

## IMUNODETEKCE V LATERÁLNÍM TOKU NA MEMBRÁNĚ

SANDRA GÖSELOVÁ, MARTINA BLAŽKOVÁ,  
BARBORA HOLUBOVÁ, LUDMILA  
KARAMONOVÁ a PAVEL RAUCH

Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha,  
Technická 5, 166 28 Praha 6  
martina.blazkova@vscht.cz

Došlo 25.4.13, přijato 24.5.13.

Klíčová slova: imunoanalýza na membráně, imunostrip, LFIA, nanočástice zlata, nanočástice uhlíku, pesticidy, toxiny, alergeny, patogeny, forenzní analýza

### Obsah

1. Úvod
2. Příprava imunochemického testu
  - 2.1. Membrány
  - 2.2. Značky používané k vizuální detekci
  - 2.3. Specifická detekční činidla – protilátky
3. Detekční princip
4. Vyhodnocení výsledku imunochemického testu
5. Detekce nízko- a vysokomolekulárních látek
6. Přednosti a omezení metody
7. Závěr

### 1. Úvod

Instrumentální analýza je každým rokem obohacována novými přístroji umožňujícími netušené možnosti využití při stanovení a detekci nízko- i vysokomolekulárních látek, a to jak v mnoha vědních odvětvích, tak i v praktických aplikacích. Souběžně s těmito mnohdy vysoce sofistikovanými analytickými postupy se již desítky let vyvíjejí metody imunochemické. Zatímco analytický chemik používá především fyzikální a chemické techniky, chemik příroda využívá zvláště nekovalentní vazby. Imunochemické techniky jsou založeny na nekovalentních interakcích mezi specifickým činidlem (protilátka) a analytem. Je zřejmé, že uvedené metody jsou ve svém principu detekce zcela odlišné. Protilátky rozeznávají molekuly nikoliv striktně podle jejich chemického složení, ale podle jejich prostorového uspořádání, resp. vnějšího elektronového obalu. Jde tedy o vzájemné interakce atomů nebo celých molekul na principu známé teorie Emila Fischera „zámek a klíč“<sup>1</sup> nebo efektu indukovaného přizpůsobení<sup>2</sup>.

Imunochemické techniky mají potenciál detegovat nebo i stanovit nízko- a vysokomolekulární látky relativně

rychle a to často velmi jednoduchým postupem<sup>3,4</sup>. Historie těchto metod začala již ve dvacátých letech minulého století vývojem imunoprecipitačních technik<sup>5</sup>. Rokem 1959 je datován rozvoj kvantitativních imunochemických postupů na mikrotitračních destičkách. Objev radioimunoanalýzy<sup>6</sup> byl oceněn Nobelovou cenou. O deset let později byla vyvinuta uživatelsky příjemnější enzymová imunoanalýza<sup>7</sup>, která doznala širokého rozšíření ve všech oblastech biovědy<sup>8</sup>.

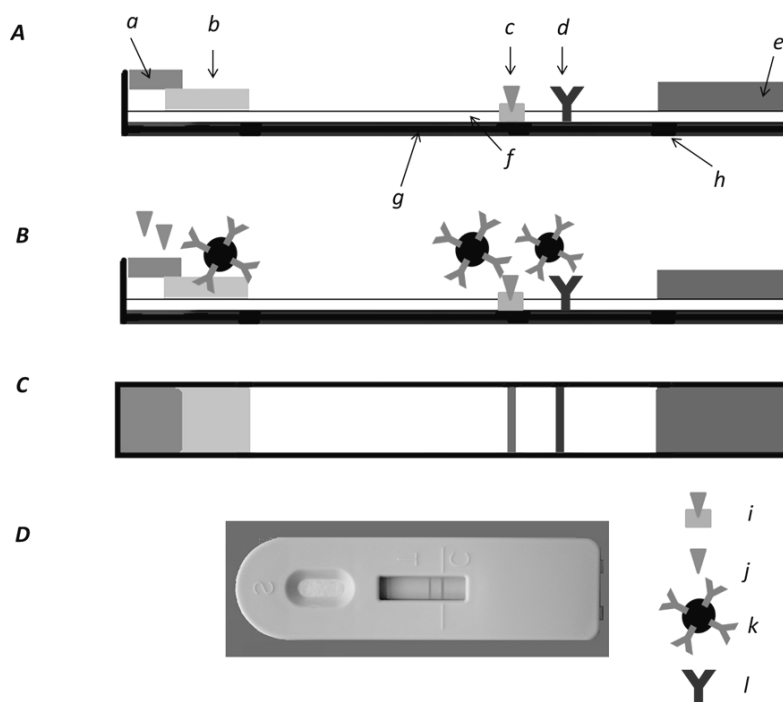
Brzy poté byl rozpoznán potenciál imunochemických metod pro vývoj jednoduchých a rychlých technik detekce nízko- a vysokomolekulárních látek, jakož i mikroorganismů. Cílem těchto metod je sestavit co nejjednodušší systém, kterým by bylo možné pouhou aplikací kapalného vzorku získat na detekční membráně výsledek v několika minutách. Všeobecně známým reprezentantem těchto technik je domácí těhotenský test<sup>9</sup>. Jinou možností je tzv. dipstik, který nahrazuje membránu plastovou tyčinkou<sup>10–12</sup>.

Tyto jednoduché postupy se mohou kombinovat s jinými technikami, např. se současnou detekcí nukleových kyselin. Taková metoda je potom vhodná zejména pro detekci patogenních mikroorganismů<sup>13–15</sup>. Vývoj těchto technik stále pokračuje a v poslední době se detekční systémy doplňují mikročipy, nanočásticemi a elektronickou detekcí<sup>16–18</sup>.

V tomto článku se budeme zabývat popisem jedné z jednodušších, rychlých a nejrozšířenějších imunoanalytických technik, „lateral flow immunoassay“ (LFIA), pro jejíž název je asi nejvhodnější český termín „imunodetekce v laterálním toku na membráně“. Tato technika je založena na interakci specifických protilátek s detegovaným analytem, přičemž jeden z partnerů je barevně označen a druhý je zakotven na membráně. K interakci protilátky s analytem dochází při průtoku interagujících látek membránou. Analyt je potom možné vizuálně detegovat.

### 2. Příprava imunochemického testu

Schéma LFIA je na obr. 1A. Na plastovém vyztužení je položena membrána. Na levé straně membrány (začátek testu) je jedna nebo více podložek, které slouží k aplikaci vzorku nebo dalších imunoreagencií. Na vlastní membráně jsou pak minimálně dvě místa, na kterých jsou imobilizovány protilátky nebo konjugáty proteinů s analytem, v podobě úzkých příčných linek. O místě, kde je protilátka nebo konjugát protein-analyt imobilizován, rozhoduje zvolený formát detekce. Na pravé straně membrány (konec testu) je absorpční podložka, která urychluje tok membránou. Celý systém může být, zejména pro komerční účely, uložen v plastovém krytu, který má otvory pouze pro aplikaci vzorku a vizuální kontrolu testovací a kontrolní linie. Nejvýznamnější složky imunochemického testu jsou mem-



Obr. 1. Schéma imunochromatografického testu; A – pohled z boku, B – použitý formát č. 2, viz kap. 3, C – pohled shora, D – komerční souprava, a – podložka pro vzorek, b – podložka pro konjugát, c – testovací linie, d – kontrolní linie, e – absorpční podložka, f – membrána, g – podložka pod membránou, h – plastový kryt, i – konjugát inertní bílkoviny s haptenem, j – haptén, k – konjugát primární protilátky s barevnou částicí, l – sekundární protilátka

brána, protilátka jako činidlo specificky vázající analyt a značka použitá k barevnému zviditelnění výsledku testu.

### 2.1. Membrány

Membrány používané pro přípravu diagnostických proužků představují jednu z nejdůležitějších částí systému. Jsou vesměs tenké a křehké, a proto jsou umístěny na plastovém vyztužení. Nejčastěji používaným materiálem je nitrocelulosa, kterou vyrábí řada firem, např. Whatman, Millipore. Využívány jsou však i jiné polymerní materiály, např. nylon nebo polyethylen<sup>19</sup>. Důležitá kritéria pro výběr membrány jsou její schopnost dobře vázat detekční činidlo, tj. proteiny (protilátky nebo konjugát protein-analyt) a vhodná velikost jejich pórů, která ovlivňuje kapilární síly a tím i průběh detekčního procesu. Velikost pórů vyráběných membrán je mezi 0,05 až 12 mm. Vlastností membrán však lépe charakterizuje rychlost průtoku kapaliny jejich kapilárami v  $\text{cm s}^{-1}$  (cit.<sup>20</sup>). Rychlost průtoku roztoků analytu nebo značených molekul membránou významně ovlivňuje interakce detekčního činidla a analytu, a tudíž i výsledek analýzy. Obecně platí, že větší velikost porů rozšiřuje testovací linku a potom je citlivost detekce nižší. Zatím však nebyl v literatuře popsán výběr vhodné membrány, a tak optimální podmínky detekce si musí zjistit každý experimentátor sám<sup>21</sup>. Membrány s imobilizovanými proteiny mohou být skladovány při běžných teplotách v laboratoři po dobu několika měsíců.

Detekční systém obsahuje, kromě diagnostické membrány, ještě podložky pro aplikaci vzorku a konjugátu. Podložka pro vzorek je z celulosy a podložka pro konjugát je tvořena skleněnými, celulosovými nebo polyesterovými vlákny<sup>22</sup>.

Podložka sloužící pro aplikaci vzorku může být využita různým způsobem. Kromě jednoduché, přímé aplikace vzorku k analýze, může být tato podložka nasycena různými reagensy, např. proteiny, detergenty, které ovlivňují rychlost průtoku vzorku diagnostickou membránou, reakční dobu analýzy, ale mohou také působit jako filtr, který odstraňuje hrubé částice přítomné v analyzovaném vzorku. Rovněž v tomto případě musí experimentátor sám vyhledat optimální podmínky průběhu analýzy<sup>19</sup>.

Absorpční podložka působí jako tampon, nasává roztok z membrány a urychluje tak postup detekce. Nejčastěji se používají celulosové filtry.

### 2.2. Značky používané k vizuální detekci

Vizuální detekci výsledku analýzy umožňuje použití barevných značek ve formě nanočástic velikostí v řádu desítek nm. Nejrozšířenější je značení koloidním zlatem<sup>18</sup>; používá je většina autorů (až v 75 %). Kromě nanočástic zlata se používají nanočástice uhlíku (až v 5 %), v menší míře barevné latexové nanočástice, liposomy s fluorescenční nebo bioluminiscenční značkou<sup>19</sup>, nanočástice selenu<sup>23</sup>, silikátové nanočástice s chelátem europia<sup>17</sup>, aj.

### Nanočástice zlata

Koloidní zlato je používáno stovky let k barvení skla a hedvábí, ve středověké medicíně na diagnózu sifilitidy a v moderní době v chemické katalýze, v nelineární optice, v supramolekulární chemii, při molekulárním rozlišování a v biověděch. Předností koloidního zlata je, že je nejstabilnější ze všech dosud známých koloidů. V posledních 15 letech se uplatňují v imunochémii nanočástice zlata ke značení proteinových molekul (např. protilátek), nukleových kyselin, ale i částí buněk nebo mikroorganismů. Využívá se hydrofobní interakce mezi nanočásticí zlata a molekulou proteinu/nukleové kyseliny<sup>18</sup>. Jako velmi úspěšná se ukázala velikost částic mezi 10–40 nm (cit.<sup>24</sup>). Typický průměr částic používaných v imunochemických testech je 40 nm. Takovéto částice jsou červené<sup>25</sup>. Nanočástice zlata mají ještě další přednosti. Na rozdíl od mnoha organických barviv nepodléhají rozkladným procesům účinkem světla, nejsou toxické, jejich aplikace je snadná a jsou dlouhodobě stabilní, pokud jsou skladovány v suchu při 4 °C. Jsou komerčně dostupné, ale většina autorů si je připravuje redukcí jednoduchých solí zlata<sup>19</sup>.

### Nanočástice uhlíku

Podobně jako u nanočástic zlata, které jsou červené, je rozhodující předností materiálů s obsahem uhlíku pro jejich využití pro vizuální detekci jejich černé zbarvení. První využití sazí (typ Special Black 4, firmy Degussa AG) jako značky bylo popsáno již před dvaceti lety<sup>26</sup>. Vlastnosti a přednosti nanočástic uhlíku jsou detailně představeny v přehledném článku<sup>27</sup>. Na rozdíl od nanočástic zlata nejsou nanočástice připravené ze sazí přesně definované a jejich velikost se pohybuje v desítkách až stovkách nm. Ačkoliv se může zdát heterogenní nedefinovaná směs částic uhlíku nevhodnou pro uplatnění v analýze, v mnoha aplikacích se však ukazuje výhodná. Je tomu tak proto, že menší částice dosáhnou testovací linie rychleji než větší a dochází tak k rozšíření analytické využitelné oblasti koncentrací detegovaného analytu (potlačením tzv. hook efektu), v některých případech až o čtyři řády<sup>28</sup>. Nanočástice uhlíku se mohou získat také z jiných zdrojů, např. různých uhlovodíků, cyklodextrinů, fruktosy, aj. Příprava nanočástic z těchto zdrojů je poměrně složitá a mnohdy je také cena výchozího materiálu poměrně vysoká. Tyto nedostatky byly odstraněny přípravou nanočástic z přírodního uhlíku pomocí ultrazvuku v prostředí peroxidu vodíku<sup>29</sup>. Podařilo se tak získat nanočástice uhlíku velikosti 5–10 nm. S pomocí nanočástic uhlíku lze dosáhnout detekčních limitů v řádu pM a to jak vizuální detekcí, tak i pomocí skeneru nebo digitální kamery. Studie, která se zabývala vhodností různých značek pro imunochemické detekce, prokázala, že nanočástice uhlíku patří po zlatu mezi nejpoužívanější<sup>30</sup>.

### 2.3. Specifická detekční činidla – protilátky

Klíčový význam pro získání specifity a citlivosti detekce analytu má afinita/avidita používané protilátky. Ačkoliv se jedná o nejvýznamnější součást detekčního testu, zmiňují se o nich autoři publikací jen velmi okrajově. Mo-

noklonální protilátky se používají asi pětikrát častěji než polyklonální protilátky. V menší míře se objevují práce, které využívají rekombinantních protilátek. Velmi se osvědčily např. při detekci mikrocystinu<sup>31</sup>. V detekčním postupu můžeme používat jak neznačené, tak značené specifické protilátky vybranou značkou. Značení protilátky je s ohledem na jejich vysokou cenu a jejich vyšší spotřebu finančně náročné. Jisté nebezpečí skrývá i vlastní proces značení protilátky, který může ovlivnit/snížit jejich imunoaktivitu. Někdy je vhodnější použít značené tzv. sekundární protilátky. Jsou to protilátky, které interagují se specifickou protilátkou a jsou tedy univerzálním činidlem běžně komerčně dostupným, a proto mnohem levnější než specifické/primární protilátky. Jejich další výhodou je, že bezprostředně nezasahují do vlastní interakce analyt-specifická protilátka a neovlivňují výsledek analýzy<sup>19</sup>.

## 3. Detekční princip

Princip detekce LFIA spočívá v pohybu kapalného vzorku membránou, na které je testovací linka (detekční zóna) a kontrolní linka. Pokud je analyt přítomen v analyzovaném vzorku, zachytí se v detekční zóně a to se projeví zbarvením linky podle druhu použité značky. Přebytková protilátka se zachytí na kontrolní lince, která se také zbarví. Neobsahuje-li vzorek analyt, zbarví se pouze kontrolní linka. Zbarvení kontrolní linky dokazuje správný průběh detekce.

### Detekční formáty

Použitý formát detekce se volí podle typu analytu. Nízkomolekulární látky, které mají jedno vazebné místo (jeden epitop) pro protilátku, se mohou detegovat pouze v tzv. kompetitivním formátu. Nejčastěji se používají dva formáty<sup>19</sup>:

1. Protilátka je nanesena na testovací linii. Směs analytu přítomného ve vzorku je aplikována na podložku pro vzorek, značený analyt na podložku pro konjugát a oba typy analytů soutěží spolu o vazebné místo na protilátce navázané na testovací linii.
2. Na testovací linii je nanesen konjugát analyt-protein. Analyt je aplikován na podložku pro vzorek a značená protilátka na podložku pro konjugát. V tomto uspořádání soutěží o vazbu na značenou protilátku analyt vázaný na testovací linii s analytem vzorku (obr. 1B). Obr. 1C je pohled shora na detekční membránu a obr. 1D je ukázka komerční soupravy.

V obou případech získané výsledky negativně korelují s koncentrací analytu. Čím více je analytu ve vzorku, tím je zbarvení testovací linie slabší<sup>32</sup>.

Vysokomolekulární látky, které mají více než jeden epitop, se detegují v tzv. sendvičovém formátu. Na testovací linii se nanese specifická protilátka proti analytu. Na podložku pro vzorek se aplikuje druhá (jiná) specifická protilátka proti analytu, která je značená, a analyt. Analyt se v průběhu detekce váže jak na druhou protilátku, se

kteřou putuje membránou, tak i na vázanou první protilátka. Čím více je analytu ve vzorku, tím je zbarvení testovací linie silnější<sup>33</sup>.

#### Optimalizace detekce

Při vývoji detekčního systému je třeba nejprve najít optimální koncentrace značených molekul a použitých protilátek. Dalším krokem je pak vyhledat vhodnou polohu pro testovací linku. Oba tyto kroky mají vliv na získání co nejnižšího detekčního limitu<sup>16</sup>. Významnou roli však hraje i výběr materiálu pro diagnostickou membránu, značení protilátky nebo konjugátu haptenu-protein. Pouze sladění všech těchto faktorů vede k úspěšné detekční soupravě<sup>21</sup>.

#### 4. Vyhodnocení výsledku imunochemického testu

Výsledek získaný pomocí LFIA je možné vyhodnocovat jednak vizuálně (kvalitativně) a jednak kvantitativně. Pro kvantitativní hodnocení se detekční proužek skenuje, ve stupních intenzity zbarvení, a následně jsou změřené hodnoty zpracovány např. programem TotalLab TL100 software (Nonlinear USA Inc., NC, USA). V tomto programu je možné sytost zbarvení v oblasti kontrolní

a testovací linie převést na číselné hodnoty, které jsou dále zpracovány v programu MS Excel.

Pro použití kompetitivního formátu detekce platí, že stupně barevného zbarvení testovací a kontrolní linky jsou nepřímo úměrné koncentraci analytu. Naměřené hodnoty stupňů barvy pro jednotlivé koncentrace kalibrační řady je třeba zprůměrovat a vynést do grafu proti dekadickému logaritmu koncentrace stanovovaného analytu. Získanými body se pak programem MS Excel proloží sigmoidní křivka, kterou je možné popsat pomocí čtyřparametrové rovnice regresní funkce. Parametry této regresní funkce se vypočítají pomocí Řešitele v programu MS Excel.

#### 5. Detekce nízko- a vysokomolekulárních látek

LFIA dosáhla v poslední dekádě značného rozšíření. V databázi Web of Science lze najít již skoro 1000 původních sdělení o detekci široké palety látek, od nízkomolekulárních sloučenin až po biomakromolekuly. Jen za rok 2012 přibylo dalších 140 článků. Několik ilustračních příkladů detekce nízkomolekulárních analytů, jako jsou pesticidy, mykotoxiny a veterinární léčiva, uvádí tab. I.

Tabulka I

Příklady nízkomolekulárních analytů detekovaných imunochemickým testem (ICT)

Analyt	Značka <sup>a</sup>	Vzorek	Detekční limit	Lit.
<i>Pesticidy</i>				
Methiokarb	C	voda	0,5 ng ml <sup>-1</sup>	37
Metamidofos	Au	zelenina	1,0 mg ml <sup>-1</sup>	38
Triazofos	Au	voda	4–32 ml l <sup>-1</sup>	39
Atrazin	Au	voda	1,0 ng ml <sup>-1</sup>	40
Thiabendazol	C	ovocné džusy	0,005–0,5 mg kg <sup>-1</sup>	41
Carbaryl	Au	rýže, ječmen	50–100 mg l <sup>-1</sup>	42
Carbaryl	C	ovocné džusy	5 ng ml <sup>-1</sup>	43
<i>Mykotoxiny</i>				
Zearalenon	Au	pšenice	0,1 mg kg <sup>-1</sup>	44
Deoxynivalenol	Au	pšenice, kukuřice	50 ng ml <sup>-1</sup>	45
Aflatoxin B1	Au	rýže, kukuřice	0,05–2,5 ng ml <sup>-1</sup>	46
Aflatoxin B2	mag	různé ořechy	0,9 ng ml <sup>-1</sup>	47
Ochratoxin	Au	ječmen, oves, káva	1 ng ml <sup>-1</sup>	48
T-2 Toxin	Au	pšenice, oves	0,1 mg kg <sup>-1</sup>	49
<i>Veterinární léčiva</i>				
Sulfometazin	Au	mléko, ryby	0,02 mg kg <sup>-1</sup>	50
19-Nortestosteron	Au	moč	200 ng ml <sup>-1</sup>	51
Progesteron	Au	mléko	0,6–1,2 ng ml <sup>-1</sup>	52
Chloramfenikol	Au	vodní rostliny	10 ng g <sup>-1</sup>	53

<sup>a</sup> Au – nanočástice zlata, C – nanočástice uhlíku, mag – magnetické nanočástice.

## Tabulka II

## Přednosti a omezení imunochromatografického testu (ICT)

Výhody	Nevýhody
Přímá aplikace vzorku Detekce v jednom kroku Rychlá, levná detekce; malý objem vzorku Možnost získat semikvantitativní výsledky Jednoduchý postup detekce Aplikace možná v „polních“ podmínkách Různé varianty detekčního formátu Detekční testy lze skladovat za běžných teplot	vzorek musí být kapalný problém s multireziduální detekcí pouze kvalitativní a semikvantitativní výsledky omezení celkového objemu vzorku potřeba kvalitní protilátky problémy kontaktu pórů membrány s matricí vzorku

Přehled detekčních postupů a komerčně dostupných souprav na alergeny<sup>34</sup> a původní sdělení o detekci proteinových toxinů, virů a patogenních mikroorganismů byla publikována nedávno<sup>17,35,36</sup>. Komerční detekční soupravy pro různé analyty jsou dostupné na internetu.

## 6. Přednosti a omezení metody

Vyvinutá LFIA má své výhody i nevýhody. Nejvýznamnější z nich shrnuje tab. II. Uvedené výhody naznačují možnosti uplatnění této metody. Kromě využití v laboratořích se některé postupy dočkají i komerčního využití ve formě testů aplikovatelných prakticky v jakýchkoliv podmínkách. Hlavním omezením převodu této metody do praxe je její možný odbyt, a proto se komerčně vyvíjené soupravy uplatňují zejména v medicíně, a to od lékařských ordinací až po nemocnice. V menší míře také v oblasti péče o životní prostředí, ve veterinárním lékařství, při výrobě potravin a krmiv. V poslední době se stále více objevují LFIA ve forenzní analýze. V uvedených případech se uplatní hlavní přednosti metody, a to její jednoduchost, rychlost a vizuální detekce výsledku. Vlastní detekční postup není za těchto podmínek náročný na kvalifikaci pracovníka. Mezi výhody LFIA je třeba také uvést komerční dostupnost detekčních souprav pro širokou paletu látek<sup>17,19,34</sup>.

Z praktického hlediska je snad jediným, avšak zásadním omezením této metody, nutnost mít proti analytu specifickou protilátku s vysokou afinitou. Ve výčtu nevýhod metody je možné také zmínit přetrvávající obtíže při pokusu o současnou detekci více analytů.

## 7. Závěr

Požadavky na rychlou a spolehlivou detekci nízkoi vysokomolekulárních látek, jakož i mikroorganismů se stále zvyšují. Stejně tak se objevují nové metody detekce založené na různých principech. Mezi těmito metodami má technika LFIA, prezentovaná v tomto přehledu, stále významnější místo. Její předností je rychlost detekce; výsled-

dek se většinou získá v řádu jednotek minut. Metoda je jednoduchá a její formát umožňuje připravovat „polní testy“ s vizuální i instrumentální semi/kvantitativní detekcí. Předností metody je možnost dosáhnout nízké detekční limity, což ji předurčuje k hromadnému vyšetřování vzorků s cílem detegovat určitý analyt. Diagnostické testy mohou být skladovány při laboratorní teplotě po dobu několika měsíců. Aplikační možnosti těchto metod zahrnují v celé šíři zejména všechny biovědy.

Další vývoj metody směřuje k automatickému dávkování vzorků, současné detekci většího počtu analytů a elektronickému zpracování změřených dat<sup>16</sup>.

*Autoři děkují Grantové agentuře MV ČR za finanční podporu projektu MV0 VG20112015045.*

## LITERATURA

1. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/479680/protein/72588/The-role-of-the-active-site?anchor=ref593870>, staženo 22.4.2013.
2. Koshland D. E., Ray W. J., Erwin M. J.: *Federations Proceedings* 17, 1145 (1958).
3. Káš J., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* 75, 963 (1981).
4. Fukal L., Rauch P., Káš J.: *Chem. Listy* 82, 959 (1988).
5. Luers H., Ottensooser F.: *Biochem. Zeitschr. Bd.* 145, 130 (1924).
6. Yalow R. S., Berson S. A.: *Nature* 184, 1648 (1959).
7. Van Weeman B. K., Schuur A. H. W. M.: *FEBS Lett.* 15, 232 (1971).
8. Zhang H., Wang S., Fang G.: *J. Immunol. Methods* 368, 1 (2011).
9. Leuvering J. H. W., Thal P. J. H. M., Waart M., Schuur A. H. W. M.: *Fresenius Z. Anal. Chem.* 301, 132 (1980).
10. Morber C., Weil L., Niessner R.: *Fresenius Environ. Bull.* 2, 151 (1993).
11. Mills E. N. C., Ootts A., Plumb G. W., Lambert N., Morgan M. R. A.: *Food. Agric. Immunol.* 9, 37 (1997).

12. Blažková M., Karamonová L., Greifová M., Fukal L., Hoza I., Rauch P., Wyatt G.: *Eur. Food Res. Technol.* **223**, 821 (2006).
13. Mens P. F., van Amerongen A., Sawa P., Kager P. A., Schalling H. D.: *Parasitology* **61**, 412 (2008).
14. Blažková M., Koets M., Rauch P., van Amerongen A.: *Eur. Food Res. Technol.* **229**, 867 (2009).
15. Blažková M., Javůrková B., Fukal L., Rauch P.: *Biosens. Bioelectron.* **26**, 2828 (2011).
16. Suárez-Pantaleón C., Wichers J., Abad-Somovilla A., van Amerongen A., Abad-Fuentes A.: *Biosens. Bioelectron.* **42**, 170 (2013).
17. Ngom B., Guo Y., Wang X., Bi D.: *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 1113 (2010).
18. Seydack M.: *Biosens. Bioelectron.* **20**, 2454 (2005).
19. Posthuma-Trumpie G., Korf J., van Amerongen A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 569 (2009).
20. Henderson K., Steward J.: *J. Immunol. Methods* **270**, 77 (2002).
21. Anfossi L., Baggiani C., Giovannoli C., D'Arco G., Giraudi G.: *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 467 (2013).
22. Koets M., Sander I., Bogdanovic J., Doekes G., van Amerongen A.: *J. Environ. Monit.* **8**, 942 (2006).
23. Lou S., Patel C., Ching S., Gordon J.: *Clin. Chem.* **39**, 619 (1993).
24. Švorčík V., Kolská Z., Kvítek O., Siegel J., Řezníčková A., Záruba K.: *Nanoscale Res. Lett.* **6**, 607 (2011).
25. Slepíčka P., Siegel J., Lyutakov O., Švorčík V.: *Chem. Listy* **106**, 875 (2012).
26. van Amerongen A., Wichers J. H., Berendsen L. B. J. M., Timmermans A. J. M., Keizer G. D., van Doorn A. W. J., Bantjes A., van Gelder W. M. J.: *J. Biotechnol.* **30**, 185 (1993).
27. Posthuma-Trumpie G., Wichers J. H., Koets M., Berendsen L. B. J. M., van Amerongen A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 593 (2012).
28. Amarasiri F. S., Wilson G. S.: *J. Immunol. Methods* **151**, 47 (1992).
29. Li H., He X., Liu Y., Yu H., Kang Z., Lee S.-T.: *Mater. Res. Bull.* **46**, 147 (2011).
30. Gordon J., Michel G.: *Clin. Chem.* **54**, 1250 (2008).
31. Lawton L. A., Chambers H., Edwards C., Nwaopara A. A., Healy M.: *Toxicon* **55**, 973 (2010).
32. Mičková B., Rauch P., Fukal L.: *Chem. Listy* **98**, 970 (2004).
33. Karamonová L., Blažková M., Fukal L., Rauch P., Greifová M., Horáková K., Tomáška M., Roubal P., Brett G. M., Wyatt G. M.: *Food Agric. Immunol.* **15**, 167 (2003).
34. Schubert-Ullrich P., Rudolf J., Ansari P., Galler B., Führer M., Molinelli A., Baumgartner S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 69 (2009).
35. Javůrková B., Blažková M., Fukal L., Rauch P.: *Eur. Food Res. Technol.* **234**, 1099 (2012).
36. Javůrková B., Blažková M., Fukal L., Rauch P.: *Chem. Listy* **105**, 193 (2011).
37. Blažková M., Mičková-Holubová B., Rauch P., Fukal L.: *Biosens. Bioelectron.* **25**, 753 (2009).
38. Chenggang S., Suqing Z., Kun Z., Guobao H., Zhen-zu Z.: *J. Environ. Sci.* **20**, 1392 (2008).
39. Guo Y. R., Liu S. Y., Gui W. J., Zhu G. H.: *Anal. Biochem.* **389**, 32 (2009).
40. Kaur J., Singh V., Boro R., Thampi K. R., Raje M., Varshney G. C., Suri C. R.: *Environ. Sci. Technol.* **41**, 5028 (2007).
41. Blažková M., Rauch P., Fukal L.: *Biosens. Bioelectron.* **25**, 212 (2010).
42. Wang S., Zhang C., Wang J., Zhang Z.: *Anal. Chim. Acta.* **546**, 161 (2005).
43. Holubová-Mičková B., Blažková M., Fukal L., Rauch P.: *Eur. Food Res. Technol.* **231**, 467 (2010).
44. Kolosova A. Y., De Saeger S., Sibanda L., Verhejen R., Peteghem C. V.: *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 2103 (2007).
45. Xu Y., Huang Z. B., He Q. H., Deng S. Z., Li L. S., Li Y. P.: *J. Food Chem.* **119**, 834 (2010).
46. Xiulan S., Xiaolian Z., Jian T., Xiaohong G., Jun Z., Chu F. S.: *Food Control.* **17**, 256 (2006).
47. Tang D., Saucedo J. C., Lin Z., Basova S. O. E., Goryacheva I., Biselli S., Lin J., Niessner R., Knopp D.: *Biosens. Bioelectron.* **25**, 514 (2009).
48. Wang X. H., Liu T., Xu N., Zhang Y., Wang S.: *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 903 (2007).
49. Molinelli A., Grossalber K., Krska R.: *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1309 (2009).
50. Wang L., Wang S., Zhan J., Liu J., Zhang Y.: *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 1619 (2008).
51. Liquiang L., Chifang P., Zhengzu J., Chuanlai X.: *J. Biomed. Chromatogr.* **21**, 861 (2007).
52. Posthuma-Trumpie G., Jakob K., van Amerongen A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **392**, 1215 (2008).
53. Li K., Liu L., Xu C. L., Chu X. G.: *J. Anal. Sci.* **23**, 1281 (2007).
54. Göselová S., Holubová B., Blažková M., Fukal L.: *Chem. Listy* **107**, 875 (2013).

**S. Göselová, M. Blažková, B. Holubová, L. Karamonová, and P. Rauch** (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **Immunoassay in Membrane Lateral Flow**

The review focuses on the latest development of the title method. Compared with conventional instrumental techniques the method is simple and fast. It can be used for qualitative and/or semiquantitative detection and should be applied in non-laboratory environment. The principles of current formats, different markers, such as gold, carbon, and latex nanoparticles as well as possible quantitative monitoring are described. The applications generally include tests for low- or high-molecular-weight compounds, such as pesticides, drugs, mycotoxins, hormones, allergens, pathogens and metabolites in food or feed, as well as veterinary, biomedical and environmental purposes.