang X., Chang W. 1995. Fluorescence labelling with europium chelate of b-diketones and application in time-resolved fluoroimmunoassays (TR-FIA). *J. Immunol. Methods* 179: 233-241.
- Degan P., Podesta A., Montagnoli G. 1999. Time-resolved fluoro- immunoassay. *Mol. Biotechnol.* 13: 215-22.
- Diamandis E.P., Bhayana V., Conway K., Reichstein E., Papanastasiou-Diamandis A. 1988. Time-Resolved Fluoroimmunoassay of Cortisol in Serum with a Europium Chelate as Label. *Clin. Biochem.* 21: 291-296.
- Eriksson S., Vehniäinen M., Jansen T., Meretoja V., Saviranta P., Pettersson K., Lövgren T. 2000. Dual-label time-resolved immunofluorometric assay of free and total prostate-specific antigen based on recombinant Fab fragments. *Clin. Chem.* 46: 658-666.
- Erkens J.H.F., Dieleman S.J., Dressendörfer R.A., Strasburger C.J. 1998. A Time-resolved Fluoroimmunoassay for Cortisol in Unextracted Bovine Plasma or Serum with Optimized Procedures to Eliminate Steroid Binding Protein Interference and to Minimize Non-specific Streptavidin-europium Binding. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 67: 153-161.
- Fiet J., Boudi A., Giton F., Villette J.M., Boudu Ph., Soliman H., Morineau G., Galons H. 2000. Plasma 21-deoxycortisol: comparison of a time-resolved fluoroimmunoassay using a biotinylated tracer with a radioimmunoassay using ¹²⁵Iodine. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 72: 55-60.
- Hemmilä I., Harju R. 1995. Time-resolved Fluorometry. En: *Bioanalytical applications of labelling technologies*, pp. 83-119. Eds. Hemmilä I., Stahlberg T., Mottran P. Turku.
- Kimura H., Mukaida M., Wang G., Yuan J., Matsumoto K. 2000. Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay of psychopharmaceuticals and stimulants in serum. *Forensic Sci. Int.* 113: 345-351.
- Kroft J., Quitte E., Gressner A.M. 1991. Time-resolved immunofluorometric assays with measurement of a europium chelate in solution: application for sensitive determination of fibronectin. *Anal. Biochem.* 197: 258-265.
- Lövgren T., Pettersson P. 2000. Time-resolved fluoroimmunoassay, advantages and limitations. En: *Luminescence immunoassay and molecular applications*, pp. 233-253. Eds. Van Dyke K., Van Dyke R. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Lövgren T., Merio L., Mitrunen K., Makinen M., Makela M., Blomberg K., Palenius T., Pettersson K. 1996. One-step all-in-one dry reagent immunoassays with fluorescent europium chelate label and time-resolved fluorometry. *Clin. Chem.* 42: 1196-1201.
- Lövgren T., Heinonen P., Lehtinen P., Hakala H., Heinola J., Hatju R., Takalo H., Mukkala V., Schmid R., Lönnberg H., Pettersson K., Iitiä A. 1997. Sensitive bioaffinity assays with individual microparticles and time-resolved fluorometry. *Clin. Chem.* 43: 1937-1943.
- Maple P.A.C., Jones C.S. 2002. Time-resolved fluorometric immunoassay for rubella antibody- a useful method for serosurveillance studies. *Vaccine* 20: 1378-1382.
- Martínez-Subiela S., Tecles F., Eckersall P.D., Cerón J.J. 2002. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 150: 241-244.

- Matsumoto K., Yuan J., Wang G., Kimura H. 1999. Simultaneous Determination of α -Feto-protein and Carcinoembryonic Antigen in Human Serum by Time-Resolved Fluoroimmunoassay. *Anal. Biochem.* 276: 81-87.
- McNair J., Elliott C.T., Mackie D.P. 1995. Development of a sensitive and specific time resolved fluorimetric immunoassay for the bovine acute phase protein haptoglobin (Hp). *J. Immunol. Methods* 184, 199-205.
- McNair J., Kennedy D.G., Bryson D.G., Reilly G.A.C., McDowell S.W.J., Mackie D.P. 1997. Evaluation of a competitive immunoassay for the detection of bovine haptoglobin. *Res. Vet. Sci.* 63: 145-149.
- Menjívar M., Ortiz G., Cárdenas M., Garza-Flores J. 1993. Comparación de los métodos DELFIA y RIA en la medición de las hormonas luteinizante y foliculo estimulante en suero. *Rev. Invest. Clin.* 45: 579-584.
- Morton R.C., Diamandis E.P. 1990. Streptavidin-based macromolecular complex labeled with a europium chelator suitable for Time-resolved fluorescence immunoassay applications. *Anal. Chem.* 62: 1841-1845.
- Mukkala V., Mikola H., Hemmilä I. 1989. The synthesis and use of activated N-enzyl derivatives of diethylenetriaminetetraacetic acids: alternative reagents for labelling antibodies with metal ions. *Anal. Biochem.* 176: 319-325.
- Ogine T., Kohsaka T., Taya K. 1999. Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of porcine relaxin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 170: 276-280.
- Papanastasiou-Diamandis A., Bhayana V., Diamandis E.P. 1989. A simple time-resolved fluoroimmunoassay of total thyroxine in serum. *Ann. Clin. Biochem.* 26: 238-243.
- Parra M.D., Bernal L.J., Cerón J.J. (2004). Cortisol and free thyroxine determination by Time-resolved fluorometry in canine serum. *Can. J. Vet. Res.* 68: 98-104.
- Peruski A.H., Johnson L.H., Peruski L.F. 2002. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J. Immunol. Methods* 263: 35-41.
- Pettersson K., Katajämä T., Irjala K., Leppänen V., Majamaa-Voltii K., Laitinen P. 2000. Time-resolved fluorometry (TRF)-based immunoassay concept for rapid and quantitative determination of biochemical myocardial infarction markers from whole blood, serum and plasma. *Luminescence* 15: 399-407.
- Qin Q., Christiansen M., Oxvig C., Pettersson K., Sottrup-Jensen L., Koch C., Norgaard-Pedersen B. 1997. Double-monoclonal immunofluorometric assays for pregnancy-associated plasma protein A/proeosinophil major basic protein (PAPP-A/promBP) complex in first-trimester maternal serum screening for Down syndrome. *Clin. Chem.* 43: 2323-2332.
- Scorilas A., Bjartell A., Lilja H., Moller C., Diamandis E.P. 2000. Streptavidin-polyvinylamine conjugates labeled with europium chelate: applications in immunoassay, immunohistochemistry, and microarrays. *Clin. Chem.* 46: 1450-1455.
- Selvin P.R. 2002. Principles and Biophysical Applications of Lanthanide-Based Probes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31: 275-302.
- Soukka T., Paukkunen J., Harma H., Lonnberg S., Lindroos H., Lövgren T. 2001. Super-sensitive time-resolved immunofluorometric assay of free prostate-specific antigen with nanoparticle label technology. *Clin. Chem.* 47: 1269-1278.
- Storch M.J., Marbach P., Kerp L. 1993. A time-resolved fluoroimmunoassay for human insulin based on two monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* 157: 197-201.
- Stenman J., Alfthan H., Stenman U. 1994. Streptavidin-biotin based time-resolved immunofluorometric assay for direct measurement of high concentrations of human chorionic gonadotropin (hCG). *J. Immunol. Methods* 175: 161-167.

- Tarkkinen P., Palenius T., Lövgren T. 2002. Ultrarapid, Ultrasensitive One-Step Kinetic Immunoassay for C-Reactive Protein (CRP) in Whole Blood Samples: Measurement of the Entire CRP Concentration Range with a Single Sample Dilution. *Clin. Chem.* 48, 269-277.
- Tuomola M., HarpioA R., Knuuttila P., Mikola H., Lövgren T. 1997. Time-Resolved Fluoroimmunoassay for the Measurement of Androstenone in Porcine Serum and Fat Samples. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3529-3534.
- Tuomola M., Vainio J., Lövgren T. 2002. Rapid Time-Resolved Immunofluorometric Assay for the Measurement of Creatine Kinase in Serum and Whole blood samples. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6659-6662.
- Uehara M., Lapcik O., Hampl R., Al-Maharik N., Makela T., Wähälä K., Mikola H., Adlercreutz H. 2000. Rapid aalysis of phytoestrogens in human urine by time-resolved fluoroimmunoassay. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 72: 273-282.
- Wong Y.K., Sueur J.M., Fall C.H., Orfila J., Ward M.E. 1999. The species specificity of thr microimmunofluorescence antibody test and comparisons with a time resolved fluorescent immunoassay for measuring IgG antibodies against *Chlamydia pneumoniae*. *J. Cli. Pathol.* 52: 99-102.
- Xu Y.Y., Pettersson K., Blomberg K., Hemmilä I., Mikola H., Lövgren T. 1992. Simultaneous quadruple-label fluorometric immunoassay of thyroid-stimulating hormone, 17 alpha-hydroxyprogesterone, immunoreactive trypsin, and creatine kinase MM isoenzyme in dried blood spots. *Clin. Chem.* 38: 2038-2043.
- Yuan J., Wang G., Kimura H., Matsumoto K. 1997. Highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay of human immunoglobulin E by using a new europium fluorescent chelate as a label. *Anal. Biochem.* 254: 283-287.
- Yuan J., Matsumoto K., Kimura H. 1998. A new tetradentate b-diketone-europium chelate that can be covalently bound to proteins for time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal. Chem.* 70: 596-601.

