

IMUNOSSENSOR AMPEROMÉTRICO

Carla dos Santos Riccardi

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Unesp, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP

Paulo Inácio da Costa

Departamento Imunologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, 14801-360 Araraquara - SP

Hideko Yamanaka*

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Unesp, CP 355, 14801-970 Araraquara - SP

Recebido em 21/12/00; aceito em 17/10/01

AMPEROMETRIC IMMUNOSENSOR. The reaction between antigen and antibody has been widely used in many strategies for the development of analytical methodology, due to its high specificity. The immuno-reaction has been successfully employed for the biosensor development. A focus on biosensor based on immunoassay coupled to amperometric transducer is presented.

Keywords: immunosensor; immunoanalysis; amperometric.

INTRODUÇÃO

Biossensor é um dispositivo no qual o material de origem biológica, tais como enzima, organela, tecido animal ou vegetal, microrganismo, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, entre outros, é imobilizado junto a um transdutor adequado. De acordo com o transdutor utilizado, o biossensor pode ser classificado como eletroquímico (potenciométrico, amperométrico e condutimétrico), óptico (medida de luminescência, fluorescência, elipsimetria, etc.), detector de massa (relaciona a oscilação da frequência dos cristais piezelétricos com variação da massa). Conforme o tipo de interação que ocorre entre a substância a ser determinada e o material biológico, o biossensor é classificado como catalítico ou de afinidade.

A seletividade do reconhecimento do analito, pelo componente biológico ativo, aliada a sensibilidade do transdutor, tem gerado grande número de trabalhos na área de biossensor catalítico¹⁻³. No entanto, a determinação de níveis de concentrações aceitáveis de compostos poluentes e de drogas ou hormônios em química clínica requerem o desenvolvimento de metodologias confiáveis com detecção na ordem de 10^{-9} mol L⁻¹. Nesse caso a tecnologia imunológica, que é baseada na habilidade do anticorpo (Ac) formar complexo com o correspondente antígeno (Ag) é essencial, pois não somente a sensibilidade deve ser considerada, mas também a especificidade.

O imunossensor é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o antígeno ou anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado^{4,5}.

No presente artigo serão destacados os imunossensores que empregam transdutor amperométrico, além dos conceitos necessários para melhor compreensão dessa importante ferramenta de análise.

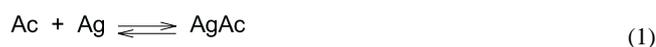
PRINCÍPIO DO IMUNOENSAIO

Os anticorpos pertencem à família das glicoproteínas denominada imunoglobulinas (Ig) e são produzidos pelos animais em resposta

à presença de substâncias estranhas denominadas imunógenos ou antígenos.

Ao desenvolver o imunossensor há que se dispor do anticorpo adequado para a substância em questão. Alguns são disponíveis comercialmente, porém as rotas para a produção segue esquema conhecido e têm sido descritas⁶⁻⁹.

No imunoensaio, o anticorpo combina-se especificamente com o correspondente antígeno ou hapteno (substância de baixo peso molecular que por si não é imunogênica, mas pode se ligar ao anticorpo específico), formando um complexo, conforme a Equação 1. Essa interação é caracterizada pela constante de afinidade, K_A , definida pelas concentrações do complexo (AgAc), do antígeno livre (Ag) e dos sítios livres dos anticorpos (Ac) no equilíbrio, de acordo com a Equação 2.



$$K_A = \frac{[\text{AcAg}]}{[\text{Ac}][\text{Ag}]} \quad (2)$$

Os valores das constantes de afinidade entre 10^4 e 10^{12} L mol⁻¹ resultam na alta sensibilidade dos imunoensaios. Embora estudos para a determinação das constantes tenham sido realizados¹⁰, na determinação do anticorpo, antígeno ou hapteno, frequentemente, o valor da constante não é diretamente empregado.

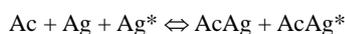
Sob o ponto de vista analítico, a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (sem qualquer marcador), porém grande parte dos imunoensaios lançam mão de marcadores (método indireto). Tanto o antígeno quanto o anticorpo podem ser marcados e, então, são denominados conjugados. Os primeiros imunoensaios empregavam marcadores radioativos¹¹, mas a restrição quanto ao emprego de radioisótopos conduziu ao desenvolvimento de ensaios com compostos fluorescentes ou enzimas, sendo o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), o mais amplamente utilizado em análises clínicas e biológicas. Em termos do desenvolvimento de imunossensores amperométricos, as enzimas têm sido empregadas como marcadores.

* e-mail: hidekoy@iq.unesp.br

FORMATO DE IMUNOENSAIO

Os imunoenaios são classificados como homogêneo, quando para a detecção não se faz necessária a separação, entre espécies marcadas e livres, e, heterogêneo quando necessita-se, para a quantificação precisa, de uma etapa adicional para separação das frações livres e ligadas da espécie marcada (Ag ou Ac)⁶. A determinação com imunossensor amperométrico é do tipo heterogêneo. Dentre os diversos formatos de imunoenaios^{8,12} os denominados competitivos e sanduíche têm sido os mais empregados, conforme se depreende da Tabela 1.

No ensaio competitivo o antígeno marcado com enzima (Ag*) e o antígeno livre (Ag), competem pela ligação com o anticorpo imobilizado formando o complexo de acordo com a seguinte equação:



Após a competição pela quantidade restrita de Ac, o excesso de reagente é eliminado por lavagens sucessivas e o complexo formado é medido através do agente empregado como marcador. Neste ensaio imunológico, a grandeza de medida é inversamente proporcional a concentração de antígeno livre¹³, apresentando alta sensibilidade⁸. Alternativamente, o antígeno pode ser imobilizado e o anticorpo é conjugado com uma enzima (Ac*).

O ensaio tipo sanduíche pode ser realizado pela imobilização do Ac ou Ag em uma superfície sólida e, após a reação com o analito, adiciona-se um sistema para o monitoramento da reação Ag-Ac compreendido por um anti-analito conjugado a uma enzima. O ensaio tipo sanduíche proporciona, teoricamente, uma alta sensibilidade e especificidade, uma resposta linear para um intervalo de concentração considerável e um curto tempo de reação comparando-se com o ensaio competitivo. Apesar dessa alta especificidade esse tipo de ensaio pode ocasionar um alto “background” e uma dependência de

fatores de diluição⁸. Contudo, a configuração depende do reconhecimento simultâneo de sítios de ligações distintos no analito e requer uma grande quantidade de anticorpos reagentes. Além disso, no caso de moléculas pequenas (por exemplo, resíduos de pesticidas ou seus produtos metabólicos) a ligação torna-se impossibilitada por impedimento estérico.

IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPO

A metodologia de análise com imunossensor amperométrico é do tipo heterogêneo e, conseqüentemente, envolve etapas de lavagens após as interações do antígeno e anticorpo. Dessa forma, a imobilização do anticorpo específico na superfície do eletrodo constitui uma das etapas críticas do desenvolvimento do imunossensor. Em geral, a superfície sólida deve apresentar algumas características fundamentais como alta capacidade para ligação de imunoreagentes; ligação estável, não causar desnaturação da molécula imobilizada.

A molécula de anticorpo é composta pelo fragmento F(ab), que possui o grupo amino terminal o qual interage com o sítio de ligação do antígeno, e uma fração Fc, que não interage com o Ag. Portanto, ao propiciar a imobilização pela fração Fc, permite-se uma orientação adequada do anticorpo imobilizado obtendo-se sítios ligantes direcionados para a solução contendo a amostra ou padrão. O uso de proteínas que orientem a imobilização dos anticorpos, como a proteína A¹⁵ e proteína G¹⁶, a imobilização através de monocamadas formadas pelo método Langmuir-Blodgett¹⁸ ou via tiocompostos¹⁸ são os ideais sob o ponto de vista do acesso do antígeno para a reação de afinidade.

Os anticorpos, também, têm sido imobilizados via adsorção em membrana de cloreto de polivinil¹⁹, adsorção em eletrodo de carbono vítreo seguida de ligação cruzada do glutaraldeído com polímero de polivinilpiridina dopado com complexo de ósmio²⁰, bem como oclusão durante a oxidação do filme de polianilina dopado com

Tabela 1. Aplicações de imunossensores amperométricos

Substância	Conjugado	Eletrodo	Limite detecção	Formato	Ref.
2,4-D	Ac-HRP	ouro	0,1 ppb	c	40
eritrócitos	IgM-HRP	carbono vítreo	1x10 ⁸ cél. mL ⁻¹	s	63
progesterona	Ag-ALP	EI (grafite)	1x10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	c	57
hLH	hLH-HRP	grafite	1ng mL ⁻¹	s	64
IgG	IgG-HRP	carbono	1x10 ⁻¹¹ mol L ⁻¹	s	65
2,4-D	ALP	oxigênio	0,1 g L ⁻¹	c	49
2,4-D	Ag-AChE	EI (grafite)	<0,01 µg L ⁻¹	c	66
<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	Ac-ALP	carbono	10 cél. mL ⁻¹	s	67
hCG (sangue)	Ac-ALP	ouro	2,5 IU L ⁻¹	s	68
hCG (soro)	catalase	Clark	20-10 ⁵ IU L ⁻¹	c	69
hCG (urina)	Ac-GOD	Clark	150 IU L ⁻¹	s	70
TSH (soro)	ADH/NADH OD	platina	0,2 mIU L ⁻¹	c	71
Ag prostético	Ac-ALP	ouro	0,4 µg L ⁻¹	s	72
corticosteróides	Ag-HRP	platina	0,2 µg/100mL	c	73
GM-CSF	Ag-ALP	EI (carbono)	0,10 µg mL ⁻¹	c	74
<i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i>	IgG-HRP	carbono, FIA	50 cél. mL ⁻¹	s	75
<i>E. coli</i> O 157:H7	IgG-HRP	carbono, FIA	100 cél. mL ⁻¹	s	15
teofilina (soro)	HRP / lipossomas	Clark	0,7 µg L ⁻¹	c	76
H-FABP	GOD-H-FABP GOD-IgG	Clark	100 ng mL ⁻¹	c s	77
atrazina	HRP	EI (grafite)	0,01 µg L ⁻¹	c	78

Ac (anticorpo); Ag (antígeno); 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxacético); hLH (hormônio luteinizante); IgG (imunoglobulina G); IgM (imunoglobulina M); β-HCG (hormônio gonadotrófico); TSH (hormônio tireotrófico); GM-CSF (fator estimulante de colônia de macrófagos); H-FABP (lipoproteína cardíaca); HRP (peroxidase de raiz forte); ALP (fosfatase alcalina); AchE (acetilcolinesterase); GOD (glicose oxidase); ADH (álcool desidrogenase); NADH OD (NADH oxidase); EI (eletrodo impresso); FIA (análise por injeção em fluxo); c (ensaio tipo competitivo); s (ensaio tipo sanduíche).

polivinilsulfonato²¹, em polímero eletroativo condutor²² e em matriz sol-gel²³. Esses métodos de imobilização são ao acaso e diminuem a capacidade do anticorpo em reagir com o correspondente antígeno.

Estudos para diminuir as reações não específicas do anticorpo imobilizado têm sido realizados²⁴.

Em alguns casos o antígeno é imobilizado para construir o imunossensor. Por exemplo, a imobilização da imunoglobulina IgG de coelho em matriz constituída da mistura sol-gel com grafite²⁵, imobilização de conjugado 7-hidroxycumarina e ovoalbumina em filme de náfon²⁶.

TRANSDUTOR AMPEROMÉTRICO

O transdutor amperométrico emprega a medida de intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reação redox na superfície sensível, proporcional a concentração do analito²⁷. No biossensor catalítico a enzima adequada, imobilizada na superfície do eletrodo, catalisa a reação dos substratos e o monitoramento da corrente elétrica poderá ser efetuado devido a formação dos produtos ou consumo de reagente. Outras vezes modifica-se a superfície do eletrodo com substância apropriada, denominada mediador, que oxidará um dos produtos e, então, monitora-se a corrente elétrica devido a reoxidação eletroquímica do mediador na superfície do eletrodo. O mediador, evidentemente, deve ser seletivo e diminuir o valor do potencial a ser aplicado diminuindo assim os eventuais interferentes da reação.

No caso do imunossensor do monitoramento da reação de afinidade também tem sido através dos produtos, reagentes ou de mediadores, no entanto, previamente outras reações deverão ocorrer. Inicialmente, tem-se a reação de afinidade entre o Ac e Ag ou hapteno, a reação (de competição ou sanduíche) com o conjugado e, finalmente, o monitoramento do ensaio pela enzima marcadora da reação. Portanto, a revelação da reação entre antígeno e anticorpo segue o mesmo esquema que os biossensores catalíticos, porém a determinação de dada substância com imunossensores tem como princípio a reação de afinidade, e não, a reação catalítica.

Além da medida de intensidade de corrente em dado potencial, medidas a partir de amperometria pulsada²⁸, a qual é menos influenciada pela espessura do filme, velocidade de agitação e temperatura são alternativas no desenvolvimento de imunossensores amperométricos.

O primeiro trabalho sobre imunossensor amperométrico foi publicado por Aizawa na determinação do hormônio de crescimento, empregando eletrodo de oxigênio²⁹. Nesse caso, o anticorpo foi imobilizado em membrana de celulose e colocada sobre a membrana gás permeável do eletrodo de Clark. Após a reação de competição entre o hormônio e o conjugado preparado com catalase, o imunossensor foi lavado e exposto à solução de peróxido de hidrogênio o qual é convertido em oxigênio e água.

Conforme se depreende da Tabela 1, além do eletrodo de Clark, carbono, ouro, grafite (na forma de eletrodo impresso) e carbono vítreo; eletrodos modificados com mediador e arranjo de microeletrodos³⁰ têm sido empregados na construção de imunossensores. Metodologias envolvendo a análise por injeção em fluxo também têm sido propostas³¹.

ENZIMA MARCADORA

Em geral, o antígeno e o anticorpo são espécies eletroquimicamente inertes e, portanto, o imunossensor eletroquímico requer um marcador que será útil para monitorar a reação de afinidade. Nesse sentido, o anticorpo ou o antígeno deve ser marcado com enzima, constituindo então o conjugado. A medida da corrente elétrica, que será correlacionada com a substância a ser determinada, será função

do produto da reação enzimática (quando em contato com o substrato adequado) na superfície do eletrodo, da transferência eletrônica direta da enzima na superfície do eletrodo, ou da reação do mediador.

Considerando que o conjugado deve ser de fácil obtenção, ser estável e ativo, algumas enzimas têm sido utilizadas como marcadores da reação imunoquímica^{32,33}. A seguir são destacadas aquelas de maior interesse em imunossensor amperométrico.

Glicose oxidase (GOD): a forma nativa contém duas moléculas do cofator adenina flavina dinucleotídeo (FAD), que é responsável pelas propriedades redox da enzima³⁴; o sistema de detecção ocorre através do consumo de oxigênio pela oxidação direta do peróxido de hidrogênio³⁵ ou oxidação do mediador³⁶.

Acetilcolinesterase (AChE): emprega a acetilcolina como substrato e a determinação do analito ocorre monitorando a tiocolina³⁷; tem sido usada como enzima marcadora de reação imunoenzimática, uma vez que exhibe uma alta constante catalítica³⁸; a presença de grupos amino primário permite o uso da AChE no acoplamento de haptenos sem alterar as propriedades catalíticas da enzima³⁹.

Peroxidase (HRP): catalisa a desidrogenação de diversos compostos aromáticos como fenóis, hidroquinonas e derivados da benzidina; a atividade da enzima também tem sido determinada por técnica amperométrica usando hidroquinona, 1,2-fenilendiamina ou pirocatecol⁴⁰, tetrametilbenzidina⁴¹, ou através da transferência de elétrons por mediadores⁴²⁻⁴⁴.

Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD): requer o cofator NAD⁺ que é convertido em NADH e, então, pode ser monitorada pela reoxidação eletroquímica na superfície do eletrodo. As substâncias teofilina⁴⁵ e digoxina⁴⁶ foram determinadas via imunensaio tipo homogêneo. O cofator tem sido determinado amperometricamente através da reação com mediador⁴⁷.

Galactosidase: apresenta atividade máxima em pH neutro ou levemente alcalino que a torna adequada para ensaios de fluidos biológicos⁴⁸.

Fosfatase alcalina (ALP): catalisa a hidrólise de éster fosfato produzindo fosfato inorgânico e grupo fenólico que poderá ser determinado através da oxidação em 750 mV vs Ag/AgCl. A oxidação direta do fenol é complicada pelo envenenamento da superfície do eletrodo provocada pela polimerização dos radicais fenoxi, então Scheller⁴⁹ desenvolveu um imunossensor no qual o fenol reage com a tirosinase formando a quinona que é convertida em catecol, amplificando o sinal da resposta do sistema. Essa enzima tem sido usada em imunossensores para a detecção de progesterona⁵⁰, bifenois policlorados⁵¹, GM-CSF⁵², imunoglobulina IgG⁵³, entre outros.

Considerando que as enzimas em geral são volumosas e que apenas região limitada estaria envolvida na catálise, autores têm sugerido empregar compostos que mimetizam a enzima ou minizimas⁵⁴, como por exemplo a microperoxidase. A microperoxidase é obtida pela digestão do citocromo c e é constituída de ferro porfirina no qual restam somente 8-11 resíduos de seus aminoácidos. A atividade da microperoxidase em solução é menor que HRP, no entanto quando imobilizada na superfície de eletrodo exhibe considerável velocidade de conversão que foi atribuída a facilidade de transferência eletrônica devido ao não isolamento pela concha dos aminoácidos⁵⁵. Tem sido empregado na detecção de anticorpos anti-dinitrofenol na presença de persulfato, o qual atua como substrato para a eletrocatalise da microperoxidase⁵⁶.

O substrato ideal, para a enzima marcadora do imunensaio amperométrico, deve apresentar alguns requisitos como, por exemplo, alta velocidade de conversão pela correspondente enzima; o potencial redox do produto deve ser baixo para minimizar interferentes; o potencial redox do substrato deve ser alto para que a corrente de fundo mantenha-se em níveis baixos. Estudos com diferentes substratos da fosfatase alcalina⁵⁷⁻⁵⁹ e da peroxidase⁴¹ têm sido

realizados no sentido de desenvolver imunossensor com bom desempenho.

A literatura tem registrado estudos sobre imobilização de anticorpos em filme de polipirrol onde o anticorpo atua como contra-íon e a após a reação de afinidade, determina-se o antígeno através de amperometria pulsada. Nesses trabalhos não são empregados conjugados.

APLICABILIDADE DE IMUNOSSENSORES

O imunossensor amperométrico tem sido empregado na pesquisa para a determinação de vários anticorpos, antígenos ou haptenos. Em algumas determinações a substância a ser analisada é a própria enzima, por exemplo, a isoenzima lactato desidrogenase (LDH-1) cuja concentração no soro pode ser indicativo de infarto agudo do miocárdio. Nesse caso, o anticorpo anti-LDH-1 encontra-se imobilizado em membrana pré-ativada e a isoenzima foi determinada pela reação eletroquímica envolvendo o NADH⁶².

Até o momento apenas dois tipos de imunossensores estão disponíveis comercialmente: os sistemas BIA, fornecidos pela Pharmacia Biosensor, e o BIOS-1TM da Artificial Sensing Instruments ASI AG. A detecção pelo sistema BIA é baseada em superfície plasma ressonante (SPR) e, usualmente, aplicado em rotina diagnóstica para a detecção de patógenos⁶⁰. O sistema BIOS-1 é baseado na detecção óptica e, geralmente, usado em células de fluxo tornando o método adequado para a detecção de bactérias, vírus e células⁶⁰.

Nenhum imunossensor amperométrico, para qualquer analito, está disponível comercialmente. No entanto, a maioria dos sistemas propostos na literatura permite análises rápida e contínua da ligação antígeno-anticorpo e, eventualmente, não requerem a adição de reagentes e etapas de lavagem. Como consequência, tem crescido o interesse no desenvolvimento de imunossensores que possam ser comercializados para aplicações, principalmente, na área clínica (lipoproteínas, proteínas de coagulação, hormônios, ácidos nucleicos), ambiental e análise de alimentos⁶¹. De modo geral a recuperação do anticorpo ou antígeno imobilizado, após a análise, não tem sido boa. Portanto os imunossensores que empregam os eletrodos impressos são os mais adequados para a comercialização.

Estão apresentados na Tabela 1 outros exemplos de imunossensores amperométricos para detecção de substâncias de interesse ambiental, farmacêutico e diagnóstico clínico, registrados na literatura.

CONCLUSÃO

A sensibilidade das técnicas amperométricas aliada à seletividade das reações entre o anticorpo e o antígeno e das enzimas marcadoras resulta nos imunossensores amperométricos. Esse dispositivo além de preencher os requisitos necessários para determinação de substâncias em baixas concentrações, dispensa um elaborado pré-tratamento de amostra, aumenta a confiabilidade e a velocidade de análise reduzindo o custo financeiro da análise.

No desenvolvimento de imunossensores há que se considerar o anticorpo e antígeno, sua imobilização na superfície do eletrodo, o preparo do conjugado contendo enzima e o monitoramento do sinal enzimático. A imobilização do anticorpo ou antígeno e o monitoramento do sinal enzimático segue esquema semelhante ao desenvolvimento de biossensores catalíticos, no qual vários grupos de pesquisa atuam nessa linha no país. Quanto à etapa de produção de anticorpos, a metodologia é conhecida porém, no Brasil poucos grupos atuam nessa linha, assim, restrito por aqueles comercialmente disponíveis ou pela doação de algum grupo de pesquisa, via de regra, do exterior. Dessa forma, para a determinação de compostos, que sejam de interesse específico do país, urge unir esforços para

preencher a lacuna referente à produção de anticorpos monoclonais ou de compostos que o mimetizem⁶⁴.

AGRADECIMENTOS

C.S.R. e H.Y. agradecem à FAPESP pelas bolsas concedidas.

REFERÊNCIAS

1. Wolfbeis, O. S.; *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 81.
2. Zhang, S.; Wright, G.; Yang, Y.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *15*, 273.
3. Janata, J.; Josowicz, M.; Vanýsek, P.; DeVaney, D. M.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 179R.
4. Skládal, P.; *Electroanal.* **1997**, *9*, 737.
5. Morgan, C. L.; Newman, D. J.; Price, C. P.; *Clin. Chem.* **1996**, *42*, 193.
6. Gil, E. S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I.; *Quím. Nova* **1999**, *22*, 874.
7. Marco, M. P.; Gee, S.; Hammock, B. D.; *Trends Anal. Chem.* **1995**, *14*, 415.
8. Tijssen, P.; *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, v. 15; Elsevier Science B. V.: Amsterdam, 1985, p. 1.
9. Nardi, N. B.; Onsten, T. G. H.; *Ciência Hoje* **1988**, *41*, 28.
10. Piehler, J.; Brecht, A.; Giersch, T.; Hock, B.; Gauglitz, G.; *J. Immunol. Meth.* **1997**, *201*, 189.
11. Yalow, R. S.; Berson, S. A.; *Nature* **1959**, *184*, 1648.
12. Gosling, J. P.; *Clin. Chem.* **1990**, *36*, 1408.
13. Wilson, G. S.; Alwis, U.; *Anal. Chem.* **1987**, *59*, 2786.
14. Abdel-Hamid, I.; Ivnitki, D.; Atanasov, P.; Wilkins, E.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 309.
15. Millot, M.C.; Martin, F.; Bousquet, D.; Sébille, B.; Lévy, Y.; *Sens. Actuators, B* **1995**, *4*, 268.
16. Valat, C.; Limoges, B.; Huet, D.; Romette, J. L.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *404*, 187.
17. Barraud, A.; Perrot, H.; Billard, V.; Matelet, C.; Therasse, J.; *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 39.
18. Wink, T.; Van Zuilen, S. J.; Bult, A.; Van Bennekom, W. P.; *Analyst* **1997**, *122*, 43R.
19. Baumner, A. J.; Schmid, R. D.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 519.
20. Lu, B.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *345*, 59.
21. Killard, A. J.; Zhang, S.; Zhao, H.; Johan, R.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *400*, 109.
22. Sargent, A.; Loi, T.; Gal, S.; Sadik, O. A.; *J. Electroanal. Chem.* **1999**, *470*, 144.
23. Wang, J.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *399*, 21.
24. Jenkins, S.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R.; *J. Clin. Immun.* **1990**, *13*, 99.
25. Wang, J.; Pamidi, V. A.; Rogers, K. R.; *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1171.
26. Deasy, B.; Dempsey, E.; Smyth, M.R.; Egan, D.; Bogan, D.; O'Kennedy, R.; *Anal. Chim. Acta* **1994**, *294*, 291.
27. Wilson, G. S. Em *Biosensors: Fundamentals and applications*; Turner A.P.F., Karube, I.; Wilson, G. S., eds.; Oxford: Oxford University Press, 1987, p. 165.
28. Wang, X.; Pardue, H. L.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4489
29. Aizawa, M.; Morioka, A.; Suzuki, S.; Nagamura, Y.; *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 22.
30. Niwa, O.; Xu, Y.; Halsall, B. H.; Heineman, W. R.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1559.
31. Puchades, R.; Maquieira, A.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1996**, *26*, 195.
32. Blake, C.; Gould, B. J.; *Analyst* **1984**, *109*, 533
33. Kricka, L. J.; *Pure Appl. Chem.* **1996**, *68*, 1825
34. Raba, J.; Mottola, H. A.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1995**, *25*, 1.
35. Tsuji, I.; Egushi, H.; Yasukouchi, K.; Unoki, M.; Taniguchi, I.; *Biosens. Bioelectron.* **1990**, *5*, 87.
36. Huet, D.; Bourdillon, C.; *Anal. Chim. Acta* **1993**, *272*, 205.
37. Kaláb, T.; Skládal, P.; *Electroanal.* **1997**, *9*, 293.
38. Vigny, M.; Bom, S.; Massouli, J.; Leterrier, F.; *Eur. J. Biochem.* **1978**, *85*, 317.
39. Metreau, E.; Pleau, J. M.; Dardenne, M.; Bach, J. F.; Pradelles, P.; *J. Immunol. Meth.* **1987**, *102*, 233.
40. Kalab, T.; Skládal, P.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 361.
41. Volpe, G.; Compagnone, D.; Draisci, R.; Pallechi, G.; *Analyst* **1998**, *123*, 1303.
42. Lu, B.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R.; Moulds, J.; Frame, T.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *340*, 175.

43. Wendzinski, F.; Gründig, B.; Renneberg, R.; Spener, F.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 43.
44. Manning, F.; O'Fagain, C.; O'Kennedy, R.; Deasy, B.; Smyth, M.R.; *Anal. Proc.* **1994**, *31*, 12.
45. Athey, D.; McNeil, C. J.; Bailey, W. R.; Hager, H. J.; Mullen, W.H.; Russel, L. J.; *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 415.
46. Manning, P.; Athey, D.; McNeil, C. J.; *Anal. Lett.* **1994**, *27*, 2443.
47. Tham S.Y.; Pearson, J. E.; Kane, J. W.; Treloar, P. H.; Vadgama, P. M.; *Sens. Actuators, B* **1998**, *50*, 204.
48. Måsson, M.; Liu, Z.; Haruyama, T.; Kobatake, E.; Ikariyama, Y.; Aizawa, M.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 353.
49. Bauer, C. G.; Eremenko, A. V.; Ehrentreich-Forster, E.; Bier, F. F.; Makower, A.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R.; Scheller, F. W.; *Anal. Chem.* **1996**, *65*, 2453.
50. Schreiber, A.; Feldbrügge, R.; Key, G.; Glatz, J. F. C.; Spener, F.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 1131.
51. Del Carlo, M.; Lioni, I.; Taccini, M.; Cagnini, A.; Mascini, M.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *342*, 189.
52. Crowley, E.; O'Sullivan, C.; Guilbault, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *389*, 171.
53. Fernández-Sánchez, C.; González-García, M. B.; Costa-García, A.; *Biosens. Bioelectron.* **2000**, *14*, 917.
54. Breslow, R.; Halfon, S.; Zhang, B.; *Tetrahedron* **1995**, *51*, 377.
55. Padeste, C.; Grubelnik, A.; Tiefenauer, L.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *374*, 167.
56. Katz, E.; Willner, I.; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *418*, 67.
57. Pemberton, R. M.; Hart, J. P.; Stoddard, P.; Foulkes, J. A.; *Biosens. Bioelectron.* **1999**, *14*, 495.
58. Kreuzer, M. P.; O'Sullivan, C. K.; Guilbault, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *393*, 95.
59. Tang, H. T.; Lunte, C. E.; Halsall, H. B.; Heineman, W. R.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *214*, 187.
60. Owen, V.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, i.
61. Gizeli, E. A.; Lowe, C. R.; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, vii.
62. Kelly, S.; Compagnone, D.; Guilbault, G. G.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 173.
63. Lu, B.; Smyth, M. R.; O'Kennedy, R.; Moulds, J.; Frame, T.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, *340*, 175.
64. Ivnitski, D.; Rishpon, J.; *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 409.
65. Ghindilis, A. L.; Krishnan, R.; Atanasov, P.; Wilkins, E.; *Biosens. Bioelectron.* **1997**, *12*, 415.
66. Kaláb, T.; Skládal, P.; *Electroanal.* **1997**, *9*, 293.
67. Rishpon, J.; Gezundhajt, Y.; Sousson, L.; Rosen-Margalit, I.; Hadas, E.; *Em Biosensor Design and Application*; Mathewson, P. R.; Finley, J. W., eds.; Am. Chem. Soc.: ACS Symposium Series No. 511, Washington: DC, 1992, p. 59.
68. Duan, C. M.; Meryerhoff, M. E.; *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 1369.
69. Aizawa, M.; Morioka, A.; Suzuki, S.; Nagamura, Y.; *Anal. Biochem.* **1979**, *94*, 22.
70. Robinson, G. A.; Hill, H. A. O.; Philo, R. D.; Gear, J. M.; Rattle, S. J.; Forrest, G. C.; *Clin. Chem.* **1985**, *31*, 1449.
71. Athey, D.; McNeil, C. J.; *J. Immunol. Meth.* **1994**, *176*, 153.
72. Meryerhoff, M. E.; Duan, C. M.; Meusel, M.; *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1378.
73. Cook, C. J.; *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 467.
74. Crowley, E.; O'Sullivan, C.; Guilbault, G. G.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *389*, 171.
75. Abdel-Hamid, I.; Ivnitski, D.; Atanasov, P.; Wilkins, E.; *Anal. Chim. Acta* **1999**, *399*, 99.
76. Haga, M.; Sugawara, S.; Itagaki, H.; *Anal. Biochem.* **1981**, *118*, 286.
77. Spener, F.; Thoss, C. S.; Renneberg, R.; Glatz, J. F. C.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *30*, 71.
78. Fernández-Romero, J. M.; Stiene, M.; Kast, R.; Luque de Castro, M. D.; Bilitewski, U.; *Biosens. Bioelectron.* **1998**, *13*, 1107.