

## İMMUNOLOJİK YÖNTEMLER VE ZAMAN AYIRIMLI FLUORESANS TEKNİĞİ

### IMMUNOASSAYS AND TIME - RESOLVED FLUORIMETRY

Huriye KARŞILAYAN \*

---

#### SUMMARY

Immunological methods have been widely used in clinical chemistry because of their sensitivity, specificity and practicability. Methods used for counting have been determined by the labels bound to immunoreactants. Radioisotopically labeled antigens and antibodies were widely applied in this field. Although radioisotopic methods extremely sensitive and quite precise, alternative methods used enzymes, luminescent compounds, fluorescent probes as labels have been introduced. In recent years, the development of time - resolved fluorescence detection method by the use of Lanthanide chelates as labels in immunoassays has opened new possibilities given more sensitive results for the determination of biological substances.

#### ÖZET

İmmunolojik yöntemler, duyarlı, spesifik ve pratik olmaları nedeniyle klinik kimyada yaygın olarak kullanılır. Sözü geçen metodlar immünreaktife bağlanan işaretleyici maddeler tarafından belirlenir. Bu alanda radyoizotoplarla işaretli antijen ve antikorlar yaygın olarak uygulanmıştır. Ancak fazlasıyla duyarlı radyoizotopik yöntemlerin olumsuz yanları da vardır. Bu nedenle enzimler, lüminesans ve fluoresans veren maddelerin işaretleyici olarak kullanıldığı alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Son yıllarda, işaretleyici olarak lantanid çelatlarnın kullanılması ile birlikte zaman ayırmalı fluoresans ölçüm şeklinin geliştirilmesi, biyolojik madde tayininde daha hassas sonuç veren yeni olasılıklara yol açmıştır.

---

#### GİRİŞ

Günümüzde immunolojik yöntemler çok düşük konsantrasyonlarda da biyolojik aktif madde tayinlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Spesifik, duyarlı ve pratik olan bu yöntemler hormon, mikroorganizma, antikor, enzim, ilaç gibi maddelerin tayini ile klinik kimyasında yer almaktadırlar ( 1 - 2 ).

Antikor ve antijenlerin birbirlerine bağlanarak konjugatlar oluşturmasına dayanan immunolojik yöntemler ile ilgili çalışmalar oldukça eski tarihlere kadar uzanmaktadır. Gözlenebilir antikor - antijen konjugat çökeltilerinin oluşması 1897 'de Krause tarafından verilmiştir. 1929 da Haidelberger ve 1945 te Kendall çöktürme esaslı antijen ve antikor tayin yöntemleri geliştirmişlerdir. Yirminci yüzyıl başlarında kırmızı kan hücreleri ile antikor veya antijenlerin işaretlendiği uygulamalar konu olmuştur. Bu işlemi esas alan ve 1945 te Coombs tarafından geliştirilen Hemagglunasyon yöntemleri uzun süre uygulanmıştır (3).

Belirli maddeler ile antijen veya antikorların işaretlenmesi ve bunların özelliklerine bağlı olarak ölçüm tekniklerinin geliştirilmesiyle birlikte immunolojik yöntemlerin önemi artmıştır. Radyoizotop işaretleyici kullanarak 1960 ta Yalow ve Berson insülin tayini, Ekins tiroksin tayini için geliştirdikleri yöntemlerle bu alanda öncülük etmişlerdir. (4 - 5).

Uygulamada uzun süre yer alan radyoizotop işaretleyiciler  $10^{-12}$  -  $10^{-15}$  M konsantrasyonda madde tayinine olanak sağlamışlardır. Ancak bunların yayınladıkları ışınların çalışan personelin sağlığını olumsuz etkilemesi, artıklarının çevreye zarar vermeyecek şekilde depolanma gereği, yarılanma ömürlerine bağlı olarak kitlerinin kullanılma sürelerinin kısıtlı olması alternatif yöntemleri geliştirilmesine sebep olmuştur. Başlıca enzimler, metal iyonları ve fluoresans veren maddeler yeni yöntemlerde işaretleyici olarak kullanılmışlardır (6 - 8).

İmunolojik yöntemlerde işaretleyici maddelerin kullanılmasıyla birlikte, reaksiyon ortamında oluşan antijen - antikor konjugatlarının bir katı madde yüzeyine absorpsiyonla bağlanması konu olmuştur. Katı madde olarak polimer maddelerden yapılan tüpler, küreler ve mikrotitrasyon hücreleri uygulamada yer almıştır. Reaksiyon sonrasında bağlanmadan kalan antijen, antikor veya işaretleyici madde fazlası santrifüj ya da yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır (29).

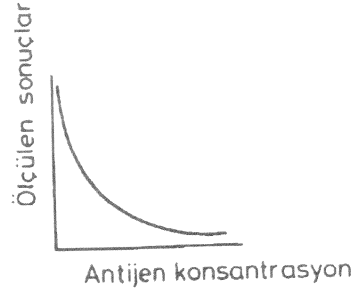
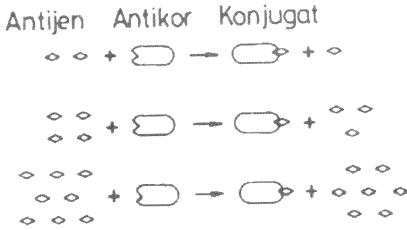
### **Sınıflandırma**

İmunolojik yöntemler, antijen ve antikoron reaksiyon ortamındaki miktarlarının oranına, işaretleyici madde türüne ve bunların sundukları ölçüm şekline bağlı olarak çeşitli gruplara ayrılabilir. Kullanılan antikoron oranına göre iki grupta inceleme yapılır.

#### **1. Sınırlı reaktif yöntemi**

Reaksiyon ortamında sınırlı miktar antikor ve antijen fazlası yer almaktadır. Antijenlerin antikora bağlanmak üzere yarışmasıyla gerçekleşen reaksiyon dengeye ulaştığında, serbest kalan antijenler uzaklaştırılır ( şekil 1).

İşlemden standartlara veya örneklere, belirli ve aynı miktar işaretli antijen ilave edilir. Doğal olarak, ortamda antijen miktarının artmasıyla, antikora bağlanan işaretli antijen - antikor konjugat miktarını esas alan ölçüm sonuçları, bağlanan antijen miktarının bağlanma oranını yansıtacaktır. Bu nedenle, uygulanan yöntemle okunan değerler, örnekteki antijen miktarıyla ters orantılı olacaktır ( şekil 2 ). Kullanılan işaretleyici türüne göre bu yöntemler RIA, EIA ve FIA kısaltılmış ifadeleri ile bilinmektedirler:\*( 3 - 9).



Şekil - 1 : Antikor konsantrasyonu sabit alınan immunolojik yöntemlerde konsantrasyona bağlı olarak serbest kalan antijen miktarının artması

Şekil - 2 : Sınırlı reaktif yönteminde ölçü eğrisi

## 2. Fazla reaktif yöntemi

Fluoresans veren madde ile işaretlenen antikor kullanılmasıyla birlikte yöntemin uygulanması 1941 yılına kadar uzanır. (1).

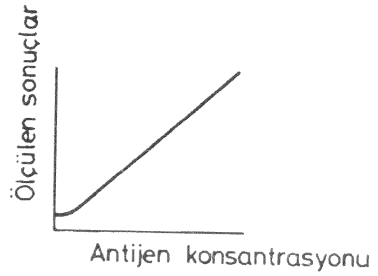
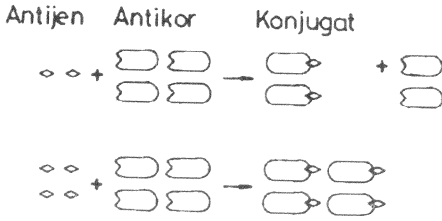
\* RIA : Radioimmunoassay

EIA : Enzyme Immunoassay

FIA : Fluoroimmunoassay

Ancak yaygın uygulama, 1968 de Miles ve Hales tarafından radyoizotop kullanılan yöntemin verilmesi ile başlamıştır ( 10).

İşlemden antikorun fazlası kullanılarak antijenin tamamının reaksiyona girmesi sağlanır ( şekil 3). Reaksiyon dengeye ulaştığında bağlı olmayan antikorlar ortamdaki uzaklaştırılır. İşaretli antikor yardımıyla alınan ölçüm sonuçlarının örnekteki antijen konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu görülür (şekil 4). Kısaca IRMA, ELISA, IFMA şeklinde ifade edilen yöntemler bu grupta yer almaktadır\* (3, 9).



Şekil - 3 : Antikor fazlası kullanılan immunolojik yöntemlerde antijenin tamamının bağlanması. Şekil - 4 : Fazla reaktif yönteminde ölçü eğrisi.

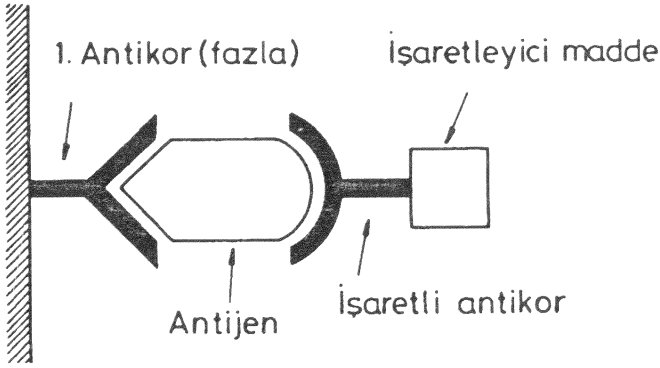
Ek olarak, birden fazla antijenik tayin yeri bulunan biyolojik madde analizlerinde, iki taraflı yöntem ya da **sandviç** yöntemi adıyla bilinen işlem uygulanır ( Şekil 5). Burada, katı madde yüzeyine bağlanan antikora, sırasıyla antijen ve işaretli antikor bağlanır (9).

Sınırlı reaktif yöntemi pratik olması nedeniyle tercih edilir. Fazla reaktif yönteminde ise reaksiyon süresi kısalmışken, duyarlılık ve hassasiyet artar ( 3 - 9).

\* IRMA : Immunoradiometric assay

ELISA : Enzyme - labelled Immunometric assay

IFMA : Immunofluorometric assay



Şekil - 5 : İki taraflı immunolojik yöntem

### Alternatif yöntemler

Radyoizotopların zararlı etkileri, immunolojik yöntemlerde işaretlemede belirli özellikte başka maddelerin kullanılmasını getirmiştir. Enzimlerle işaretleme ve sonuçta renkli bileşikler ya da lüminesans veren maddeler oluşmasından yararlanan yöntemler geliştirilmiştir (11-13). Başlıca kullanılan diğer grup, uyarılmış durumdan temel hale geri dönerken ışık veren lüminesans maddeler olmuştur. Uyarıcı kaynağa göre radyolüminesans, biyolüminesans v.b. adlandırılan yöntemlerden kemilüminesans daha yaygın uygulanmıştır (9 , 14 - 18).

Işık enerjisi absorplayarak uyarılan moleküllerin verdiği emisyon fotolüminesans olarak adlandırılmaktadır. Moleküller uyarılmış singlet halden temel singlet seviyeye dönerek fluoresans, önce triplet hale sonra temel duruma dönerek fosforesans yayınlarlar. Fark enerjinin radyasyona neden olmadan, örneğin ısı enerjisine dönüşmesi de konu olmaktadır. Fluoresans veren maddelerden öncelikle fluoreseln, rodamin, umbeliferon ve türevlerinin immunolojik yöntemlerde kullanılan işaretleyiciler arasında yer aldığını belirttikten sonra, özelliklerini tartışmak ve yapılan çalışmalar doğrultusunda gelişmeleri vermek doğru olacaktır (19).

Fluoresans ışığın enerjisi absorplanandan biraz düşük ve dalga boyu daha uzun olur. Bu özellik, absorplanan ve yayınlanan ışık spektrumlarının maksimum pikleri arasındaki uzaklığı veren Stokes shift ile karakterize edilir. İşaretlemede kullanılan fluoresans maddelerin, stokes shiftinin 50 nm den büyük olması da istenir. Ayrıca bu maddelerin molar

absorbansının ve yayınlanan ışığın şiddetinin absorplananinkine oranını veren kuantum veriminin yüksek olması gereklidir. İşaretleme immün reaktifin reaksiyon yeteneğinde ve fluoresansın şiddetinde azalmaya sebep olmamalıdır.

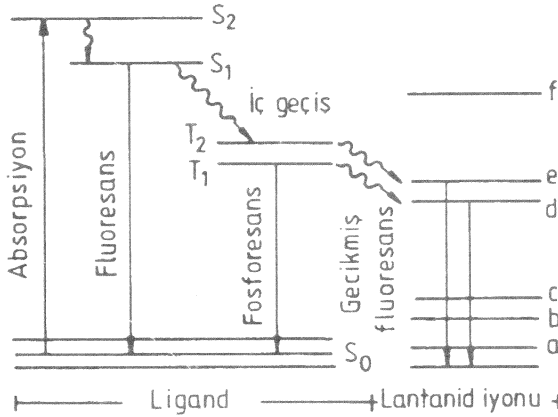
Fluoresans, maddelerin bulunduğu ortamın PH değerinden, polaritesinden, çözülmüş oksijenden ve sıcaklıktan etkilenir. Ayrıca biyolojik örneklerde tayini yapılan madde ile birlikte fazla miktarda protein ve kolloidal tanecik bulunması saçılmaya sebep olur. Yayınlanan fluoresansın ortamdaki maddeler tarafından absorplanması da mümkündür. Ek olarak serum proteinlerinin 320 - 350 nm, NADH ve bilirubin 430 - 470 nm dalga boyunda fluoresans verdikleri bilinmektedir. İşaretleme maddelerinin verdiği fluoresansın 500 nm den büyük dalga boyunda olması gerektiğini belirtirken, örnekte yer alan fluoresans veren maddelerin girişim yol açtığı, buna bağlı olarak duyarlılığın  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  M konsantrasyon ile sınırlandırıldığı ifade edilmelidir (1 - 2, 19- 21).

Biyolojik örneklerde bulunan yabancı maddelerden gelen fluoresansın zayıf şiddette ve kısa ömürlü olduğu bilinmektedir. O halde, immunolojik yöntemlerde işaretleme maddelerinden gelen fluoresansın şiddetli ve özellikle uzun ömürlü olmasıyla, girişim azaltılabilir ya da yokedilebilir. Bu doğrultuda yapılan incelemeler birden fazla maddenin tayinine olanak sağlayan ya da biyolojik örneklerde yalnızca işaretleme maddelerinden gelen fluoresansın ölçülmesini mümkün kılan zaman ayırmalı fluoresans tekniğinin gelişmesine yol açmıştır.

Bu yeni yöntem, azot ya da argon - iyon lazer uyarıcılar kullanarak öncelikle fluoresans veren organik moleküllerde denenmiştir (22 - 24). Zaman ayırmalı fosforesans yöntemi de aynı amaçla incelenmiştir (25). Ancak uzun ömürlü fluoresans veren lantanid çelatlarının uygulamada yer alması ile birlikte zaman ayırmalı fluoresans ölçüm şekli önem kazanmış ve immunolojik yöntemlerde yaygın uygulama alanı bulmuştur (26 , 27).

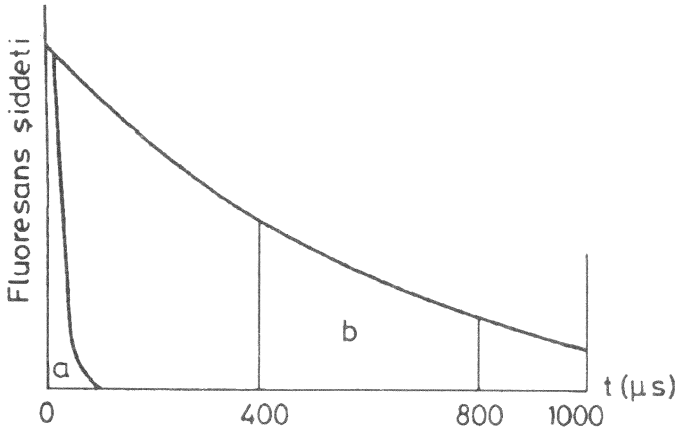
## Lantanid çelatları ve zaman ayırmalı fluoresans ölçüm şekli

İşaretlemede kullanılan Tb ( III), Sm (III) ve özellikle Eu ( III) çelatının ligandı UV ışını absorplayarak uyarılır. Singlet halden triplet hale ve daha sonra vibrasyonal rezonans oluşumu ile lantanid iyonunun 4f seviyelerine enerji geçişi meydana gelir ( 29). Böylece iyonik fluoresansın şiddetinde birkaç kat artma ile birlikte, fluoresans verme süresi 1000 $\mu$ s kadar uzun olan emisyon elde edilir ( şekil 6 ) ( 20, 30).



Şekil - 6 : Lantanid çelatinde enerji seviyeleri ve geçişleri.

İşlemede, işaretlemede lantanid çelatı kullanılan örnekler kısa süre UV ışını veren ksenon lambanın etkisinde bırakılır. Uyarılmadan belirli süre sonra ölçüm yapılarak, yani zaman ayırmalı fluoresans tekniği uygulanarak, girişime neden olan 50ns gibi kısa ömürlü emisyonun etkisi tümüyle giderilmiş olur ( şekil 7).



Şekil - 7: Zaman ayırmalı fluoressans ölçüm tekniğinde emisyonun değerlendirilmesi.

Lantanid çelatının fluoressans vermesi yanında kararlı olması, su da çözünmesi, immun reaktifin reaksiyon verme yeteneğini azaltmaması gibi özellikleri de olması istenir. Belirtilen iyonların oluşum sabiti  $\log k > 15$  olan kararlı kompleksleri, kompleksonlar ve türevleri ile elde edilir. Ancak bu çelatlarda UV ışını ile kuvvetli uyarılma ve iyonunu 4f seviyelerine enerji geçişi meydana gelmez. Bu nedenle ilk uygulamalarda komplekson ve fluoressans veren ligandın birlikte bulunduğu karışık ligandlı kompleksler kullanılmıştır. Daha sonraki uygulamalarda, önce lantanid çelatı nötral ortamda immun reaktife bağlanır. Reaktif fazlası uzaklaştırıldıktan sonra ortama fluoressans veren ligand fazlası ilave edilir. Bu aşamada genellikle kullanılan  $\beta$  - diketonlar, asidik ortamda kompleksonlardan ayrılan lantanid iyonlarına süratle bağlanır. Ancak her bir lantanid iyonun 6 koordinasyon basamağına 3 adet  $\beta$  - diketon molekülü bağlanır. Koordinasyonun su molekülleri ile tamamlanması fluoressans şiddetinde azalmaya neden olur. Bunu önlemek için ortama TOPO ve misel oluşturan Triton x - 100 gibi yüzey aktif maddeler de ilave edilir  $\text{Ln}^{3+} (\beta\text{-diketon})_3 (\text{TOPO})_{2-3}$  formülü ile verilen kompleks misellerin içine alınarak suyun olumsuz etkisi de giderilmiş olur (29 - 41).

Lantanid iyonlarının kompleksondan ayrılıp diğer liganda bağlanması işleminden önceki uygulamalarda immun reaktife bağlı olmayan maddelerin ortamdaki mutlak uzaklaştırılması gerekirdi. Bu amaçla



halen kullanılan, polistiren, polipropilen veya polivinilkarbonat ile yapılan plastik kapların yüzeyi genellikle poliklonal yapıda antikorlar ile kaplanır. Fiziksel adsorpsiyonla katı faza bağlanan antikoron fazlası uzaklaştırıldıktan sonra standartlar ve örnekler ilave edilir. Seçilen uygulama türüne bağlı olarak aynı zamanda ilave edilen işaretli antijen ile örneklerde bulunanın yarışarak plastik üzerinde sabitleşmiş antikorlara bağlanması sağlanabilir. Diğer uygulamada tayin edilen maddenin tamamının bu antikorlara bağlanmasından sonra ortama lantanid çelatı ile işaretlenmiş seçimli antikor katılır. Belirli bekleme süresi sonrasında bağlanmadan kalan maddeler uzaklaştırılır. Ortama yüzey aktif madde ve fluoresans veren ligand fazlası eklenir. 5 dakika gibi kısa süre sonra zaman ayırmalı fluoresans ölçüm tekniği ile değerler ölçülür (30, 38 - 51).

### SONUÇ

İmmunolojik yöntemlerin özellikleri başlıca kullanılan antikorların seçimliliğine, örnekte bulunan yabancı maddelerin etkilerine, en uygun uygulama türü ve koşullarının belirlenmesine, işaretleyici madde türü ve bunun belirlediği ölçüm tekniğine bağlıdır (1 , 6). Radyoizotopların kullanılması ile birlikte biyolojik örneklerde bir çok maddenin duyarlı tayinleri için yöntemler geliştirilmiştir. Ancak bunların zararlı etkileri belirli özellikleri olan başka maddelerin işaretlemede yer alması konusunda araştırmaları yoğunlaştırılmıştır. Uzun ömürlü (100-1000µs), büyük Stokes shifti olan (> 250 nm) ve geniş dalga boyu aralığında (250 - 360 nm) uyarılabilen lantanid çelatlarının (1) sağladığı zaman ayırmalı fluoresans ölçüm tekniğinin kullanılmasıyla, geliştirilen duyarlı ve hassas yöntemler uygulamada yer almıştır.

### KAYNAKLAR

1. Hemmilä, I. : *Clin. Chem.*, **31** / 3, 359 - 370 (1985).
2. Soini, E., Hemmila, I. : *Clin. Chem.*, **25** (3), 353 - 361 (1979).
3. Edwards, R. : *Immunoassay*. Alden Press, Oxford, 1985.
4. Yalow, R. S., and Berson, S. A. : *J. Clin. invest.*, **39**, 1137 - 1175 (1960).
5. Ekins, R. F. : *Clin. Chim. Acta*, **5**, 453 - 439 (1960).
6. Barnard, G., Karşilayan, H., Kohen, F., Collins, B. : *Adv. Hosp. Tech.*, **1**, 20 - 27 (1992).
7. O'Donnell, C. M., Suffin, S. C. : *Anal. Chem.*, **5** (1), 33 - 40A (1978).
8. Bates, D. L. : *Ann. Biol. Clin.*, **47**, 527 - 532 (1989).
9. Barnard, G. J. R., Collins, W. P. : *Med. Lab. Sci.*, **44**, 249 - 266 (1987).
10. Miles, C. E. M., Hales, C. N. : *Nature*, **219**, 186 - 189 (1968).
11. Clark, P. M. S. and Price, C. P. : *Clin. Chem.*, **32** (1), 88 - 92 (1986).
12. Bates, D. L. : *Ann. Biol. Clin.*, **47**, 527 - 532 (1989).
13. Thorpe, G. H. G., Krikka, L. J., Moseloy, S.B. and Whitehexd, T.P. : *Clin. Chem.*, **31**

- (8), 1335 - 13341 (1985).
14. Schroeder, H. R., Vogelhut, P. O., Catrino, R. I., Boguslaski, R.C. and Buckier, R. T. : *Anal. Chem.*, **48** ( 3 ), 1933 - 1937 (1976).
  15. Sturgess, M. L., Weeks, I., Mpoko, C. N., Laing, I. and Woodhead I.S. : *Clin. Chem.*, **32** (3), 532 - 535 (1986).
  16. MacCrimdle, C., Schwenzer, K. and Jolley M. E. : *Clin. Chem.*, **31** (9), 1487 - 1490 (1985).
  17. Richardson, A. P., Kim, J. B., Barnard, G. I., Collins, W. P. and McCapra, F. : *Clin. Chem.*, **31** (10), 1664 - 1668 ( 1985 ).
  18. De Boever, J. D., Kohen, F. , Vandekercknove, D. and Van Maele, G. : *Clin. Chem.*, **30** (10), 1637 - 1641 ( 1984).
  19. Barnard, G. : *Technology and Appilcation in Polypeptide and Steroid Hormone Detection.*, 15 - 37, Alan R. Liss, Inc., 1988.
  20. Hemillä, I., *Lanthanides as Probes for Time - Resolved Fluorometric Immunoassays*, Academic Dissertation, Turku, Finland, 1986.
  21. Lim, C. S. and Miller, J. N. : *Anal. Chim. Acta*, **114**, 183 - 189 (1980).
  22. Ishibashi, N., Ogawa, T., Imasaka, T. and Kunitake, M. :, *Anal. Chem.*, **51** (13), (1979).
  23. Brown, R. E., Legg, K. D., Wolf, M. W. and Singer, L. A. : *Anal. Chem.*, **46** (12), (1974).
  24. Lytle, F. E. and Kelsey, M. S. : *Anal. Chem.*, **46** (7), (1974).
  25. Fisher, R.P. and Winefordner, J. D. : *Anal. Chem.*, **44**(6), (1972).
  26. Yamada, S., Kano, K. a. a Ogawa, T. : *Anal. Chim. Acta*, **134**, 21 - 29 (1982).
  27. Dechaud, H., Bador, R., Claustrat, F. and Desuzinger, C. : *Clin. Chem.*, **32**(7), (1986).
  28. Crosby, G. A., Whan, R. E. and Alire, R. M. : *J. Chem. Physic.*, **34** (3), 743 - 748, (1961).
  29. Hemmilä, I. : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **48**, 389 - 400, (1988).
  30. Meares, C. F. : *Nücl. Med. Biol.*, **13** (4), 311 - 318, (1986).
  31. Soini Erkki and Kojola H. : *Clin. Chem.*, **29**(1), 65 - 68, (1983).
  32. Brittain, H.G., Richardson, F.S. and Martin, R. B. : *J. Am. Chem. Soc.*, **98** (25), 8255 - 8260, (1976).
  33. Meares, C. F., McCall, M.J., Reardan, D. T., Goodwin, D. A., Diamanti, C. I., and McTi-gue, M. : *Anal. Biochem.*, **142**, 68 - 78, (1984).
  34. Mukkaler, M., Mikola, H. and Memmila, I. : *Anal. Biochem.*, **176**, 319 - 325, ( 1989).
  35. Fisher R. P. and Winefordner J. D. : *Anal. Chem.*, **43** (3), 545 - 455, (1971).
  36. Bador, R., Dechaund, H. and Desuzinges, C. : *Clin Chem.*, **33** (1), 48 - 51, (1987).
  37. Tahboub, Y. R. and Mc. Gown. L. B. : *Anal. Chim. Acta*, **182**, 185 - 191, (1986).
  38. Barnard, G., Kohen, F., Mikola, H. and Lougren, T. : *J. Biolumines. and Chemilumi-nes.*, **4**, 177 - 184, (1989).
  39. Starsburger, C., Barnard, G., Toldo, L., Zarmi, B., Zadlk, Z., Kowarski, A., and Kohen F. : *Clin. Chem.*, **35** (6), 913 - 917, (1989).
  40. Hemmilä, I., Toivonen, E., Marniemi, I., Iorgensen, P. N., Zeuthen, I. and Lovgren, T. : *Clin. Chem.*, **32** ( 4 ), 637 - 640, (1986).
  41. Eskola, J. U., Nanto, V., Meurling, L. and Lovgren, T. N. E. , : *Clin. Chem.*, **31** (10), 1731 - 1734, (1985).
  42. Koihola, H. L., Irjana, K., Viikari, I. and Nantö, V. : *Clin. Chem.*, **31** (10), 1706 - 1709, (1985).

43. Lawson, N., Mike, N., Wilson, R. and Pandov, H. : *Clin. Chem.*, **32** (4), 684 - 686, (1986).
44. Barnard, G., Kohen, F., Mikola, H. and Lovgren, T. : *Clin. Chem.*, **3** (4), 555 - 559, (1989).
45. Pesonen, K., Alftan, H. Stenman, U. H., Vuolikka, L. and Perheentupa, J. : *Anal Biochem.*, **157**, 208 - 211, ( 1986).
46. Kuo, J. E., Milby, K. H., Hinsberg, J. D., Poole, P. R., Mc. Guffin, V. L. and Zare, R. N. : *Clin. Chem.*, **31** (1), 50 - 53, (1985).
47. Niemi, S., Maentausta, O., Bolton, N.S. and Hammond, G. L. : *Clin Chem.*, **34** (1), 63 - 66, (1988).
48. Eskola, J. U., Nevalainen, T. J., and Lovgren, T. N.E. : *Clin. Chem.*, **29** (10), 1777 - 1780, (1983).
49. Peterson, K., Siitari, H., Hemmilä, I., Soini, E., Lovgren, T., Hanninen, V., Tanner, P. and Stenman, Ulf - H. : *Clin. Chem.*, **29** (1), 60 - 64, (1983).
50. Dahlen, P. : *Anal. Biochem.*, **164**, 78 - 83, ( 1987).
51. Vilpo, J. A., Rasi, S., Suvanto, E., and Vilpo, L. M.: *Anal. Biochem.*, **154**, 436 - 440, (1986).