

*На правах рукописи*



**ЖЕРДЕВ Анатолий Виталиевич**

**ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ:  
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ  
И ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРИЛОЖЕНИЯ**

**Специальность 1.5.4 – Биохимия**

**Диссертация на соискание учёной степени  
доктора химических наук в виде научного доклада**

**Москва – 2022**

Работа выполнена в Федеральном исследовательском центре  
«Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор **Дзантиев Борис Борисович**

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

Введение .....	6
Выбор темы исследования .....	6
Актуальность избранной темы .....	9
Степень разработанности темы .....	12
Цель и задачи исследования .....	14
Методология и методы исследования .....	15
Научная новизна .....	16
Теоретическая значимость работы.....	17
Практическая значимость работы .....	17
Положения, выносимые на защиту .....	18
Степень достоверности результатов .....	19
Личный вклад автора .....	20
Структура работы .....	20
Публикации .....	20
Связь с государственными программами .....	21
Апробация результатов работы .....	22
Основное содержание .....	24
Глава 1. Измерение количественных характеристик иммунохимических взаимодействий .....	24
Глава 2. Классификация и математическое моделирование иммунохроматографических систем .....	31
Глава 3. Свойства ультрадисперсных носителей и их функционирование в иммунохроматографических системах ...	42
Глава 4. Селективность иммуноопределения по отношению к структурно близким соединениям .....	53
Глава 5. Разработка и характеристика мультиплексных иммунохроматографических систем .....	59

Глава 6. Способы изменения пределов обнаружения иммунохроматографических систем .....	66
Глава 7. Разработка, характеристика и апробация тест-систем для обнаружения антигенов разных классов .....	73
Заключение .....	83
Итоги выполненного исследования .....	83
Выводы .....	83
Рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы ....	85
Список литературы .....	87
Список научных публикаций, в которых изложены основные научные результаты диссертации .....	95
Список патентов, полученных по результатам диссертационного исследования .....	109
Благодарности .....	112

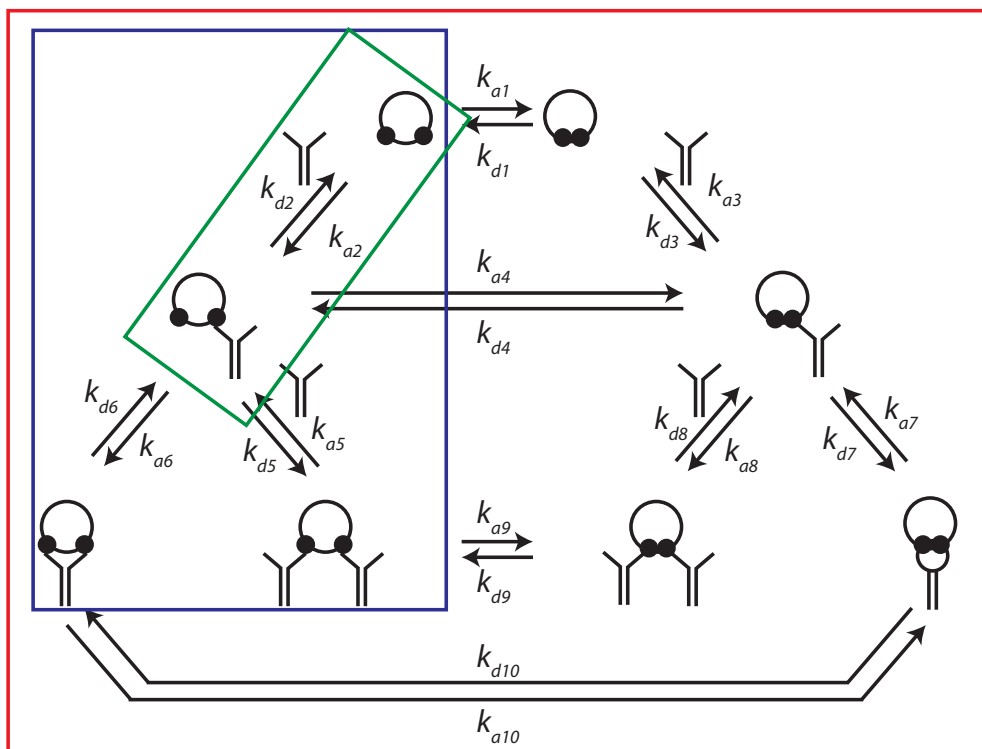
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- БСА – бычий сывороточный альбумин  
БСЖК – белок, связывающий жирные кислоты  
ВСЛК – вирус скручивания листьев картофеля  
ГКР – гигантское комбинационное рассеяние  
Д – Д-димер  
ИФА – иммуноферментный анализ  
ИХ – иммунохроматография  
М – миоглобин  
НЧЗ – наночастицы золота  
ОФЛ – офлоксацин  
ППР – поверхностный плазмонный резонанс  
ПрО – предел обнаружения  
ПФИА – поляризационный флуоресцентный иммуноанализ  
РИА – радиоиммунный анализ  
РНФ – Российский научный фонд  
РФФИ – Российский фонд фундаментальных исследований  
СТМ – стрептомицин  
ТрI – тропонин I  
ФЦП – Федеральная целевая программа  
ХФ – хлорамфеникол
- CR – перекрестная реактивность (cross-reactivity)  
EMIT – фермент-усиленный иммуноанализ (enzyme-multiplied immunoassay technique)  
IC<sub>50</sub> – концентрация кросс-реагента, на 50% ингибирующая связывание антител со стандартным антигенным препаратом  
IgG – иммуноглобулин класса G (immunoglobulin G)  
QSAR–анализ – количественный анализ взаимосвязей структура – активность (quantitative structure–activity relationship)  
RBD – рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain) S-белка коронавируса
- С, СРБ – С-реактивный белок  
МБК, SBK, ХБК, Y(O)BK, Y(N)BK – S-, M-, X-, Y(O)-, Y(N)-вирусы картофеля

## ВВЕДЕНИЕ

### Выбор темы исследования

Вариабельность антиген-связывающих сайтов антител и обеспечиваемое с ее помощью высокоселективное распознавание являются основой как защиты живых организмов *in vivo*, так и обнаружения и оценки содержания разнообразных соединений *in vitro* [1, 2]. Поэтому востребовано понимание закономерностей формирования иммунных комплексов. Простейшие описания этих процессов как бимолекулярных реакций не отражают ряда особенностей: поливалентность иммуноглобулинов и значительной части антигенов, гетерогенность иммунореагентов по составу и аффинности, диффузионные процессы, стерические ограничения [3, 4]. Однако при расширении списка учитываемых факторов требуются трудоемкие измерения увеличивающегося числа параметров и усложняется выявление общих закономерностей – см. рис. 1 в качестве примера.



**Рис. 1.** Модели трех уровней сложности (рассматриваемые в них взаимодействия выделены прямоугольными рамками), описывающие образование комплексов между антителами и липосомальными антигенами (на основании [5])

Поэтому необходим аргументированный выбор характеристик, ключевых для формирования иммунных комплексов в тех или иных условиях. Отметим, что для проверки предлагаемых описаний недостаточно сравнить теоретические и экспериментальные зависимости для выбранных модельных иммунореагентов. Закономерности должны выполняться при рассмотрении самых разных антигенов и антител, обеспечивать прогнозирование изменений, происходящих при варьировании разных параметров.

Особый интерес представляют описания иммуноаналитических систем. Эти системы крайне разнообразны. Их развитие (рис. 2) характеризовалось появлением все более простых и экспрессных методов в сочетании с новыми решениями, снижающими пределы обнаружения (PrO). В соответствии с этими тенденциями статус лидера переходил от иммунопреципитации к радиоиммунному анализу (РИА), а потом – к иммуноферментному анализу (ИФА) [7–9].

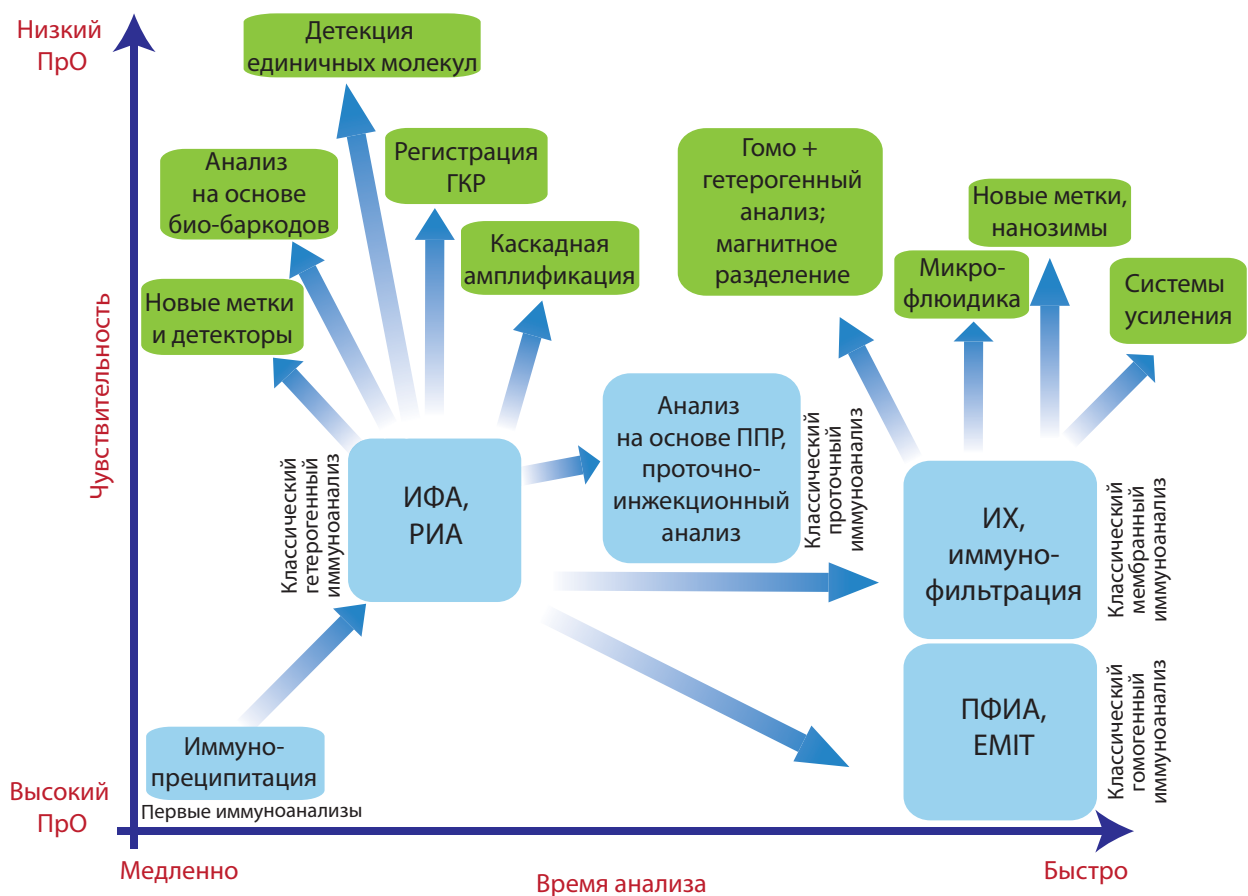
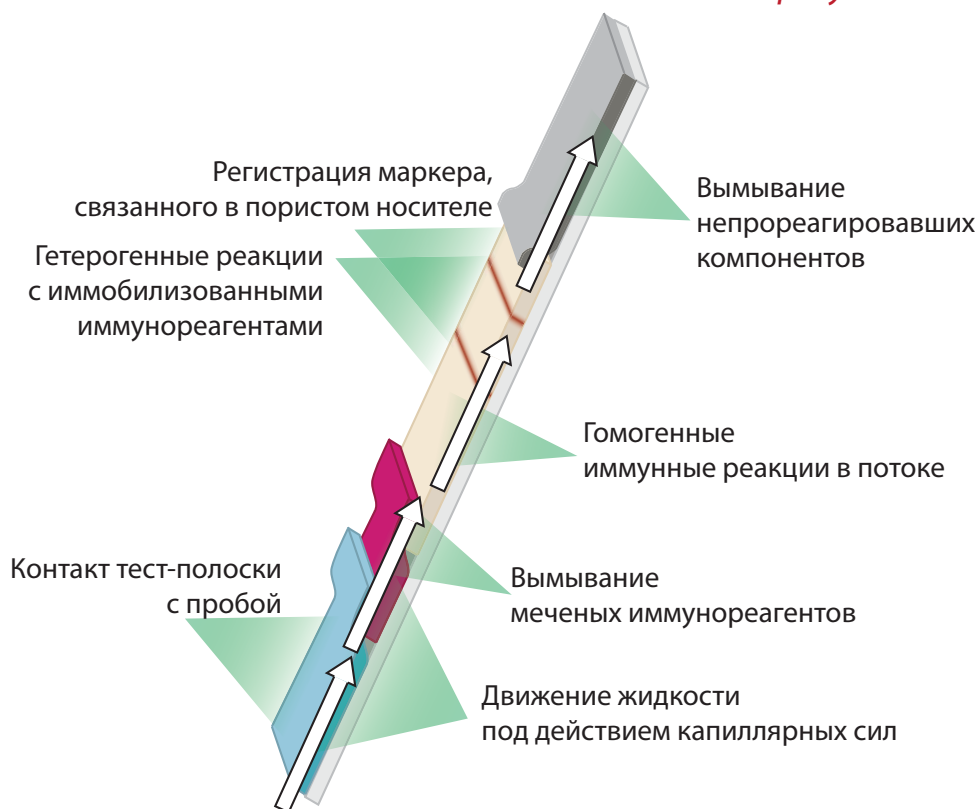


Рис. 2. Разнообразие и эволюция иммуноаналитических методов (на основании [6])

В последнее время активно развивается, расширяя области использования, иммунохроматография (ИХ). На сегодняшний день иммунохроматография наиболее успешно объединяет максимальную простоту и быстрое получение результатов (рис. 3). Применение тест-полоски с предварительно нанесенными на ее мембраны реагентами сводится к контакту пробы и тест-полоски, инициирующему движение вдоль мембран реагентов и их взаимодействия, результатом которых становится визуально контролируемое окрашивание определенных участков тест-полоски [10].

*Качественный или количественный результат*

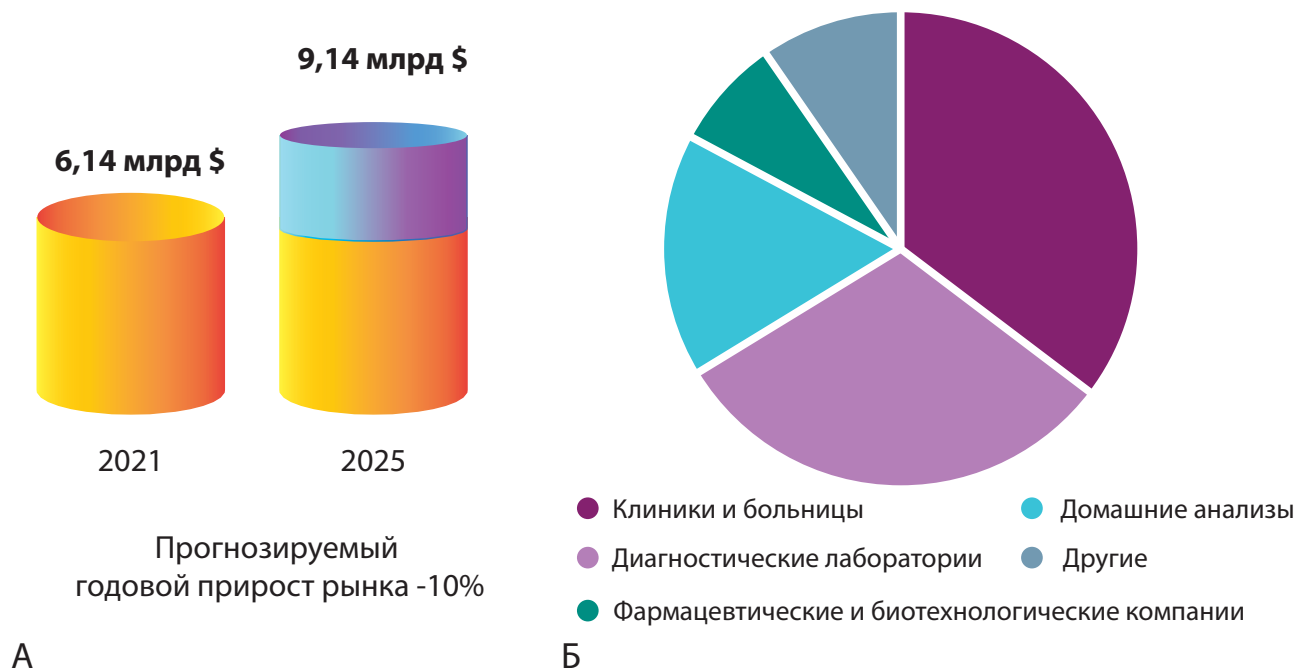


**Рис. 3.** Принцип иммунохроматографии и его реализация в тест-полосках

Наиболее известные задачи, решаемые с помощью иммунохроматографии, – выявление беременности по изменению концентрации хориогонадотропина, для которого предлагались самые первые тесты [11], и контроль антител к возбудителю COVID-19, для которого иммунохроматография была успешно применена совсем недавно [12]. Этот метод крайне востребован в медико-диагностической



практике (рис. 4), все активнее используется в ветеринарии, экологическом мониторинге, при контроле продуктов питания.

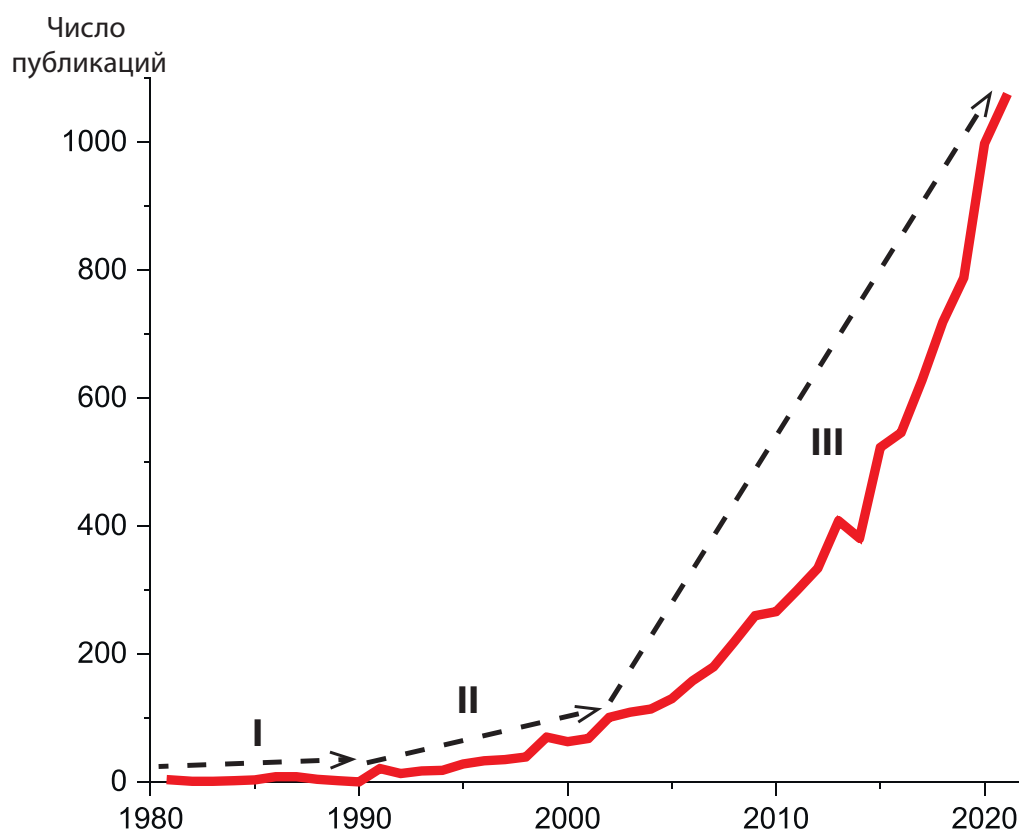


**Рис. 4.** Мировой рынок (А) и основные пользователи (Б) иммунохроматографических тест-систем (по материалам агентств Research & Markets и Grand View Research)

При создании и оценке перспектив новых иммунохроматографических систем важна возможность прогностического описания их функционирования. Поэтому необходимой фундаментальной основой прикладных разработок является изучение иммунохимических взаимодействий при проведении иммунохроматографии, включающих гомогенные и гетерогенные реакции в неравновесном проточном режиме с разной пространственной локализацией реагентов.

### Актуальность избранной темы

Для обоснования актуальности – востребованности в данный момент времени – исследования, представленного в настоящей работе, рассмотрим развитие разработок в области иммунохроматографии. Три стадии этого процесса иллюстрируют библиометрические данные, приведенные на рис. 5.



**Рис. 5.** Динамика индексируемых Web of Science публикаций, удовлетворяющих критерию Theme: (immunochromatogr\* or (lateral and flow and immun\*)). Сведения по состоянию на 30.12.2021 г. Комментарии к стадиям I–III даны в тексте

Идеи процесса, названного впоследствии иммунохроматографией, впервые предлагаются в 1960-е годы [13], но долгое время не находят развития. В 1980-е годы в ходе разработки технологии тестов для внелабораторного выявления беременности формируются и патентуются основные решения по конструкции тест-полосок и их компонентам [14–16], заложившие основу массового производства.

Постепенно происходит «размежевание» иммунохроматографии в ее нынешнем понимании и аффинной хроматографии с иммобилизованными на носителях антителами, претендовавшей на то же название [17]. Первое время иммунохроматография развивается в рамках технологических разработок практически без новых научных публикаций. Ниша иммунохроматографии ограничивается контролем немногих соединений со сравнительно высокими концентрациями в биопробах [18].

Однако востребованность быстрого внелабораторного тестирования вызывает расширение ряда веществ, контролируемых методом иммунохроматографии [19]. В 1990-е годы иммунохроматографические разработки, как правило, сводятся к адаптации известных подходов для новых реагентов.

Но уже к началу 2000-х годов ситуация меняется. Рост научной активности в области иммунохроматографии соответствует нанотехнологическому буму и детальной характеристике различных нанодисперсных препаратов, ряд из которых демонстрирует перспективность в качестве иммунохроматографических маркеров [20–22]. Необходимость выявлять новые аналиты в низких концентрациях (нанограммы и доли нанограммов на миллилитр) приводит к интенсивным разработкам по усилению сигнала в иммунохроматографии [23–26]. Развитие компьютерного прототипирования устройств обеспечивает возможность управлять последовательностью взаимодействий и проводить несколько аналитических процессов одновременно, используя новые геометрические варианты тест-систем [27–29]. Наконец, прогресс электронных коммуникационных устройств и сетевых ресурсов предоставляет новые средства для обработки больших массивов данных и позволяет применять иммунохроматографию как количественный аналитический метод [30–33]. Все эти факторы вызывают продолжающийся по сей день резкий рост числа научных разработок и публикаций в области иммунохроматографии. (Отметим, что часть статей относится к применению коммерчески доступных тест-систем и не связана с изучением их функционирования.)

В диссертационной работе представлены результаты исследований соискателя, которые проводились с начала 2000-х годов (см. для примера [34–36]) в соответствии с описанными выше направлениями

развития иммунохроматографии и суммированы в рассматриваемых статьях и патентах 2008–2021 гг.

Как следует из вышеизложенного, развитие представлений о межмолекулярных взаимодействиях в иммунохроматографических системах и о путях совершенствования этих систем повышает конкурентный потенциал метода, расширяет масштабы его применения, способствует массовому контролю и эффективной защите здоровья населения. Эти факторы определяют актуальность проведенного исследования, направленного на формирование научных основ совершенствования аналитических и диагностических средств.

### **Степень разработанности темы**

В массиве публикаций по иммунохроматографии (см. рис. 5) лидирующее положение занимают Китай, США, Япония, Великобритания и Испания. Решения различных проблем рассматриваются в работах зарубежных коллективов под руководством De Saeger S. (Бельгия), Elliott C. (Великобритания), Schneider R.J. (Германия), Merkoci A. (Испания), Baggiani C. (Италия), Deng A., Kuang H., Lei H.T., Li P., Song S.S., Wang S.S., Wang Z., Xu C.L., Zhang Y. (Китай), Kim W.G., Paek S.H. (Корея), Corstjens P., Van Amerongen A. (Нидерланды), Hammock B.D., Weigl B.H. (США), Fukal L. (Чехия), Tanaka H. (Япония) и др. Российские работы в области иммунохроматографии описывают 244 статьи, учитываемые проведенным библиометрическим анализом, почти половина из которых (116) выполнена с участием соискателя. Наиболее представлены по публикациям исследования Бикетова С.Ф., Гладышева П.П., Горячевой И.Ю., Еремина С.А., Никитина М.П., Никитина П.И., Осипова А.П., Хлебцова Н.Г., Яркова С.П. и их коллег. Ряд разработок ориентирован на решение технологических вопросов фирм-производителей и не сопровождается или почти не сопровождается научными статьями.

Признавая вклад ведущих научных групп в развитие представлений об иммунохроматографических системах, приходится констатировать, что в общем объеме публикаций подавляющее большинство работ ограничивается единичными демонстрациями возможностей конкретных подходов. Доминируют статьи, в которых стандартные протоколы используются для нового востребованного анализа. Более значимы работы, авторами которых предлагаются изменения состава выявляемых комплексов и последовательности их формирования, а также природы и способов регистрации маркеров, включаемых в эти комплексы. Однако приводимые в статьях описания «историй успеха» обычно не объясняют, какие характеристики системы оказались критичными для снижения предела обнаружения, других значимых улучшений. В ряде случаев декларируемые выигрыши не соответствуют изменениям параметров иммунореагентов и маркеров. Выбор условий получения реагентов и проведения иммунохроматографии либо заменяется воспроизведением стандартных процедур, либо основывается на трудоемком экспериментальном сопоставлении различных сочетаний параметров. Вопрос об универсальности предлагаемых решений, как правило, остается открытым; лишь немногие из них после приоритетной публикации проверяются и применяются для новых объектов.

В связи с этим крайне востребованы общие описания процессов иммунного комплексообразования в проточных мембранных системах, которые пригодны для разных антигенов и разных вариантов проведения взаимодействий. Такая постановка задач применительно к иммунохроматографии является отличительной особенностью данного диссертационного исследования.

### Цель и задачи исследования

Специфика изучаемых систем состоит в многостадийном формировании иммунных комплексов и гетерогенности реагирующих молекул (поликлональные антитела, иммобилизованные и модифицированные иммунореагенты) по кинетическим и термодинамическим характеристикам. Помимо этого, реакции антиген–антитело в ходе иммунохроматографии осуществляются как в растворе, так и на поверхности раздела фаз с разной степенью приближения к химическому равновесию.

С учетом указанных особенностей **цель** работы состояла в выявлении закономерностей взаимодействия антиген–антитело при проведении иммунохроматографии и разработке новых аналитических систем, основанных на применении этих закономерностей.

Достижение поставленной цели включало решение следующих **задач**:

- экспериментальная характеристика способов измерения параметров комплексообразования антиген–антитело;
- описание взаимодействий в иммуноаналитических системах и классификация этих систем;
- теоретическое описание процессов образования комплексов разного состава с участием нативных и модифицированных иммунореагентов;
- характеристика гетерогенных иммуноаналитических систем и способов преодоления их ограничений, определяемых диффузионно-контролируемыми реакциями;
- применение установленных закономерностей взаимодействий антиген–антитело для разработки иммунохроматографических систем с низкими пределами обнаружения и высокой производительностью;

- характеристика эффективности разработанных способов проведения иммунохроматографии при обнаружении и определении содержания соединений разных классов.

### **Методология и методы исследования**

Антигенами – **объектами** исследования – являлись соединения, имеющие значение для медицинской и ветеринарной диагностики, экологического и агротехнического мониторинга, контроля качества и безопасности продуктов питания. Ряд изучаемых объектов включал пестициды, сурфактанты, антибиотики и бактериостатики, пищевые красители, бета-агонисты, микотоксины, фикотоксины, психоактивные вещества, белковые маркеры воспалительных процессов, биомаркеры острого инфаркта миокарда, маркеры для идентификации сырья в мясных продуктах, антитела к аллергенам и клеткам бактерий, вирусные и бактериальные патогены человека, животных и растений.

Исследование антигенов, значительно отличающихся по размерам и иммунохимической валентности, позволило рассмотреть общие и специфические закономерности комплексообразования.

Эксперименты проводились с использованием поли- и моноклональных антител против этих соединений – как полученных в ходе выполнения работы, так и предоставленных коллективами-партнерами и коммерчески доступных. В качестве маркеров для выявления иммунных комплексов применялись ферменты, флуорофору, ультра- и нанодисперсные частицы.

**Методология** исследования предусматривала экспериментальное измерение кинетических и термодинамических констант взаимодействий рассматриваемых иммунореагентов, состава комплексов антигенов и антител друг с другом, с маркерами и носителями, степени сохранения иммунохимических свойств антителами и антигенами после включения в межмолекулярные комплексы, оценку влияния концентраций реагентов,

длительности их взаимодействий, реакционной среды на образование меченых комплексов при проведении иммунохроматографии.

**Методы**, использованные для характеристики получаемых иммунореагентов и межмолекулярных комплексов, образующихся при их взаимодействии и проведении иммунохроматографии, включали фото- и флуориметрию, центрифугирование, жидкостную хроматографию, электрофорез, атомно-силовую, просвечивающую и сканирующую электронную микроскопию, регистрацию динамического светорассеяния, кругового дихроизма, фракционирование в поперечном потоке, микропланшетный иммуноферментный анализ, биосенсорные измерения с регистрацией поверхностного плазмонного резонанса.

**Предметом** разработки являлись математические модели иммунохимических взаимодействий в проточных мембранных системах с участием реагентов разного состава, с разной последовательностью и пространственной локализацией реакций, а также способы проведения взаимодействий реагентов, обеспечивающие требуемые изменения характеристик иммунохроматографических тест-систем.

### **Научная новизна**

Разработаны положения, совокупность которых формирует теоретические основы функционирования иммунохроматографических систем. Правомочность положений подтверждена экспериментально при разработке, характеристике и направленной модификации новых аналитических систем. На основании проведенных исследований:

– установлен вклад поливалентных взаимодействий антиген–антитело в формирование иммунных комплексов и характеристики иммунохроматографических систем;

– предложена иерархическая классификация гетерогенных иммуноаналитических систем на основании видов образующихся и регистрируемых комплексов и последовательности взаимодействий



иммунореагентов; показаны ее возможности для систематизации вариантов проведения иммунохроматографии;

– разработан ряд математических моделей для описания иммунохроматографических систем; на основании рассмотрения моделей предложены и экспериментально проверены рекомендации по изменению характеристик этих систем;

– исследована модуляция параметров иммунохроматографических систем посредством варьирования состава комплексов антиген – белковый носитель и антитело – нанодисперсный носитель;

– предложен и экспериментально подтвержден ряд подходов для обеспечения низких пределов обнаружения аналитов при проведении иммунохроматографии, основанных на изменениях состава регистрируемых комплексов и последовательности их формирования в движущемся потоке реагентов и на поверхности мембран.

### **Теоретическая значимость работы**

1. Установлены зависимости для оценки изменений функционирования иммунохроматографических систем при варьировании концентраций иммунореагентов, длительности и констант их взаимодействия.
2. Проведена оценка реакционной способности антител в адсорбционных комплексах с нанодисперсными носителями.
3. Выявлены характеристики наночастиц, определяющие их эффективность в иммунохроматографических системах.
4. Систематизированы факторы, которые при разных режимах взаимодействий в проточных мембранных системах лимитируют формирование меченых иммунных комплексов.

### **Практическая значимость работы**

Сформирован научный инструментарий для эффективной разработки иммунохроматографических аналитических систем:

- принципы установления факторов, лимитирующих минимальные достоверно выявляемые концентрации аналитов;

- критерии оценки возможностей наночастиц – носителей и маркеров для разрабатываемых аналитических систем:

- способы проведения иммунохроматографии с усилением регистрируемого сигнала.

Получены и охарактеризованы экспериментальные образцы иммунохроматографических систем для выявления и оценки содержания ряда аналитов – представителей:

- токсичных контаминант разных классов в сельскохозяйственной продукции, пищевых продуктах и объектах окружающей среды,

- белковых маркеров патологических процессов в организме человека,

- маркеров, обеспечивающих идентификацию сырья в мясных продуктах,

- специфических антител, выявляемых для серодиагностики инфекционных заболеваний и аллергических реакций,

- возбудителей заболеваний человека, животных и растений.

Проведенная апробация разработанных иммуноаналитических систем подтверждает универсальность созданного научного инструментария, его пригодность для решения различных задач, имеющих социальное и хозяйственное значение.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Математические модели взаимодействий для разных форматов иммунохроматографии и основанные на их изучении рекомендации по реализации иммунохроматографии.

2. Зависимости между условиями получения конъюгатов иммунореагентов, их составом, реакционной способностью

и характеристиками иммунохроматографических систем с их использованием.

3. Критерии оценки наночастиц как маркеров и носителей для иммунохроматографии.

4. Способы варьирования селективности иммуноопределения структурно близких соединений.

5. Способы проведения мультиплексной иммунохроматографии.

6. Способы усиления сигнала и снижения предела обнаружения в иммунохроматографии.

### **Степень достоверности результатов**

Достоверность результатов диссертационной работы определяется использованием взаимодополняющих методов при характеристике иммунореагентов, их производных и процессов их взаимодействия, высокой степенью воспроизводимости результатов, статистическим анализом измеряемых величин, подтверждающим постулируемые корреляции и отличия. В работе показано соответствие закономерностей, наблюдаемых при математическом моделировании и экспериментальном изучении иммунохроматографических систем. Общий характер установленных закономерностей следует из их соблюдения для различных сочетаний антигенов и антител, использовавшихся в иммунохроматографических системах, успешной разработки систем для обнаружения аналитов различной природы – низкомолекулярных, белковых и корпускулярных.

Диссертационные положения реализованы/подтверждены в рамках совместных исследований с коллективами ряда российских и зарубежных научных организаций. Об обоснованности интерпретации полученных результатов свидетельствуют публикации статей по теме диссертационной работы в ведущих рецензируемых международных журналах.

### **Личный вклад автора**

Автором осуществлены выбор направления работ и постановка решаемых задач. В диссертации изложены результаты исследований, выполненных при непосредственном участии автора, а также сотрудниками лаборатории иммунобиохимии, аспирантами и дипломниками, работавшими под научным руководством автора или получавшими его консультации, что отражено в совместных статьях, патентах и сообщениях. В ходе деятельности автора проводились планирование экспериментов, получение, обработка и интерпретация результатов, подготовка публикуемых материалов. Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве, включает анализ соответствия теоретических представлений и экспериментальных данных, описание и обобщение результатов по характеристике иммунохимических взаимодействий и функционирования аналитических систем, подготовку рекомендаций по обеспечению низких пределов обнаружения соединений разных классов и управлению селективностью иммуноаналитических систем, оценку возможностей и конкурентных преимуществ разрабатываемых систем.

### **Структура работы**

Диссертационная работа в форме научного доклада включает семь глав, соответствующих продвижению от измерения параметров иммунохимических взаимодействий к оценке их вклада в функционирование аналитических систем и возможностей иммунохроматографии, реализуемой на основе выбранных подходов.

### **Публикации**

В качестве работ, в которых изложены основные результаты диссертации, представлены 118 статей в изданиях, рекомендуемых ВАК РФ (26 – в отечественных и 92 – в зарубежных), и 2 главы в книгах.

Список содержит 82 статьи, вышедшие в 2013–2021 гг. в журналах, относящихся к первому или второму квартилям международных баз данных: 80 статей согласно базе Web of Science и 82 статьи согласно базе Scopus. Сведения о квартилях основаны на действующих версиях IF Web of Science и SJR Scopus, опубликованных в июле 2021 г. и мае 2022 г., соответственно.

По результатам диссертационного исследования получено 15 патентов РФ на изобретения, 8 патентов РФ на полезные модели и 2 инновационных патента Республики Казахстан на изобретения.

Список публикаций соответствует условиям представления диссертационной работы на соискание ученой степени доктора наук в форме научного доклада, установленным постановлением Правительства РФ от 20 марта 2021 г. № 426 и приказом Министерства науки и высшего образования РФ от 7 июня 2021 г. № 458 с учетом порядка применения этих условий в 2022 г., определенного постановлением Правительства РФ от 19 марта 2022 г. № 414.

### **Связь с государственными программами**

Представленные в диссертационной работе результаты получены в рамках проектов Федеральных целевых программ (ФЦП) «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники», «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России», «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», «Развитие инфраструктуры nanoиндустрии в Российской Федерации», Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии», программ фундаментальных исследований Президиума РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), Российского научного фонда (РНФ), в том числе проектов ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»

№№ П975, 8464, РФФИ №№ 10-03-00990, 13-04-90451, 14-03-00753, 17-33-50179, РФФИ №№ 14-16-00149, 19-16-00108, руководителем которых являлся (является) автор.

Диссертационное исследование обеспечивает научно-методические основы производства аналитических систем, значимых для научно-технологического развития России. За разработки иммуноаналитических систем А.В. Жердев в составе авторского коллектива удостоен Премии Правительства РФ в области науки и техники за 2010 год.

### **Апробация результатов работы**

Результаты, полученные в ходе исследований и вошедшие в диссертационную работу, представлены соискателем и соавторами более чем на 80 научных мероприятиях в России и за рубежом, включая такие значимые мероприятия, как Московские международные конгрессы «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (Москва, 2009, 2010, 2011, 2013, 2015, 2017), Всероссийские конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика» (Йошкар-Ола, 2009; Светлогорск, 2014, Углич, 2016; Пермь, 2019), VI, VII Symposiums on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis (Гент, Бельгия, 2010, 2014), V, VIII, IX International Symposiums on Recent Advances in Food Analysis (Прага, Чехия, 2011, 2017, 2019), Международные симпозиумы «Астана Биотех» (Астана, Казахстан, 2011, 2018), IV Nanotechnology International Forum (Москва, 2011), V, VI Nanoscience with Nanocrystals Conferences (Фуенжерола, Испания, 2012; Бад Хофгастейн, Австрия, 2014), II и III Съезды аналитиков России (Московская обл., 2013, 2017), XXXVIII, XLIV FEBS Congresses (Санкт-Петербург, 2013; Краков, Польша, 2019), ISM – MycoRed International Conference Europe 2013 (Мартина-Франка, Италия, 2013), XVIII European Conference in Analytical Chemistry (Бордо, Франция, 2015), IX, X, XI, XII International Conferences on Instrumental Methods of Analysis (Каламата,

Греция, 2015, 2017, 2019, 2021), XI Workshop on Biosensors and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis (Регенсбург, Германия, 2015), International Conferences «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (Московская обл., 2015, 2017), V, VI Съезды биохимиков России (Дагомыс, 2016, 2019), International Conference «Mycotoxin Research in Agricultural Products» (Шанхай, Китай, 2017), International Workshop of Pesticide Risk Assessment Model Building (Сиань, Китай, 2017), APEC Conference «Advanced Capacity Building for Mycotoxin Prevention and Control in Food and Feed Commodities in Asia-Pacific» (Пекин, Китай, 2017), XL International Conference on Environmental and Food Monitoring (Сантьяго-де-Компостелла, Испания, 2018), World Conference on Analytical and Bio Analytical Chemistry (Барселона, Испания, 2018), XXI Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (Санкт-Петербург, 2019), XIX International Symposium on Soil and Plant Analysis (Вагенинген, Нидерланды, 2019), XXXI Anniversary World Congress on Biosensors (2021), Online European Biotechnology Congress (2021), VI International Congress on Biomaterials and Biosensors (Олудениц, Турция, 2021).

Итоговые доклады, отражающие основные результаты диссертационной работы, представлены А.В. Жердевым на Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2019), Euroanalysis XX Conference (Стамбул, Турция, 2019), V Международной конференции «Наноматериалы и живые системы» (Казань, 2019), II Всероссийской конференции «Химия биологически активных веществ» (Саратов, 2019) и XIV Международном биотехнологическом форуме «РосБиоТех» (Москва, 2020).

Диссертационная работа представлена 1 апреля 2022 г. на межлабораторном семинаре, по результатам которого 14 апреля 2022 г. дано заключение ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН как организации, в которой выполнялась работа.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

### Глава 1. Измерение количественных характеристик иммунохимических взаимодействий

#### Общая характеристика исследований по данному направлению

На сегодняшний день исследователи располагают общими методами химической кинетики, активно используемыми для описания иммунореагентов [37,38]. Стандартной характеристикой антител является их аффинность, отражающая равновесную константу связывания с антигеном [39]. Однако применительно к функционированию иммунореагентов в гетерогенных проточных системах эти величины недостаточно информативны. В неравновесных условиях не успевают проявиться параметры диссоциативных реакций, а вклад в процессы ассоциации диффузии и перемешивания не менее важен, чем связывающих свойств реагентов [40].

Рассмотрение особенностей микропланшетных иммуноферментных систем и проточных иммуночипов привело к критической оценке и адаптации традиционного химико-кинетического инструментария, отраженной в работах Englebienne P, Friguet B., Бобровника С.А. и их соавторов [41-43] и продолжающейся до настоящего времени [44,45], тогда как компоненты иммунохроматографических систем по-прежнему характеризуют с использованием величин, соответствующих более простым условиям взаимодействий [46-48]. Поэтому выбор наиболее значимых параметров реакций антиген–антитело и оценка способов их измерения крайне востребованы для информативного описания иммунохроматографических процессов.

---

См. №№ С4, С8, С13, С14, С26, С58, С63, С92, С97, С116 «Списка научных публикаций ...» с указанием изданий и авторских коллективов.



### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Задача проведенного исследования состояла в том, чтобы сравнить подходы к измерению параметров иммунохимических взаимодействий и рассмотреть способы повышения их достоверности и точности, а также измерить эти параметры для сочетаний антител и антигенов разной природы с целью использования в численной характеристике моделей иммунохроматографических систем.

Экспериментальная работа по данному направлению включала изучение трех групп антигенов:


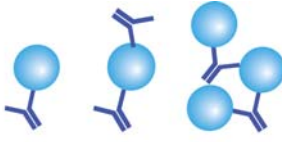
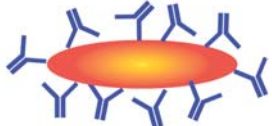
- низкомолекулярные моновалентные антигены (пестициды, антибиотики),
- белковые поливалентные антигены (биомаркеры патологий и дисфункций),
- корпускулярные поливалентные антигены с высокой степенью повторяемости детерминант (бактериальные и вирусные патогены растений и человека).

Помимо нативных антигенов, изучались (как средства регистрации формирующихся иммунных комплексов и как аналитические реагенты) межмолекулярные конъюгаты: низкомолекулярных антигенов с белковыми носителями, флуорофорами и ферментами, антител с ферментами, антигенов и антител с наночастицами. Наряду с антителами, были охарактеризованы аптамеры как альтернативные рецепторные молекулы, рассмотрены их реакции с лигандами.

Кинетические и равновесные параметры взаимодействий регистрировали с помощью методов поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, равновесного диализа, иммуноферментного анализа, иммуносенсорного анализа с регистрацией поверхностного плазмонного резонанса, сопоставляя структурно близкие антигены, нативные антитела и их производные, межмолекулярные конъюгаты разного состава. В табл. 1 дана

сравнительная оценка возможностей различных подходов при работе с тремя группами антигенов.

**Таблица 1.** Основные классы антигенов и оценка наиболее эффективных способов измерения параметров их взаимодействия с антителами

Подходы к измерению <u>констант взаимодействия</u>	Низкомолекулярные соединения 	Белки 	Корпускулярные антигены 
Разделение иммунных комплексов и непрореагировавших молекул	<b>X</b>		<b>X</b>
Разделение комплексов разного состава		<b>X</b>	
Использование иммобилизованных иммунореагентов	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>
Регистрация сигналов, модулируемых при комплексообразовании	<b>X</b>		

Рекомендуемые способы отмечены знаками «X».

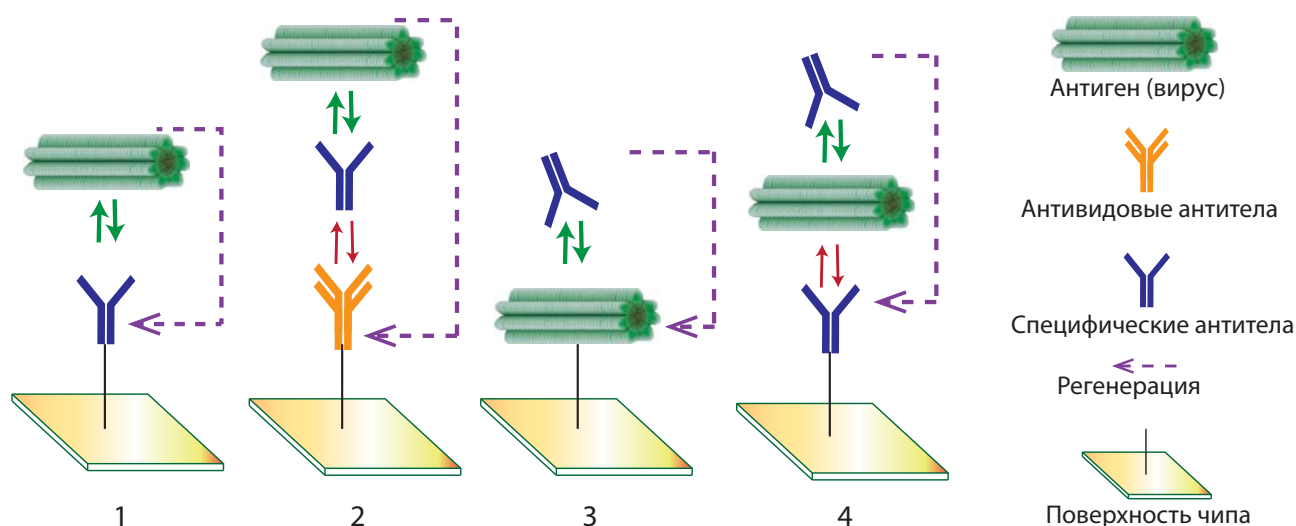
Для методов, основанных на регистрации комплексообразования в растворе в режиме реального времени (гомогенные системы с флуоресцентными маркерами), предложен алгоритм последовательного измерения равновесных констант связывания вначале с меченым анализом, а потом, с учетом полученных характеристик, – с нативным, конкурирующим за связывание с рецептором. Установлены требования к точности изменений, обуславливающие выбор концентраций реагентов. Для антител и аптамеров изучены кинетики гомогенных взаимодействий с нативными и мечеными низкомолекулярными анализатами.

Для описания равновесия антиген–антитело в растворе с помощью микропланшетных систем проведена оценка условий (концентраций

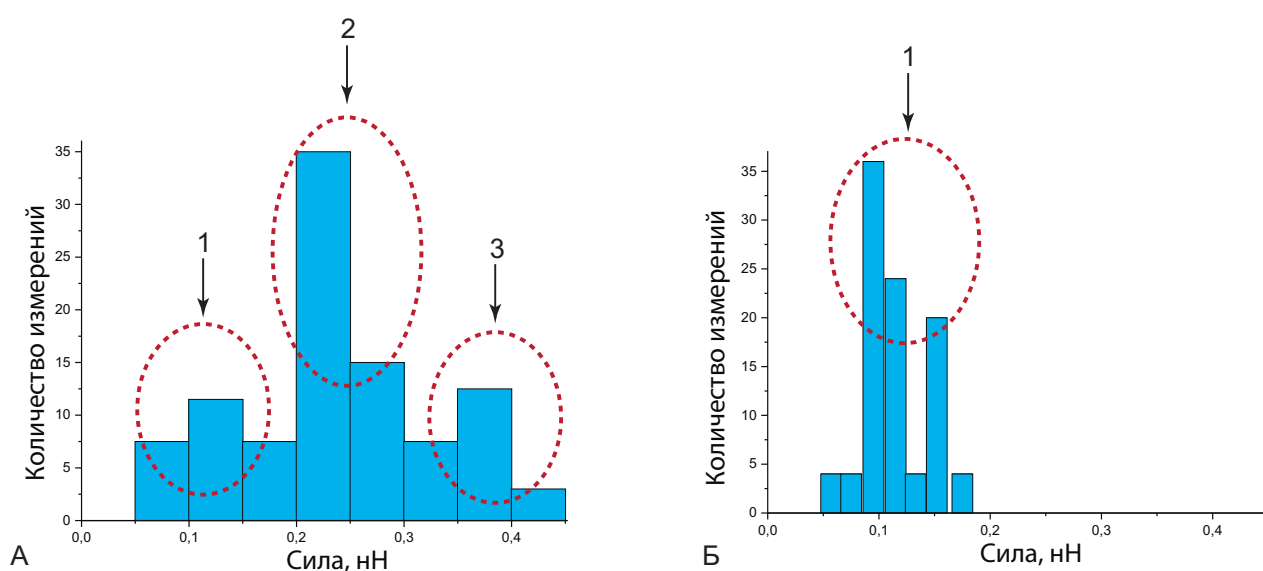
реагентов, длительности инкубаций), в которых конкурентное взаимодействие антител с иммобилизованным антигеном не вызывает значимых сдвигов равновесия реакции антиген–антитело в растворе и позволяет корректно регистрировать константы взаимодействия. С использованием иммуносенсорных технологий сопоставлены аффинности комплексов поливалентных антигенов с нативными антителами и их Fab-фрагментами, показано отличие равновесных констант связывания в 50–100 раз. Отмечено, что высокоаффинные бивалентные связывания иммуноглобулин–антиген для неконкурентных аналитических систем приводят к снижению пределов обнаружения, а для конкурентных – к их росту.

Для регистрации комплексообразования в проточных сенсорных системах предложены схемы экспериментов с непрямой иммобилизацией антител (посредством реакции биотин–стрептавидин, связывания иммуноглобулинов с антивидовыми антителами и др.) – рис. 6. Данный подход позволяет проводить последовательные измерения с новыми добавляемыми препаратами антител, контролируя их количество и исключая риски инактивации, характерные для измерений с прямой иммобилизацией антител и элюцией связавшихся антигенов. Аналогичным образом реализована не прямая иммобилизация антигенов. Высокая воспроизводимость измерений с помощью данного подхода показана на примерах взаимодействий с антителами вирусных антигенов (X- и Y-вирусы картофеля).

Рассмотрены возможности метода атомно-силовой микроскопии с иммобилизацией антител на кантилевере для регистрации параметров единичных взаимодействий антиген–антитело – рис. 7. Данный подход, отражая реакционную способность индивидуальных молекул, дополняет выявление реагентов с разной аффинностью по концентрационным зависимостям связывания, получаемым традиционными химико-кинетическими методами.



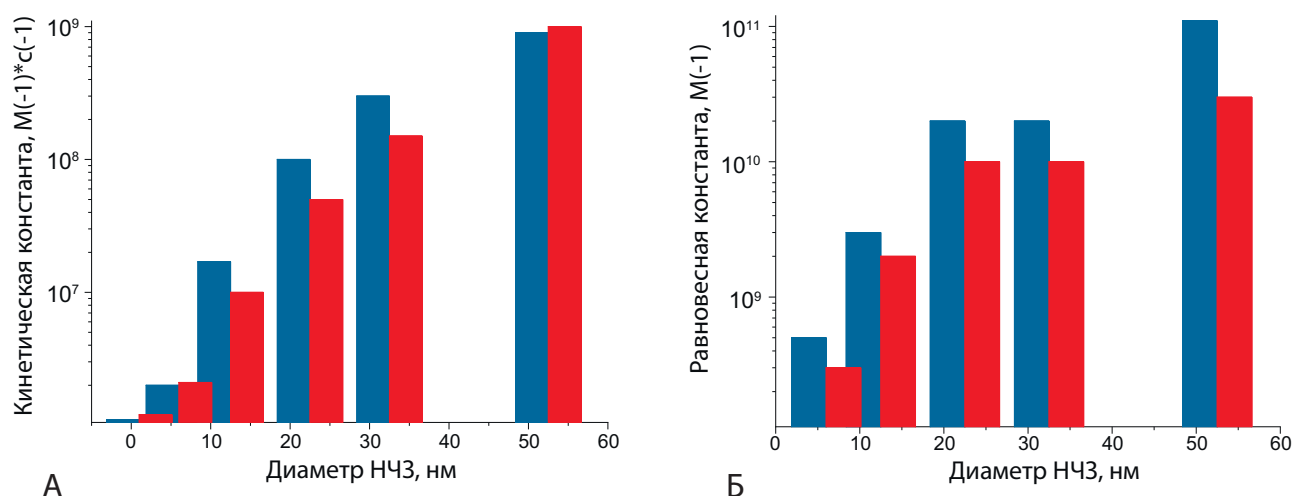
**Рис. 6.** Принцип сменной иммобилизации иммунореагентов на поверхности биосенсорных чипов для регистрации межмолекулярных взаимодействий. Схемы формирования комплексов для прямой (1, 3) и непрямой (2, 4) иммобилизации специфических антител (1, 2) и антигенов (3, 4) (на основании [С8])



**Рис. 7.** Гистограммы распределения сил взаимодействия ковалентно связанных с кантилевером специфических (А) и неспецифических (Б) антител и иммобилизованного на подложке вируса шарки сливы, регистрируемых методом атомно-силовой микроскопии. Пики 1–3 соответствуют неспецифическим, специфическим моновалентным и специфическим бивалентным взаимодействиям (на основании [С13])

С использованием сформированного методического инструментария установлены кинетические и равновесные константы связывания ряда иммунохимических реагентов, используемые в работе для описания межмолекулярных взаимодействий в ходе иммунохроматографии и разработки аналитических систем. Охарактеризовано влияние на

изменения связывающих свойств иммунореагентов разных факторов, в частности, рост аффинности комплексов антитело – нанодисперсный носитель с увеличением размеров носителя – рис. 8.



**Рис. 8.** Кинетические (А) и равновесные (Б) константы ассоциации реакции вируса шарки сливы и конъюгатов двух клонов антител (серые и красные столбцы) с наночастицами золота разного диаметра (на основании [С8])

Изучено влияние состава комплексов антитело – нанодисперсный носитель на параметры их взаимодействия с антигенами разной природы – см. пример изменения равновесных констант диссоциации для корпускулярного антигена в табл. 2.

**Таблица 2.** Равновесные константы диссоциации для взаимодействия клеток *Helicobacter pylori* и моноклональных антител к ним, иммобилизованных на наночастицах золота (диаметр  $25.3 \pm 4,6$  нм) при разных соотношениях реагентов в ходе иммобилизации (на основании [С43])

Концентрация антител, мкг/мл	Мольное соотношение антитело: наночастица	$K_D$ , М
0.1	1,2 : 1	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-10}$
0.3	3,8 : 1	$(9,1 \pm 0,9) \times 10^{-10}$
0.5	6.4 : 1	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^{-11}$
1.5	19 : 1	$(6,6 \pm 0,3) \times 10^{-10}$
3	38 : 1	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^{-11}$
5	64 : 1	$(2,7 \pm 0,3) \times 10^{-11}$

10	129 : 1	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^{-11}$
19	245 : 1	$(3,7 \pm 0,3) \times 10^{-11}$

### Общая оценка полученных результатов

Сопоставлены способы измерения параметров иммунных взаимодействий, охарактеризованы их возможности применительно к разным классам антигенов. Предложены усовершенствованные методики, повышающие достоверность получаемых результатов. Проведена оценка вклада бивалентного связывания антител с поливалентными антигенами в характеристики иммунохимической реакции. Измерены равновесные и кинетические параметры для взаимодействий сочетаний антигенов разных классов с антителами и комплексами антитело – наночастица, обеспечивающие возможность численной характеристики моделей иммуноаналитических систем.

## Глава 2. Классификация и математическое моделирование иммунохроматографических систем

### Общая характеристика исследований по данному направлению

Для описания разнообразия форматов проведения иммуноанализа предложен ряд классификаций [49–52], но их структура не позволяет рассматривать общие свойства и особенности различных форматов. Новые разработки сложных аналитических схем могут быть соотнесены только с крупными группами классификаций (например, с прямым или непрямым мечением антигенов или антител), что не позволяет детально рассмотреть их отличительные особенности и преимущества.

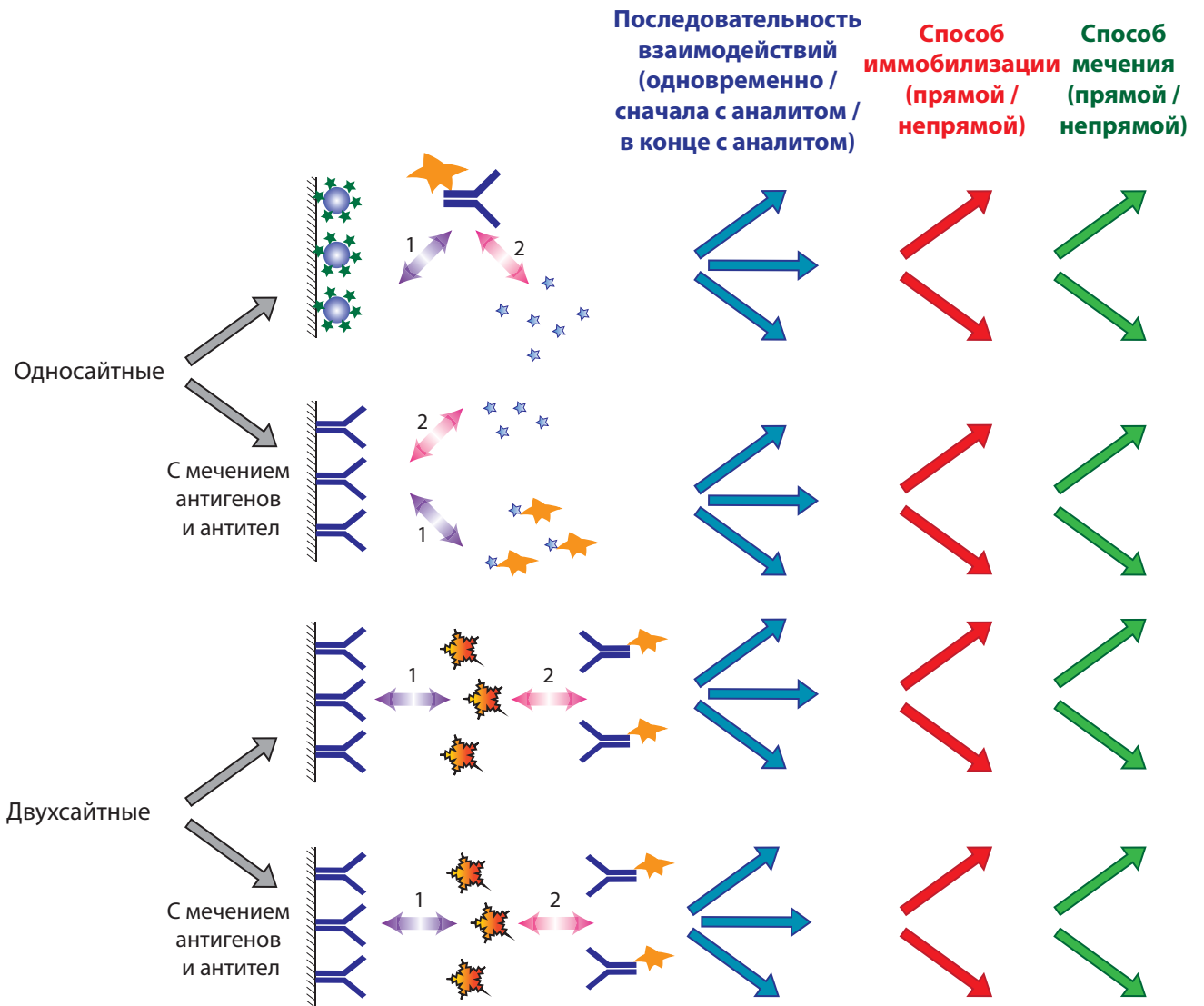
В отсутствии единой эффективной классификации разрозненными остаются и теоретические рассмотрения взаимодействий в иммунохроматографических системах. Первые модели конкурентной и «сэндвич» иммунохроматографии, разработанные Qian S.Z. и Bau H.H. [53,54], описали процессы формирования выявляемых иммунных комплексов, но использовали ряд упрощений и не учитывали отличия систем при разной степени приближения взаимодействий в них к химическому равновесию. Последующие разработки [55–60] преимущественно ориентировались на численную характеристику моделей иммунохроматографических систем, оставляя открытым вопрос о том, насколько общими являются интерпретации, основанные на ограниченном объеме расчетных данных. В сложившейся ситуации востребованность предложенных моделей иммунохроматографических систем остается ограниченной. Выбирая режим проведения иммунохроматографии, разработчики предпочитают теоретическим рекомендациям перебор с комбинированием вариантов или пошаговую мультипараметрическую оптимизацию, несмотря на их трудоемкость.

---

См. №№ С18, С20, С25, С39, С48, С51, С64, С96, С116 «Списка научных публикаций ...» с указанием изданий и авторских коллективов.

Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Предложена классификация форматов гетерогенных иммунохимических либо иных лиганд–рецепторных аналитических систем с последовательным выделением групп на основании единой иерархии критериев, представленной на рис. 9.



**Рис. 9.** Критерии классификации форматов гетерогенного иммуноанализа (на основании [С39])

Принципиальная особенность данной классификации заключается в том, что на каждом ее этапе все группы разделяются по одному и тому же критерию, исходя из отличий процессов образования выявляемых комплексов иммунореагентов, а не индивидуальных особенностей конкретных аналитических систем. Способы регистрации образующихся



меченых иммунных комплектов вынесены за рамки классификационной иерархии и могут учитываться дополнительно для каждой из выделяемых групп.

Показано, что предложенная общая классификация отражает разнообразие форматов иммунохроматографии с гетерогенными взаимодействиями в тестовой (аналитической) зоне рабочей мембраны – месте генерации регистрируемого сигнала.

Классификация формирует полную структуру из  $2 \times 2 \times 3 \times 2 \times 2 = 48$  вариантов, каждый из которых соответствует реализованному или потенциально реализуемому способу проведения взаимодействий с последующей оценкой содержания аналита на основании количества образовавшихся меченых иммунных комплексов. Варианты охватывают как основные форматы, используемые в массово производимых иммуноаналитических системах, так и решения, предлагавшиеся в литературе для преодоления ограничений основных форматов.

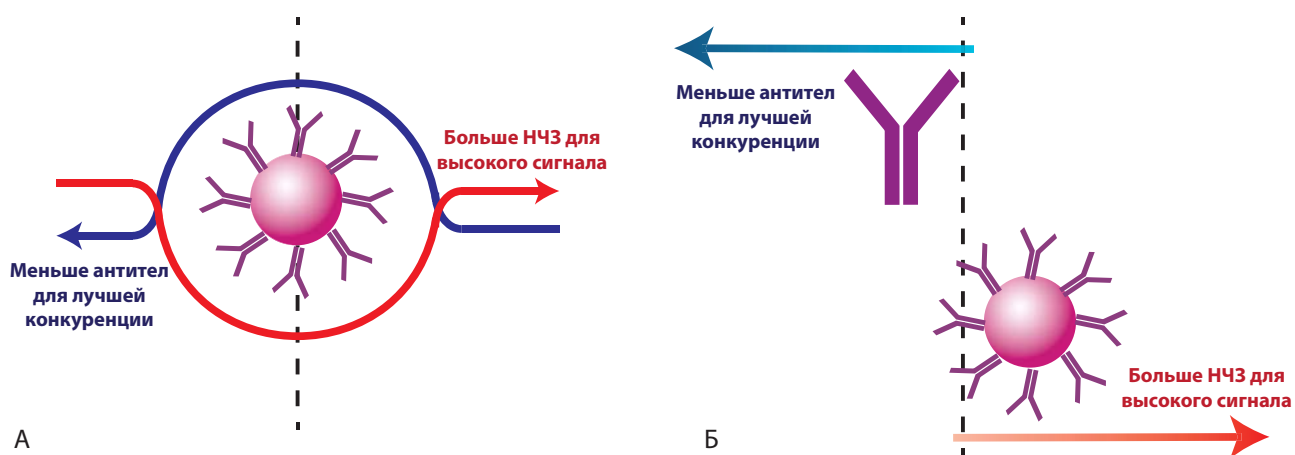
Комбинаторная полнота вариантов, описываемых классификацией, позволяет:

- использовать единые подходы при рассмотрении форматов, относящихся к одной и той же классификационной группе;
- рекомендовать для улучшения характеристик иммуноанализа подходы, успешно реализованные для аналогичных форматов.

Так, разные последовательности формирования выявляемых иммунных комплексов, отраженные в классификации, были реализованы для серодиагностических иммунохроматографических систем. Это позволило, наряду с традиционно используемым вариантом с иммобилизацией антигена в тестовой зоне и мечением антивидовых антител, охарактеризовать теоретически и экспериментально еще два варианта серодиагностики и показать их преимущества.

Принцип непрямой иммобилизации иммунореагентов был использован в разных входящих в классификацию форматах

иммунохроматографии и обеспечил как быстрое приближение к равновесию благодаря переводу исходно гетерогенных взаимодействий в гомогенные условия, так и достижение оптимальной стехиометрии выявляемых меченых иммунных комплексов в результате независимого варьирования концентраций специфических антител и наночастиц–маркеров (рис. 10).



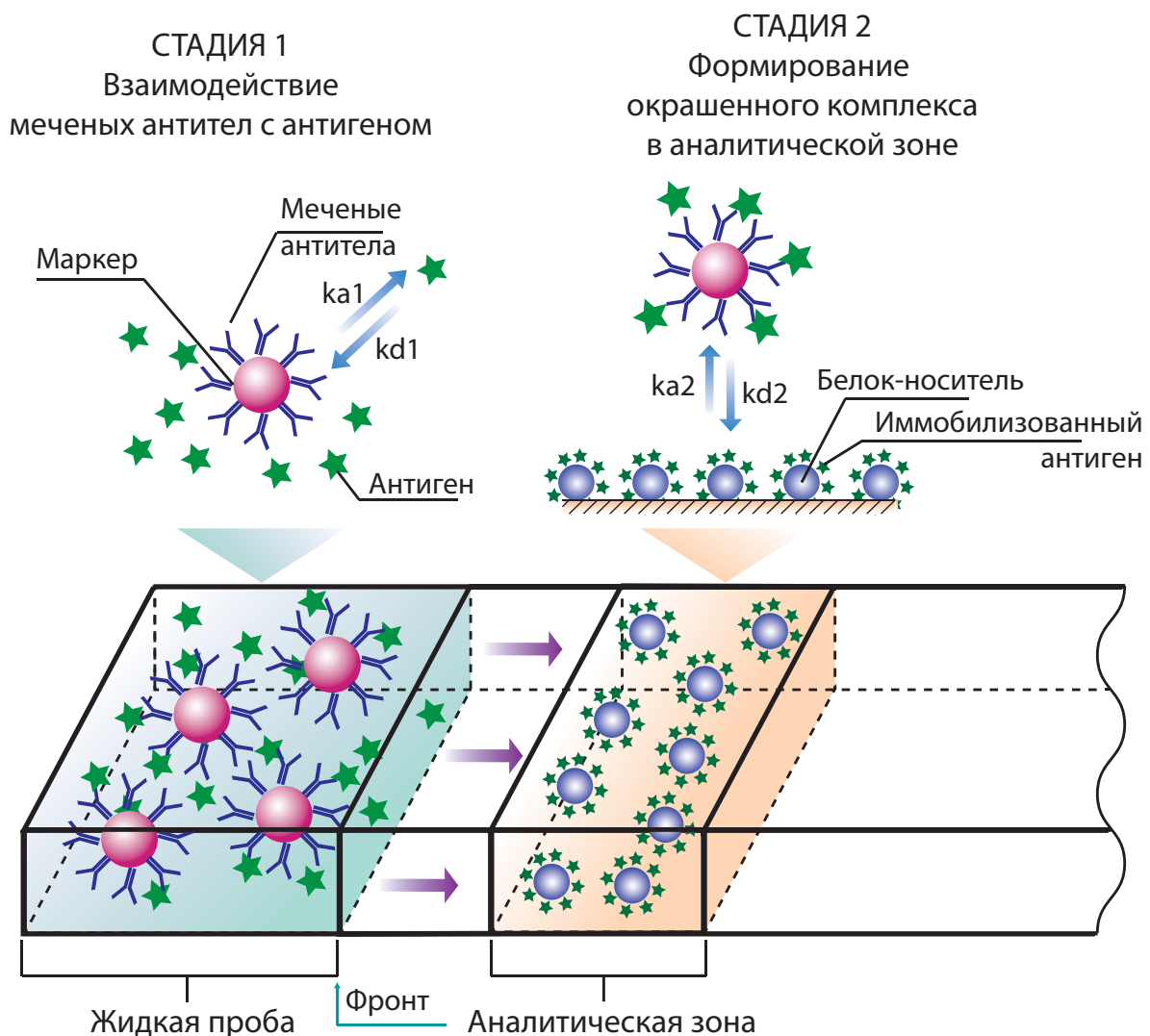
**Рис. 10.** Сравнение возможностей выбора условий проведения конкурентной иммунохроматографии для обеспечения высокого уровня сигнала и низкого предела обнаружения при прямом (А) и непрямом (Б) мечении специфических антител наночастицами (на основании [С50,С51])

Эффективность прединкубации аналита в пробе с конъюгатом антитела – нанодисперсный маркер, приводящей к существенным снижениям пределов обнаружения, показана как для конкурентных, так и для неконкурентных форматов иммунохроматографии.

Изучены преимущества, обеспечиваемые замедленным высвобождением конъюгированных с антителами наночастиц из пор модифицированных или дополнительных мембранных носителей и проявляющиеся как возможности управлять последовательностью и продолжительностью взаимодействий реагентов, увеличивая количество регистрируемых меченых иммунных комплексов. Данные эффекты воспроизводятся для различных представленных в классификации форматов иммунохроматографии.

С учетом разработанной классификации проведены работы по математическому моделированию иммунохроматографических систем и изучению моделей.

Предложены модели ряда форматов иммунохроматографии, особенностью которых является раздельное рассмотрение близких к равновесию гомогенных и неравновесных гетерогенных взаимодействий. Исходя из возможных параметров реакций антиген-антитело, показана корректность описания формирования на мембране регистрируемых меченых иммунных комплексов как процесса, незначительно влияющего на химическое равновесие в потоке, движущемся по порам тест-полоски (рис. 11).



**Рис. 11.** Используемая при математическом моделировании схема гомогенных и гетерогенных двухстадийных взаимодействий в конкурентном формате иммунохроматографии (на основании [С96])

Описание иммунного комплексообразования как процесса, необратимого за время проведения иммунохроматографии, упрощает моделирование взаимодействий и в ряде случаев позволяет перейти от численных решений для конкретных значений констант к общим алгебраическим решениям (см. в качестве примера описание конкурентной иммунохроматографии на рис. 12).

A – анализ (антиген) в пробе;

P – антитела в составе конъюгата с маркером;

R – рецептор (иммобилизованный в тестовой зоне антиген);

A AP, PR – образующиеся иммунные комплексы;

$k_{a1}$ ,  $k_{d1}$  – кинетические константы ассоциации и диссоциации иммунных взаимодействий;

t – время взаимодействия в потоке;

$t_1$  – время взаимодействия в тестовой зоне

$$\frac{d([Ab])}{dt} = k_{d1} \cdot [AgAb] - k_{a1} \cdot [Ag] \cdot [Ab]$$

$$\frac{d[Ag]}{dt} = k_{d1} \cdot [AgAb] - k_{a1} \cdot [Ab] \cdot [Ag]$$

Б

$$\frac{d[AgAb]}{dt} = k_{a1} \cdot [Ag] \cdot [Ab] - k_{d1} \cdot [AgAb]$$

$$\frac{d[iAg]}{dt} = k_{d2} \cdot [iAgAb] - k_{a2} \cdot [iAg] \cdot [Ab] \cdot h$$

$$\frac{d[iAgAb]}{dt} = k_{a2} \cdot [iAg] \cdot [Ab] - k_{d2} \cdot [iAgAb] \cdot h$$

$$h = \begin{cases} \text{время} < T, 0 \\ \text{либо, } 1 \end{cases}$$

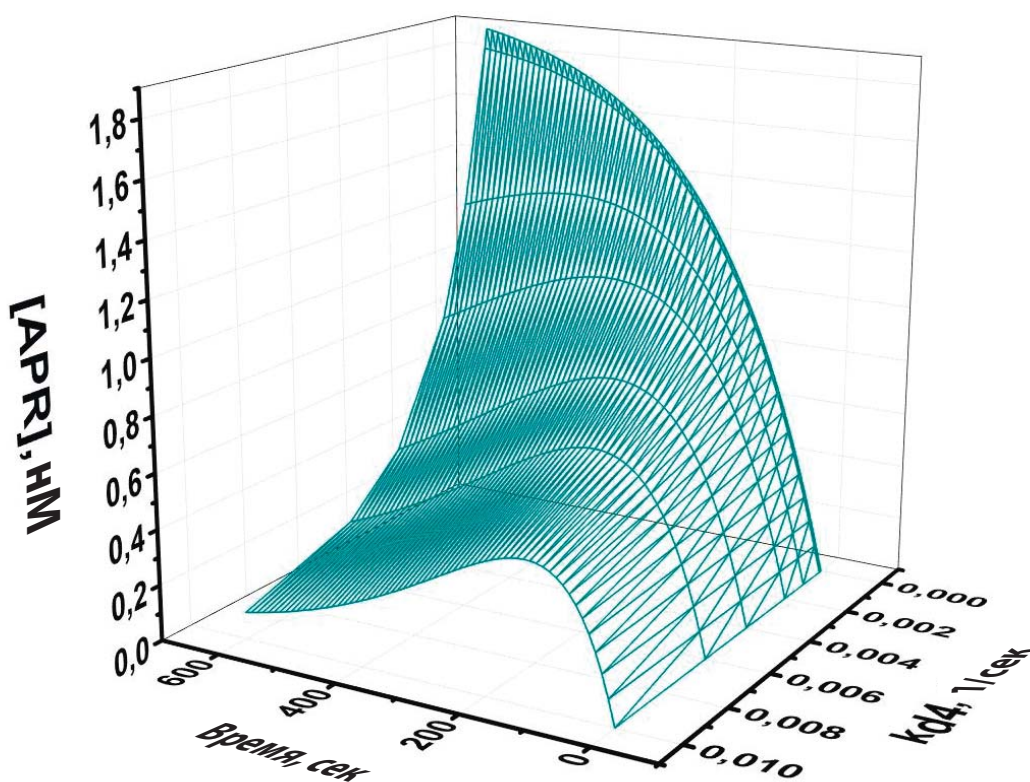
$$[R] = [R_0] \left( \frac{[A_0] - [P_0] e^{T k_{a1} ([P_0] - [A_0])}}{[A_0] - [P_0] e^{t k_{a1} ([P_0] - [A_0])}} \right)^{\frac{k_{a2}}{k_{a1}}}$$

В

$$[PR] = [R_0] - [R] = [R_0] \left( 1 - \left( \frac{[A_0] - [P_0] e^{T k_{a1} ([P_0] - [A_0])}}{[A_0] - [P_0] e^{t k_{a1} ([P_0] - [A_0])}} \right)^{\frac{k_{a2}}{k_{a1}}} \right)$$

**Рис. 12.** Предложенная модель конкурентной иммунохроматографии: рассматриваемые параметры (А), система дифференциальных уравнений для описания изменений концентраций реагентов (Б) и формулы для расчета концентраций реагентов в тестовой зоне (В) (на основании [С96])

Хорошее совпадение алгебраических описаний и результатов численного моделирования с использованием программного пакета COPASI подтвердило корректность положений, принятых при разработке математических моделей. На основании алгебраического и численного изучения моделей описано влияние концентраций реагентов, констант комплексообразования и продолжительностей стадий иммунохроматографии на концентрацию выявляемых меченых иммунных комплексов, т.е. на регистрируемый сигнал (см. для примера рис. 13).

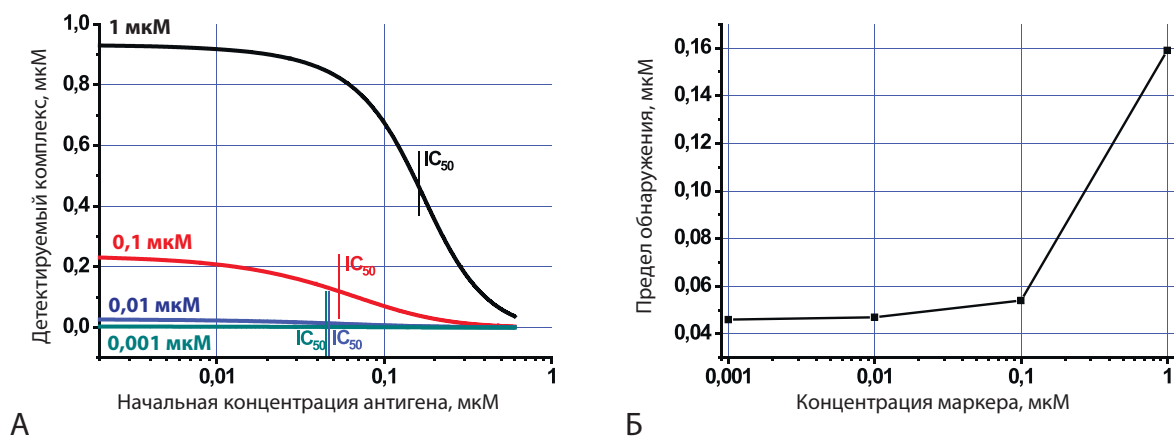


**Рис. 13.** Пример численного моделирования иммунохроматографической тест-системы, отражающий возможность монотонных и немонотонных изменений количества выявляемых иммунных комплексов ( $[APR]$ ) в зависимости от характеристик иммунореагентов и условий взаимодействия

Исходя из полученных данных, установлены факторы, лимитирующие предел обнаружения при использовании иммунохроматографических тест-систем, а также требования к условиям, обеспечивающим достижение минимальных значений  $PrO$ . Эффективность этих требований экспериментально проверена как для

низко-, так и для высокомолекулярных антигенов, выявляемых с помощью иммунохроматографических тест-систем.

Так, в конкурентном формате иммунохроматографии снижение концентрации конъюгата антитела – нанодисперсный маркер позволяет уменьшить предел обнаружения, но за счет снижения степени связывания маркера, т.е. меньшей достоверности и точности диагностики (рис. 14). Поэтому данное варьирование должно быть скомпенсировано ростом концентрации антигена в тестовой зоне.

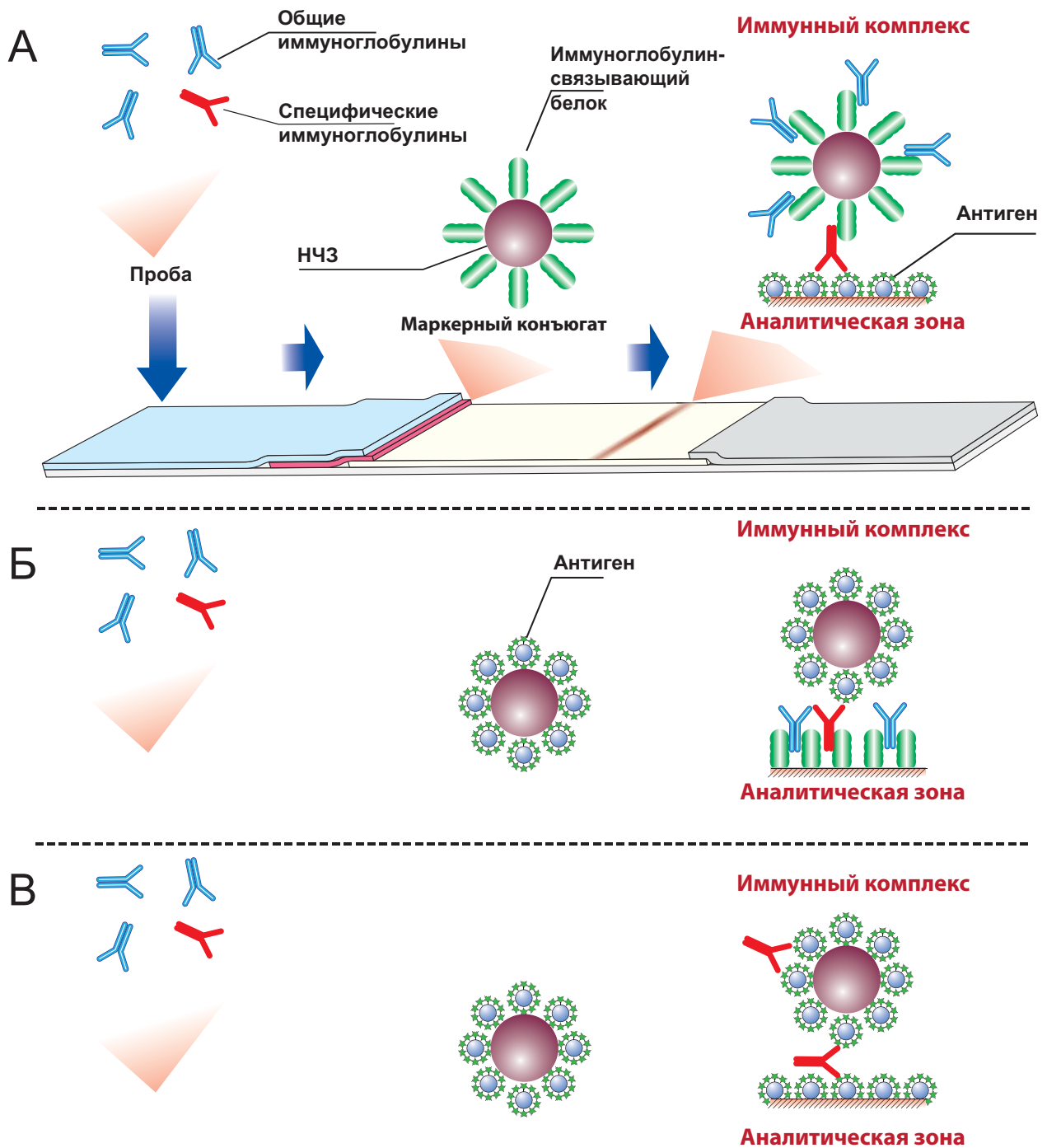


**Рис. 14.** Результаты расчетов изменений концентрационных зависимостей аналитического сигнала (А) и предела обнаружения (Б) в конкурентном формате иммунохроматографии при варьировании концентрации маркера, конъюгированного с антителами (на основании [С96])

Для снижения предела обнаружения в «сэндвич»-иммунохроматографии следует использовать насыщающие концентрации антител в конъюгате с маркером и в тестовой зоне, а при наличии двух клонов антител иммобилизовать более аффинные антитела в тестовой зоне, а менее аффинные – на поверхности частиц-маркеров.

Рассмотрены особенности серодиагностики как варианта «сэндвич»-иммунохроматографии с необходимостью выявления антител, специфичных к определенному аналиту, на фоне неспецифических иммуноглобулинов, содержание которых в пробах выше в десятки-сотни раз. Теоретически и экспериментально сопоставлены варианты

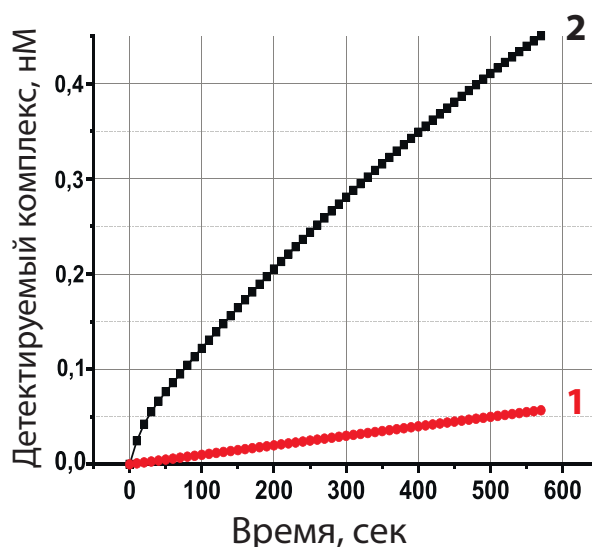
серодиагностики, отличающиеся составом и последовательностью формирования выявляемых иммунных комплексов (рис. 15).



**Рис. 15.** Отличия взаимодействий и состава выявляемых комплексов в традиционном (А) и альтернативных (Б, В) форматах иммунохроматографической серодиагностики (на основании [С116])

Показано, что изменение формата иммунохроматографической серодиагностики с исключением конкуренции иммуноглобулинов

за ограниченное число сайтов связывающих их белков на поверхности наночастиц–маркеров обеспечивает рост аналитического сигнала (рис. 16) и выявление на один-два порядка меньших концентраций специфических антител. Практический результат этого эффекта состоит в достоверной идентификации проб с низким содержанием специфических антител, приближающей серодиагностическую иммунохроматографию к инструментальным иммуноаналитическим методам по диагностической чувствительности (табл. 3).



**Рис. 16.** Расчетные данные по кинетике формирования регистрируемых комплексов для двух форматов иммунохроматографической серодиагностики: 1 – с иммобилизацией антигена в тестовой зоне, а иммуноглобулин-связывающего белка – на поверхности наночастиц–маркеров, 2 – с обратной локализацией иммобилизуемых реагентов (на основании [С64])

**Таблица 3.** Результаты серодиагностики туберкулеза с использованием ИФА и двух форматов иммунохроматографии (на основании [С64])

№№ сывороток	ИФА		ИХ, формат А		ИХ, формат Б	
	$A_{450}$	Рез-т	Интенсивность окрашивания, отн.ед.	Рез-т	Интенсивность окрашивания, отн.ед..	Рез-т
1	0,053	–	0	–	0,5	–
2	0,155	+	0	–	2,2	+
3	0,158	+	0	–	1,9	+
4	0,148	+	0	–	3,4	+
5	0,056	±	0	–	0,5	–
6	0,146	+	0,2	–	0,4	–
7	0,222	+	0,1	–	6,8	+



8	0,140	+	0	–	4,1	+
9	0,620	+	3,9	+	11,0	+
10	0,120	+	0,2	–	0,3	–
11	0,051	–	0,1	–	0	–
12	0,042	–	0	–	0	–
13	0,175	+	0,2	–	8,5	+
14	0,050	–	0	–	0	–
15	0,069	±	0,2	–	0	–
16	0,206	+	0	–	0,7	+
17	0,190	+	0,1	–	7,7	+
18	0,361	+	0	–	12,1	+
19	0,006	–	0	–	0	–
20	0,127	+	0	–	6,5	+
21	0,302	+	2,4	+	4,3	+
22	0,025	–	0,5	–	0,3	–

Обозначения форматов ИХ (А) и (Б) – как на рис. 15. Интенсивность окрашивания тестовой зоны измерялась с помощью фотометра «Рефлеком». Измерения для проб, идентифицированных по результатам тестирования как положительные ( $A_{450} > 0,1$ ; интенсивность окрашивания  $> 0,6$ ), выделены зеленой заливкой

### Общая оценка полученных результатов

Предложена простая иерархическая классификация форматов гетерогенного иммуноанализа, основанная на общих признаках состава и порядка формирования иммунных комплексов. Показана ее пригодность применительно к иммунохроматографии и прогностическая эффективность при поиске решений по изменению аналитических характеристик.

Разработан комплекс математических моделей, описывающих межмолекулярные взаимодействия и образование детектируемых комплексов в востребованных форматах иммунохроматографии. На основании изучения этих моделей установлены факторы, лимитирующие аналитические характеристики тест-систем. Сформулированы и экспериментально подтверждены рекомендации по снижению пределов обнаружения, повышению диагностической достоверности иммунохроматографии.

### **Глава 3. Свойства ультрадисперсных носителей и их функционирование в иммунохроматографических системах**

#### Общая характеристика исследований по данному направлению

Нано- и субмикроразмерные частицы используются в иммунохроматографии в качестве выявляемых маркеров и носителей для иммунореагентов. Этот выбор упрощает аналитические методики, позволяя регистрировать формирование иммунных комплексов на мембранах в режиме реального времени – по оптическому или иному сигналу от связанного маркера. Большая суммарная площадь препаратов частиц ускоряет взаимодействия на их поверхности и обеспечивает экспрессность тестирования [20,21,61].

Варианты маркеров в массово производимых тест-системах сводятся к наночастицам золота (НЧЗ) и окрашенным латексным частицам. Хотя для ряда альтернативных маркеров показаны существенные снижения ПрО – см. обзоры [62–67], связи параметров частиц и характеристик тест-систем с их использованием рассматриваются в единичных исследованиях [68–70] и не оформлены как универсальные выводы. Выбор размеров частиц, состава их конъюгатов с антителами, способа конъюгирования апеллирует к немногим рекомендациям [46,71], границы применения которых дискутируются. Разрознены и представления о том, в какой степени конъюгаты сохраняют реакционную способность антител и обеспечивают полное связывание аналита [72–74].

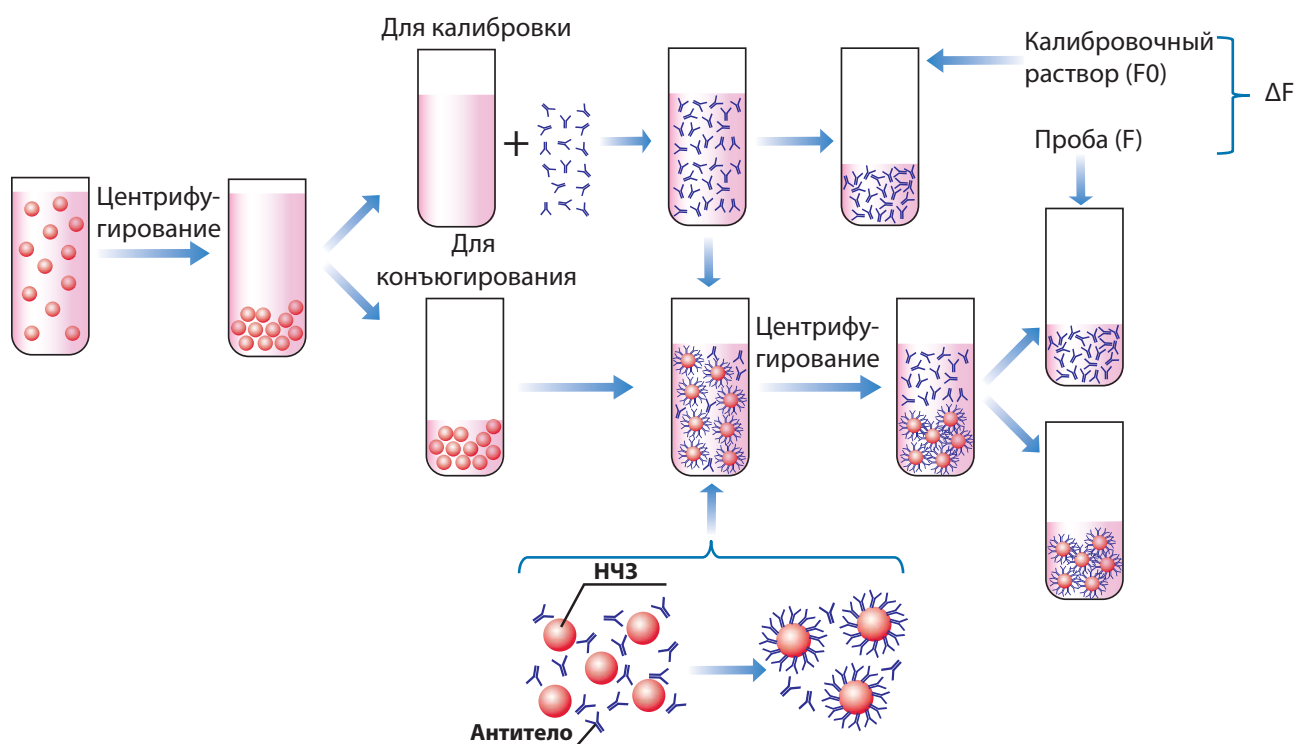
Поэтому при рассмотрении ультрадисперсных частиц как реагентов для иммунохроматографии востребованы и характеристика новых препаратов, и изучение структурно-функциональных взаимосвязей.

---

См. №№ С6, С24, С29, С32, С36, С38, С41, С43, С51, С54, С66, С76, С77, С79, С85, С91, С95, С109-С112, С115, С118 «Списка научных публикаций ...» и №№ П10-П12 «Списка патентов ...» с указанием изданий и авторских коллективов.

### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Для синтезируемых и используемых в аналитических целях конъюгатов антител и белковых антигенов с наночастицами рассмотрены способы характеристики их состава, необходимые для корректного расчета параметров взаимодействий. Для минимизации артефактных воздействий и повышения точности измерений предложена методика, основанная на регистрации флуоресценции триптофановых остатков белков и предусматривающая учет отличий оптических свойств связавшихся и несвязавшихся молекул в разных средах (рис. 17).



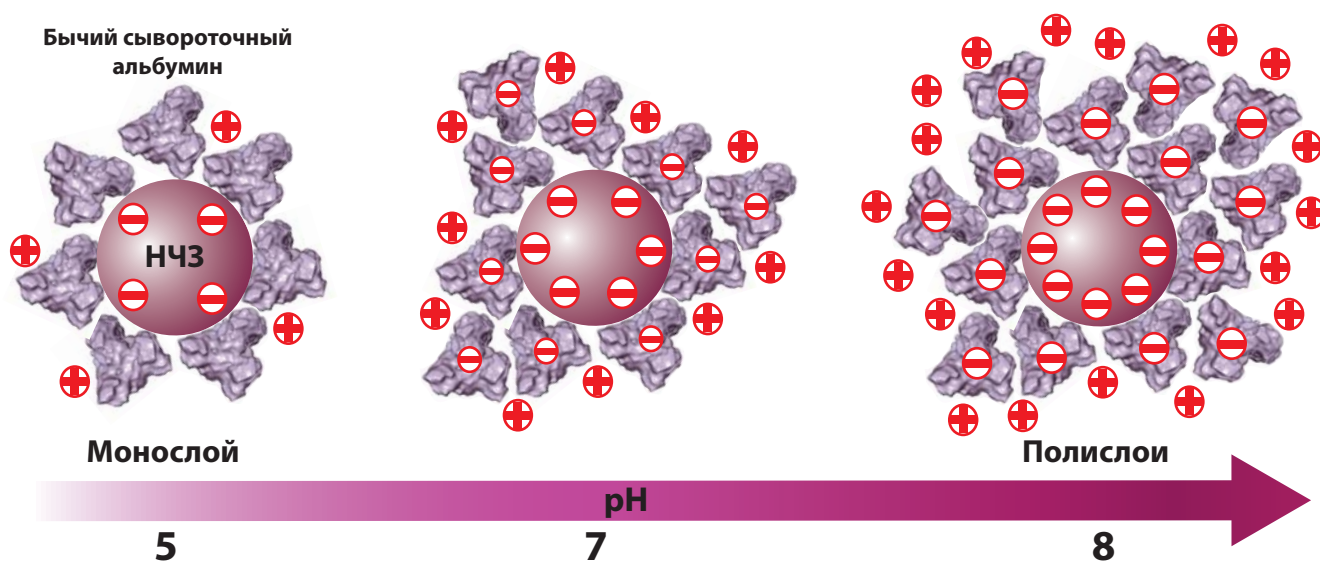
**Рис. 17.** Принцип измерения состава синтезируемых комплексов наночастица – антитело (на основании [С29])

Разработанные подходы были применены для характеристики адсорбционных комплексов наночастиц золота с иммуноглобулинами G и с бычьим сывороточным альбумином (БСА) – традиционным стабилизатором конъюгатов для иммунохроматографии. Установленные уровни связывания для наночастиц разного состава и при разных pH (таблица 4), сопоставленные с данными прямой регистрации изменений

размеров конъюгатов, позволили выявить условия монослойной и полислойной иммобилизации (рис. 18). Отмечена значительная степень обратимости связывания при формировании дополнительных слоев, начиная со второго, ухудшающая аналитические характеристики тест-систем с использованием соответствующих конъюгатов.

**Таблица 4.** Максимальные количества молекул белков, иммобилизуемые на поверхности одной НЧЗ (на основании [С80])

Белок	БСА			IgG		
	Диаметр НЧЗ, нм	20	24	48	22	27
pH 4–5	96	107	280	102	127	145
pH 7	138	154	720	103	178	495
pH 8	185	231	-	139	208	446
pH 10	-	-	-	132	128	388



**Рис. 18.** Принципиальная схема взаимодействий при иммобилизации белковой молекулы на поверхности НЧЗ при разных pH (на основании [С80])

Установлено, что в ряде случаев содержание антител в конъюгате для «сэндвич»-иммунохроматографии может быть сокращено в 2–4 раза по сравнению с монослойной иммобилизацией без ухудшения аналитических характеристик.

Показано, что такая же регистрация флуоресценции антигенов (белковых – благодаря наличию триптофана, а также ряда

низкомолекулярных антигенов) может быть применена для количественной оценки их связывания с конъюгатами антитело–наночастица. На основании применения данного подхода обнаружено, что значительная часть иммуноглобулинов, адсорбционно иммобилизуемых на поверхность наночастиц, – от двух третей и более (см. табл. 5) – утрачивает функциональную активность. Установленное ограничение традиционного подхода к получению иммуноаналитических реагентов свидетельствует о востребованности систем с непрямо ориентированной иммобилизацией антител.

**Таблица 5.** Количества антиген-связывающих сайтов в адсорбционных комплексах IgG–НЧЗ и их антиген-связывающая активность на примере С-реактивного белка (на основании [С115])

Средний диаметр НЧЗ, нм	IgG на одну НЧЗ	Валентностей IgG в конъюгате, нМ	Максимально е связывание СРБ, нМ	Доля активных валентностей IgG, %
14,8	13,2	379	66,2	17,5
23,5	28,1	191	41,4	21,6
28,6	43,0	157	36,5	23,3
34,0	73,0	153	33,8	22,1
43,3	56,0	53,7	17,8	33,1
54,5	84,9	37,4	12,7	34,0

Рассмотрены вопросы сравнительной характеристики нанодисперсных частиц как носителей для иммунореагентов и как выявляемых маркеров. Установлены критерии, совокупность которых позволяет оценить возможности применения новых наночастиц в иммунохроматографии (рис. 19). Предложенный набор параметров обеспечивает возможность быстрой оценки свойств кандидатных частиц и их сравнения с традиционными маркерами на основании размерных и оптических характеристик, не требующих конъюгирования с антителами и последующего время- и трудоемкого выбора условий проведения иммунохроматографии с новыми реагентами.

Потенциал маркера (количественно)			Потенциал маркера (качественно)		
1	Предел обнаружения маркера (из единицы объема)	Знач.	6	Цена и доступность	+/-
2	Предел обнаружения маркера (с единицы площади)	Знач.	7	Простота конъюгирования	+/-
3	Число маркера, присоединяемого к одному иммунореагенту	Знач.	8	Стабильность при хранении	+/-
4	Изменения сигнала маркера при конъюгировании	Знач.	9	Возможность количественной регистрации серийными приборами	+/-
5	Усиление сигнала в аналитической системе	Знач.	10	Отсутствие влияния матрикса проб на сигнал маркера	+/-

**Рис. 19.** Предлагаемые критерии характеристики кандидатных наночастиц для оценки возможностей их применения в иммунохроматографии (на основании [С66])

Рассмотрен ряд альтернативных наночастиц-маркеров и их сочетаний, экспериментально изучено их применение в иммунохроматографии. Оценки достигнутых результатов суммированы в табл. 6.

**Таблица 6.** Охарактеризованные варианты иммунохроматографических маркеров

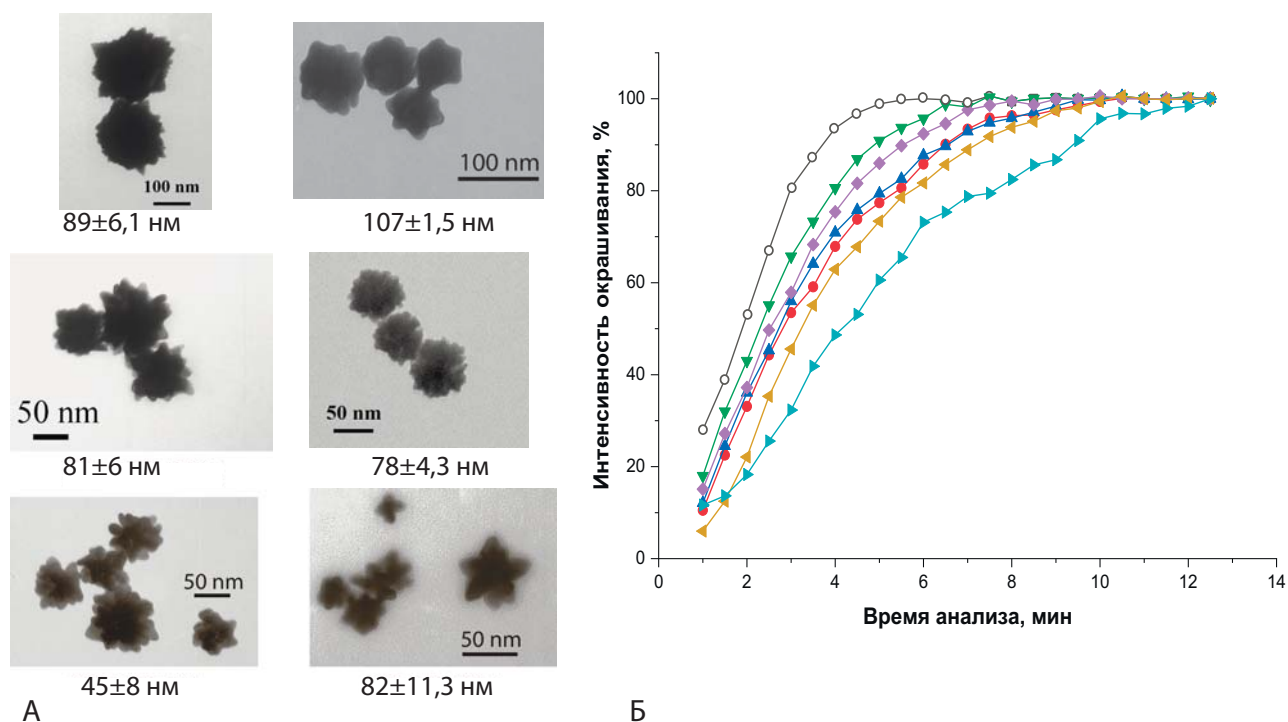
<i>Наночастица-маркер</i>	<i>Аналит(ы)</i>	<i>Предел обнаружения: значение / выигрыш *</i>
Абляционное золото	микотоксины	0,1 нг/мл / в 100 раз
Золотые наноцветы	микотоксины	30 пг/мл / в 25 раз
Золотые наноцветы	микроцистин	0,1 нг/мл / в 2 раза
Суперкруглые наночастицы золота	тропонин I	1,2 нг/мл / в 8 раз
Магнитные частицы	микотоксины	0,05 нг/мл
Квантовые точки	антибиотики	0,1 нг/мл / в 24 раза
Квантовые точки	антибиотики	0,3 нг/мл / в 30 раз
Квантовые точки	антибиотики	0,2 нг/мл / в 50 раз
Квантовые точки	С-реактивный белок	1 нг/мл / в 10 раз

Квантовые точки	IgE	2 МЕ/мл / в 5 раз
Квантовые точки + НЧЗ	серодиагностика	Разведение 1:20 000 / в 9 раз
Сочетание нескольких видов функционализированных НЧЗ	прокальцитонин	3 пг/мл / в 30 раз
Сочетание нескольких видов функционализированных НЧЗ	антибиотики	30 нг/мл / в 30 раз
Магнитные и золотые наночастицы	вирусы растений	0,25 нг/мл / в 30 раз
НЧЗ (регистрация ГКР)	линкомицин	1,4 фг/мл / в 100 000 раз

\* По сравнению с традиционной иммунохроматографией с использованием НЧЗ диаметром 20–40 нм, получаемых цитратным восстановлением соли золота.

Полученные данные по характеристике иммунохроматографических тест-систем с альтернативными маркерами подтверждают: а) преимущества в этом качестве флуоресцентных наночастиц, коррелирующие с лучшим соотношением сигнал:фон, и б) возможности, обеспечиваемые комплексообразованием функционализированных наночастиц, но требующие высокой воспроизводимости условий взаимодействия реагентов в движущемся по мембранам потоке.

В рамках характеристики альтернативных нанодисперсных маркеров проведен скрининг препаратов золотых наночастиц с развитой поверхностью (нанозвезд), получаемых при разных условиях двухстадийного синтеза (рис. 20, А). Отмечена возможность иммобилизации на их поверхности существенно большего числа антител, а также более медленное движение в потоке реагентов по тест-полоске (рис. 20, Б), что в совокупности приводит к снижению пределов обнаружения до порядка по сравнению со сферическими НЧЗ.



**Рис. 20.** Электронные микрофотографии различных препаратов наночастиц (А) и динамика их связывания в тестовой зоне при проведении иммунохроматографии (Б). Для сравнения на рис. Б представлена черная кривая, полученная при использовании в иммунохроматографии обычных НЧЗ (на основании [С118])

Рассмотрены суперкруглые наночастицы золота (с минимальным варьированием соотношения большей и меньшей осей), получаемые путем двухстадийного синтеза с дополнительной модификацией поверхности. Показано, что для этих частиц снижается степень агрегации и неспецифического связывания с мембранами, что является лимитирующим фактором при применении в иммунохроматографии крупных НЧЗ, получаемых традиционным цитратным восстановлением соли золота.

При сопоставлении адсорбционной и ковалентной иммобилизации антител на поверхностях обычных и суперкруглых НЧЗ показано 8-кратное снижение ПрО в иммунохроматографии – см. таблицу 7. При этом в качестве оптимальных были выбраны суперкруглые НЧЗ со средним диаметром 64,5 нм, что существенно превосходит значения для обычных НЧЗ – 25–40 нм,.

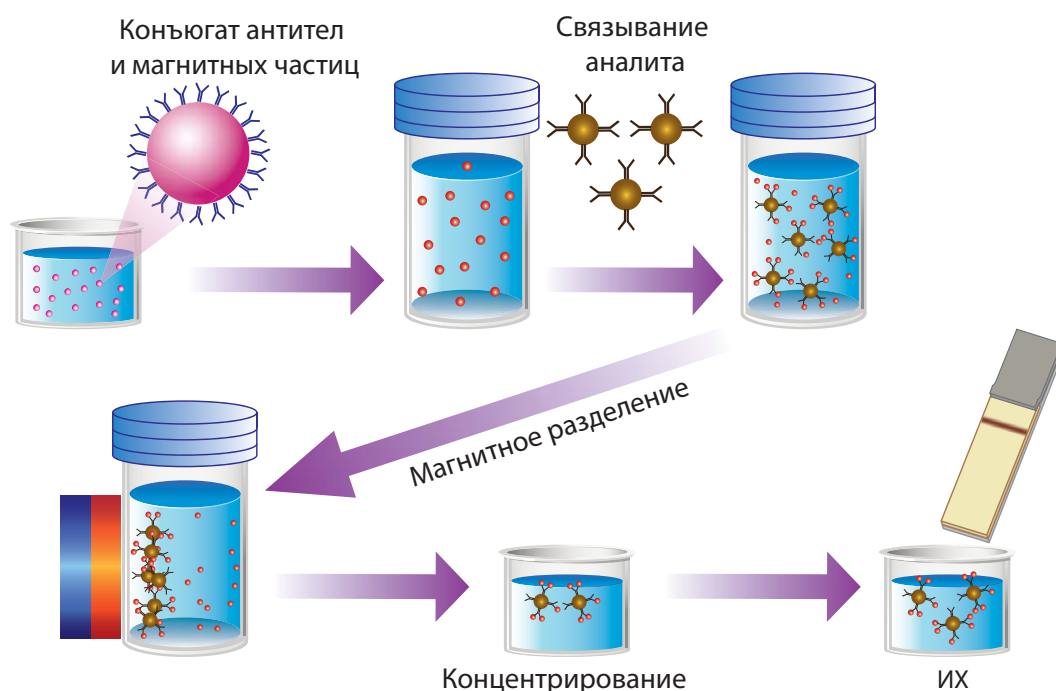


**Таблица 7.** Пределы обнаружения тропонина I при использовании в иммунохроматографии различных НЧЗ (на основании [С85])

	Цитратные НЧЗ				
Средний диаметр	18,6 нм	21,5 нм	33,7 нм	39,5 нм	47,5 нм
	<i>ПрО, нг/мл</i>				
Адсорбция	13,2±0,2	10,1±0,5	<b>9,9±0,2</b>	15,4±0,4	35,4±0,6
Ковалентная иммобилизация	13,4±0,6	12,5±0,4	12,7±0,1	20,3±0,3	>100
	Суперкруглые НЧЗ				
Средний диаметр	20,2 нм	36,2 нм	48,7 нм	64,5 нм	90,4 нм
	<i>ПрО, нг/мл</i>				
Адсорбция	2,9±0,1	3,3±0,3	2,7±0,2	2,0±0,1	4,7±0,2
Ковалентная иммобилизация	3,4±0,1	2,8±0,2	1,5±0,1	<b>1,2±0,1</b>	3,8±0,1

Жирным шрифтом выделены ПрО выбранных для сравнения оптимальных НЧЗ двух типов.

Отдельное внимание было уделено характеристике объединения в иммунохроматографии гомогенных и гетерогенных взаимодействий на примере нано- и субмикроразмерных частиц магнетита – оксида железа (II, III). Конъюгаты магнитных частиц с антителами диспергируются, инкубируются с пробой и отделяются из общего объема реакционной среды перед проведением иммунохроматографии (рис. 21).



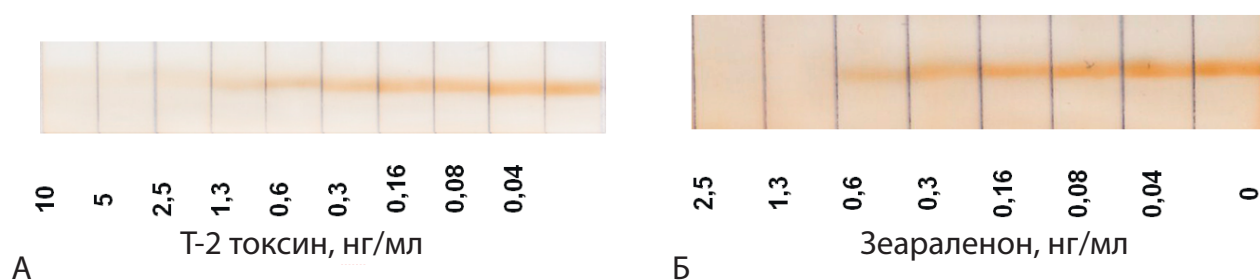
**Рис. 21.** Проведение иммунохроматографии с использованием магнитных частиц

Такие аналитические форматы объединяют преимущества традиционно противопоставляемых гомогенных аналитических методов с короткими стадиями и простой реализацией, но со сравнительно высокими пределами обнаружения аналитов, и более длительных и трудоемких, но и более чувствительных гетерогенных методов.

Иммунохроматография с магнитными частицами, реализованная в диссертационном исследовании для микотоксинов и фитопатогенов в качестве аналитов, характеризуется следующими достоинствами:

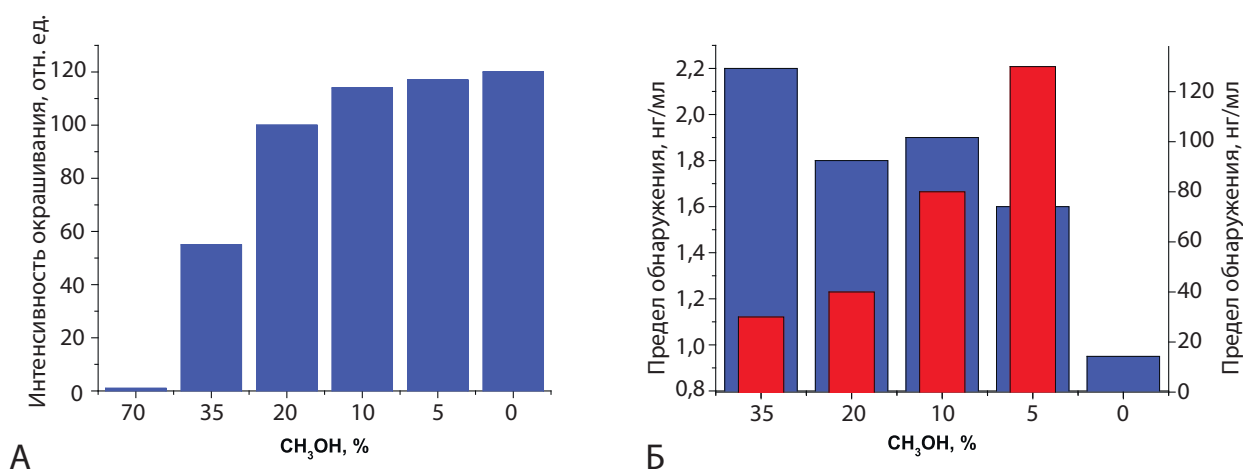
- устранение диффузионных ограничений, возникающих в гетерогенных аналитических методах;
- увеличение площади контакта компонентов тестируемой пробы с антителами;
- сбор молекул аналита из существенно большего объема пробы по сравнению с объемом жидкости, впитываемым тест-полоской;
- простое и быстрое отделение иммунных комплексов от непрореагировавших молекул при наложении магнитного поля;
- устранение компонентов проб, потенциально влияющих на регистрацию результатов;
- концентрирование перерастворяемого препарата в малом объеме для снижения предела обнаружения.

Показано, что магнитное концентрирование позволяет снизить предел обнаружения до 50 раз с сохранением полноты выделения аналита из проб (рис. 22).



**Рис. 22.** Иммунохроматография с использованием магнитного концентрирования. Инструментальные пределы обнаружения микотоксинов Т-2 токсина и зearаленона снижаются в 10–50 раз – до 0,1 и 0,05 нг/мл, соответственно (на основании [С38])

Дополнительным достоинством такого формата иммунохроматографии является стабилизация молекул иммуноглобулинов при их иммобилизации на магнитных частицах, предотвращающая денатурацию под действием органических растворителей – общепринятых экстрагентов для антигенов с низкой водорастворимостью – и тем самым позволяющая минимизировать разведения проб при тестировании с соответствующим снижением пределов обнаружения аналитов (рис. 23).



**Рис. 23.** Влияние концентрации метанола на характеристики иммунохроматографического обнаружения Т-2 токсина. (А) Интенсивность окрашивания тестовой зоны в отсутствие аналита. (Б) Пределы обнаружения Т-2 токсина в реакционной среде (фиолетовые столбцы) и из расчета на грамм пробы (красные столбцы) (на основании [С38])

Отметим, что оптические свойства магнитных наночастиц позволяют наносить получаемый при перерастворении осадка раствор на тест-полоску, не прибегая к элюции связанного антигена и непосредственно регистрируя связывание магнитных частиц в тестовой зоне.

Помимо такого варианта проведения иммунохроматографии, было предложено альтернативное решение, состоявшее в сочетании функционализированных магнитных и золотых частиц. При этом в ходе иммунохроматографии образуются агрегаты частиц, что усиливает оптический сигнал от одного иммунного комплекса и снижает предел обнаружения аналита.

### Общая оценка полученных результатов

Разработаны методики характеристики состава и функциональной активности конъюгатов наночастиц с антителами, применённые для сравнительной оценки препаратов разного состава на основе нанодисперсного золота и выявления наиболее эффективных аналитических реагентов.

Предложена система критериев для быстрой оценки возможностей ультрадисперсных частиц – кандидатных компонентов иммунохроматографических систем, не требующей проведения всего комплекса экспериментов по получению специфических реагентов и реализации иммунохроматографии с их использованием. С учетом данных критериев проведена характеристика ряда новых препаратов наночастиц–маркеров, экспериментально подтверждены их преимущества в реализованных иммунохроматографических тест-системах.

Изучены возможности магнитных частиц как реагентов, эффективно объединяющих использование гомогенных и гетерогенных взаимодействий при проведении иммунохроматографии и обеспечивающих тем самым сочетание экспрессности тестирования и низких пределов обнаружения аналитов.

## Глава 4. Селективность иммуноопределения по отношению к структурно близким соединениям

### Общая характеристика исследований по данному направлению

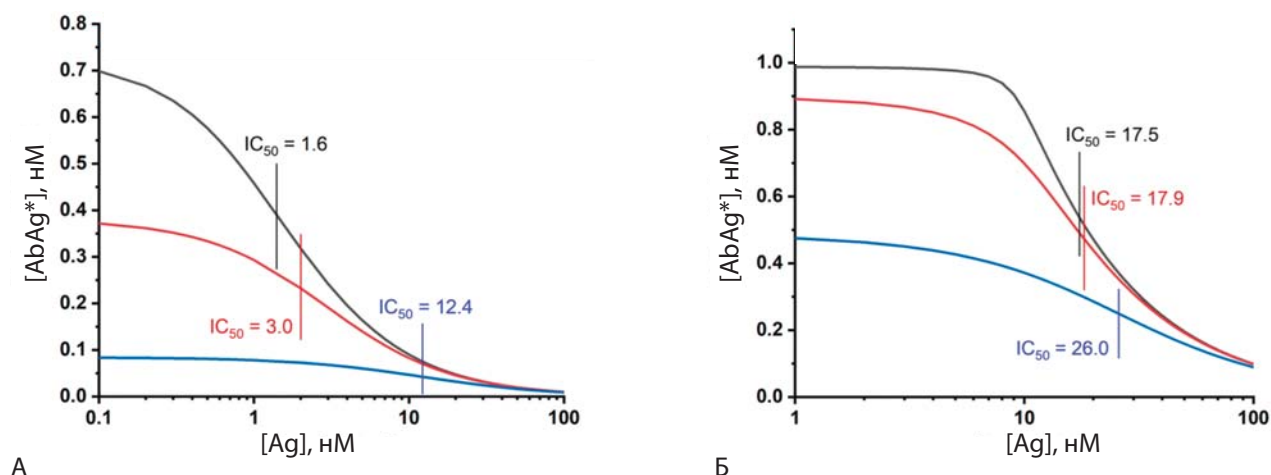
Ограниченная селективность традиционно отмечается как характерная особенность иммуноанализа. Рассмотрение взаимодействия антител со структурно близкими соединениями дает ряд значений перекрестной реактивности. В результате данные о количестве образовавшихся иммунных комплексов не позволяют установить концентрацию аналита, если проба содержит смесь его аналогов и метаболитов [75]. С учетом этих ограничений при контроле экотоксикантов, фармпрепаратов и многих других соединений иммунохимические методы используются для первичного скрининга с подтверждением инструментальными, прежде всего – хроматографическими методами [76–78]. Не отвергая данную иерархию, отметим необходимость управления селективностью иммунореагентов и аналитических методов с их использованием. Эффективные решения этих задач, учитывающие практические требования к выявлению структурно близких соединений, уменьшат долю ошибок при иммунохимических тестированиях и повысят точность получаемых количественных результатов [79,80].

Подходы, доминирующие при реализации индивидуального или групп-специфического иммуноанализа, основаны на эмпирическом опыте по выбору иммуногенов, сочетаниям конкурирующих реагентов и др. [81–83]. Поэтому использование для управления селективностью средств теоретической характеристики пространственных структур и биоаналитических взаимодействий, начатое в работах Wang S., Jiang Y., Lei H.T., Holmes T.H. [84–88], представляется крайне востребованным.

### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Теоретически и экспериментально охарактеризована зависимость кросс-реактивности конкурентного иммуноанализа от концентраций и соотношения реагентов, позволяющая с одними и теми же антителами обеспечивать разные уровни селективности.

Проведено моделирование иммуноанализа для антигенов, отличающихся по кинетическим константам взаимодействия. Полученные результаты (см. для примера рис. 24 и табл. 8) подтверждают, что перекрестная реактивность (CR) не является собственным свойством иммунореагентов, а зависит от количеств антител и конкурирующего с пробой иммобилизованного или меченого антигенного препарата и их соотношения. При этом выбор концентраций лимитируется возможностями достоверного выявления маркера.



**Рис. 24.** Теоретические концентрационные зависимости сигнала в конкурентном иммуноанализе трех перекрестно реагирующих антигенов при эквимольном (А) и неэквимольном (Б) соотношении антител и конкурирующего с пробой антигена (на основании [С117])

**Таблица 8.** Уровни перекрестной реактивности для вариантов иммуноанализа (А) и (Б), представленных на рис. 24 (на основании [С117])

	Анализ (А)		Анализ (Б)	
	IC <sub>50</sub> , нМ	CR, %	IC <sub>50</sub> , нМ	CR, %
Аналит I (Kd = 0,1 нМ)	1,6	100	17,5	100
Аналит II (Kd = 1 нМ)	3,0	53	17,9	98
Аналит III (Kd = 10 нМ)	12,4	13	26,0	67

Рассмотрение результатов моделирования позволяет сделать следующие выводы:

Если требуется узкая селективность иммуноанализа, необходимо уменьшить концентрации антител и модифицированных конкурирующих антигенов и приблизить их мольное соотношение к 1:1. Чтобы такое снижение не мешало точной регистрации сигнала, следует использовать маркер, выявляемый при низких концентрациях.

Если нужно расширить селективность иммуноанализа, то требуются противоположные действия — увеличение концентраций антител и модифицированных конкурирующих антигенов и их использование в неэквивалентном соотношении. Если при этом затрудняется оценка количества образующихся иммунных комплексов, то оправдана замена маркера на другой, обнаруживаемый при более высоких концентрациях. При этом действия по увеличению кросс-реактивности могут вызвать рост минимальной выявляемой концентрации аналита. Однако в ряде случаев имеющийся запас ПрО позволяет сохранить практическую функциональность используемых иммуноаналитических методов.

Описанные закономерности подтверждены экспериментально для сульфонамидов и фторхинолонов в качестве аналитов, в том числе при рассмотрении иммуноферментного и поляризационного флуоресцентного иммуноанализа, что свидетельствует о независимости проявляющихся эффектов от типа маркеров и режимов взаимодействия реагентов.

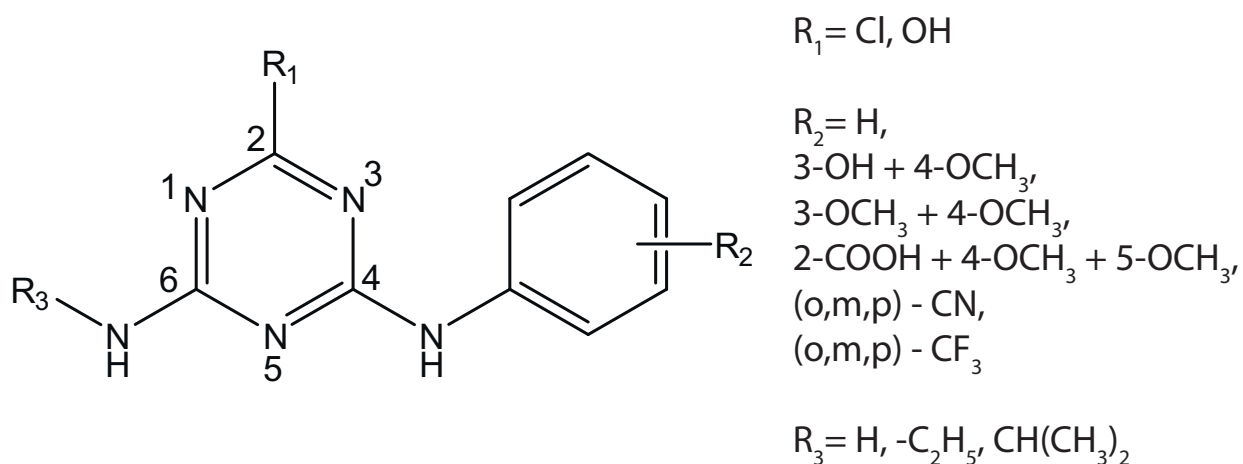
Кроме того, в рамках изучения способов управления иммунохимическим выявлением структурно близких соединений изучено влияние структуры и аффинности конкурентного гаптена, а также отличия в селективности, обеспечиваемые гетерологичным иммуноанализом, в котором иммуноген и конкурент отличаются по способу модификации гаптена.

На примерах пестицидов и антибиотиков предложен и реализован ряд способов воздействия на селективность иммуноаналитических методов:

- трансформация содержащегося в тестируемой пробе гаптена в конъюгат гаптен-носитель;
- иммунное распознавание общего структурного элемента соединений определенного химического класса;
- выявление как нативных, так и частично метаболизированных молекул бета-лактамовых антибиотиков, обеспечиваемое размыканием лактамного кольца при пробоподготовке.

Для двух семейств соединений – сульфонамидов и триазинов – проведено выявление факторов, определяющих эффективность их иммунохимического выявления, с использованием алгоритмов QSAR-анализа. Выявлены основные структурные элементы молекул, влияющие на селективность иммунного распознавания.

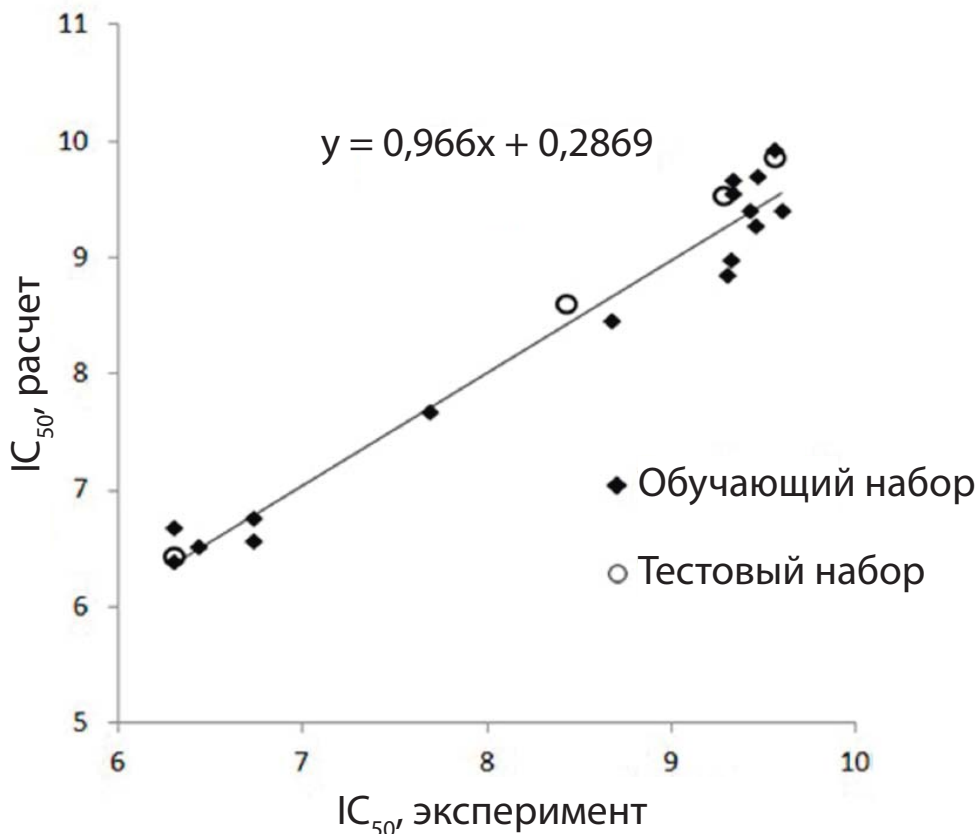
Так, например, для триазинов установлено, что их взаимодействие с антителами определяется наличием изопропиламиногруппы в положении С6, хлора в положении С2 и анилинового заместителя в положении С4, а также отличиями электростатических взаимодействий и водородных связей для заместителей в положении С4 (рис. 25).



**Рис. 25.** Варьируемые структурные элементы триазиновых пестицидов и их производных, рассмотренные в рамках QSAR-характеристики их иммунохимического выявления (на основании [С72])



Показана эффективность прогнозирования связывания антител с триазиновыми гаптенами, основанного на учете установленных структурных характеристик; коэффициент корреляции расчетных и экспериментальных значений  $IC_{50}$  составил 0,966 (рис. 26).



**Рис. 26.** Корреляция экспериментально полученных (ось абсцисс) и предсказанных с помощью QSAR-анализа (ось ординат) величин  $IC_{50}$ , отражающих иммунохимическую кросс-реактивность триазиновых гербицидов (на основании [С72])

### Общая оценка полученных результатов

В рамках исследования рассмотрены различные подходы, обеспечивающие управление селективностью иммунохимического выявления структурно близких соединений и его приближение либо к индивидуальному обнаружению одного целевого соединения, либо к контролю суммарного содержания всех совокупности его структурных аналогов. На основании теоретического и экспериментального изучения показано, что такая модуляция селективности может быть осуществлена даже для одних и тех же иммунореагентов – посредством изменения

их используемых количеств и соотношения. Рассмотрены возможности управления селективностью при выборе структуры гаптенов в составе иммуногена и антигенного препарата, конкурирующего при проведении иммуноанализа. Предложены способы модификации аналита при пробоподготовке и проведении иммуноанализа, влияющие на эффективность и селективность его иммунохимического обнаружения. Рассмотрено применение QSAR-анализа для выявления основных структурных элементов химически близких соединений, определяющих эффективность их связывания с антителами.

## Глава 5. Разработка и характеристика мультиплексных иммунохроматографических систем

### Общая характеристика исследований по данному направлению

Расширение знаний о маркерах патологий и дисфункций, а также о токсичных контаминантах вызывает необходимость производительного быстрого контроля многих соединений [89,90]. Такие разработки развиваются для иммуночипов, цитометрического, микрофлюидного иммуноанализа и ИФА [91–94], но требуют сложного оборудования при иммобилизации реагентов и проведении измерений.

В ИХ применение серий автономных тест-полосок, обеспечивая мультианализ, пропорционально увеличивает трудозатраты и расход реагентов и комплектующих. Более эффективны подходы, основанные на проведении различных взаимодействий в общем объеме. Варианты такой мультиплексной иммунохроматографии описаны в статьях Gantelius J., De Saeger S. и других авторов [27,95–98], но ограничиваются частными демонстрациями успешности предлагаемых систем. При этом в мультиплексной иммунохроматографии ПрО может ухудшаться по сравнению с индивидуальным выявлением аналитов, а выбор оптимальной локализации зон связывания сопряжен с трудоемким экспериментальным рассмотрением большого числа комбинаций [99]. Кроме того, использование в ИХ капиллярных сил, обеспечивающих движение жидкости по порам мембран, ограничивает размеры тест-полосок, число располагающихся на них зон связывания и, соответственно, одновременно определяемых соединений.

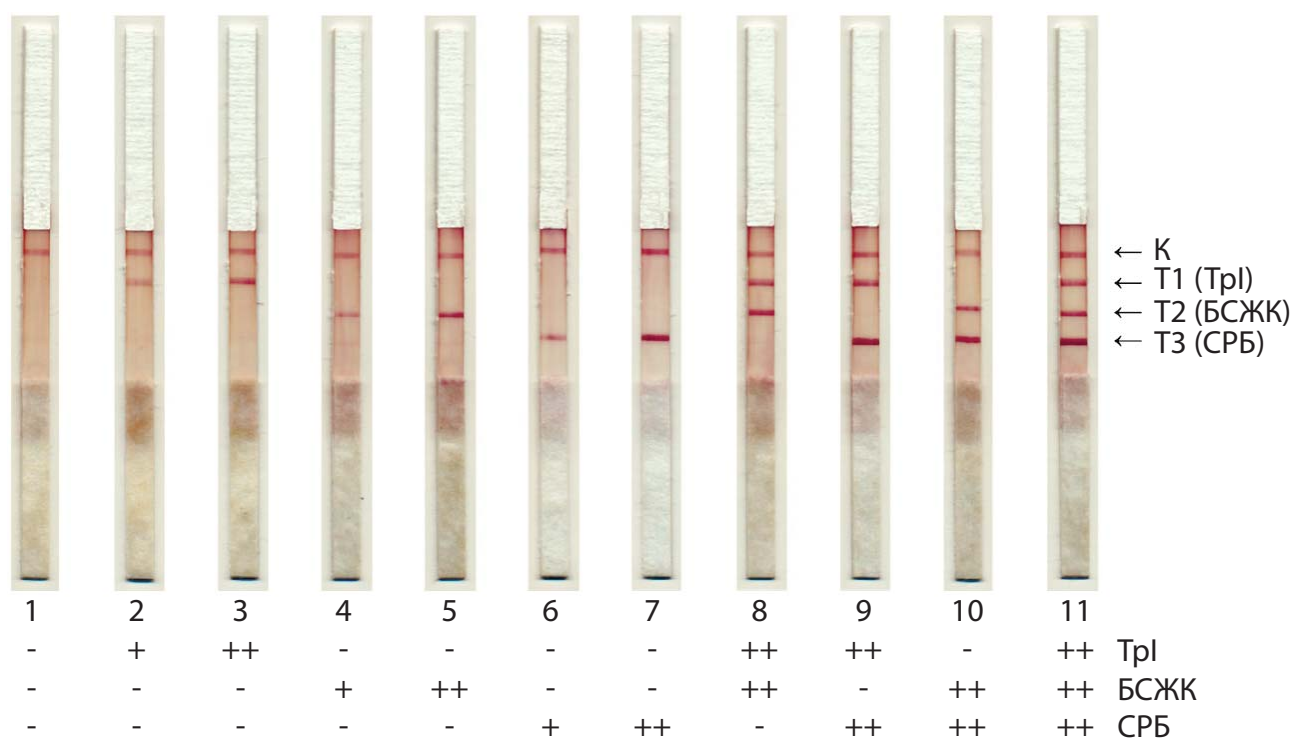
Изложенные соображения определяют востребованность изучения закономерностей мультиплексной иммунохроматографии и создания новых тест-систем, в которых преодолеваются указанные ограничения.

---

См. №№ С19, С30, С35, С44, С56, С70, С73, С74, С78, С81, С87 «Списка научных публикаций ...» с указанием изданий и авторских коллективов.

### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Установлены концентрационные и кинетические зависимости формирования выявляемых иммунных комплексов в мультиплексной иммунохроматографии при последовательном расположении зон связывания с иммунореагентами разной специфичности. Реализованы тест-системы для одновременного выявления и оценки содержания нескольких антибиотиков и кардиомаркеров – см. для примера рис. 27.

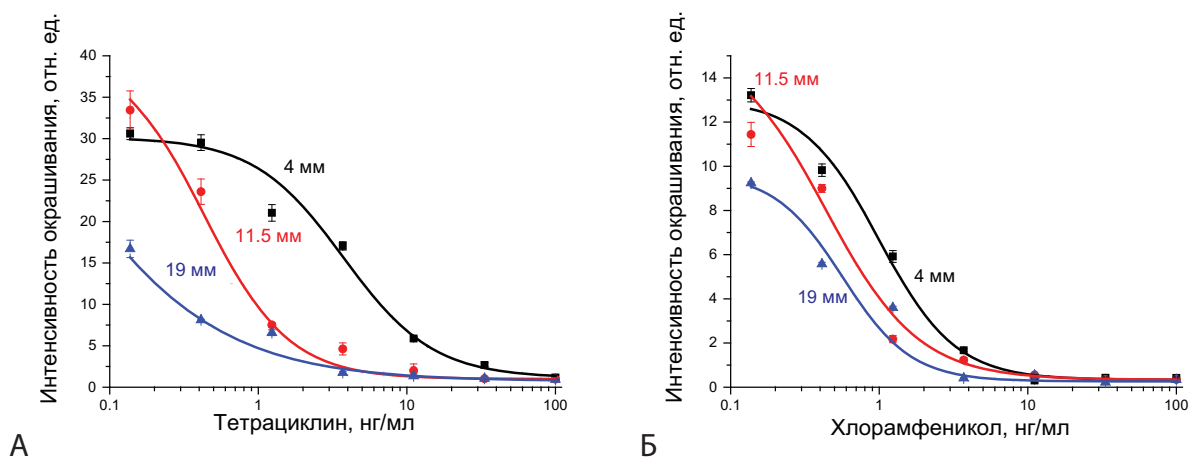


**Рис. 27.** Использование разработанной мультиплексной тест-системы для одновременного выявления тропонина I (Tpi), белка, связывающего жирные кислоты (БСЖК), и С-реактивного белка (СРБ) в пробах крови с разными сочетаниями данных аналитов; К – контрольная зона, Т1–Т3 – тестовые зоны (на основании [С44])

Показано, что аналитические характеристики мультизонной иммунохроматографии зависят от расположения зон с иммобилизованными реагентами разной специфичности. Локализация этих зон определяет время взаимодействия иммунореагентов в потоке при движении от старта до тестовой зоны. К тому же скорость движения потока по мере удаления от старта замедляется, что влияет на продолжительность связывания иммобилизованных в тестовой зоне и движущихся с потоком реагентов. Поэтому разные сочетания

реагентов в мультizonной иммунохроматографии отличаются по интенсивностям сигнала и пределам обнаружения аналитов. С ростом количества одновременно контролируемых реагентов ( $n$ ) число последовательностей тестовых зон возрастает как  $n!$  (например, для пяти реагентов – 120 вариантов), что делает экспериментальную проверку всех возможных комбинаций крайне трудоемкой.

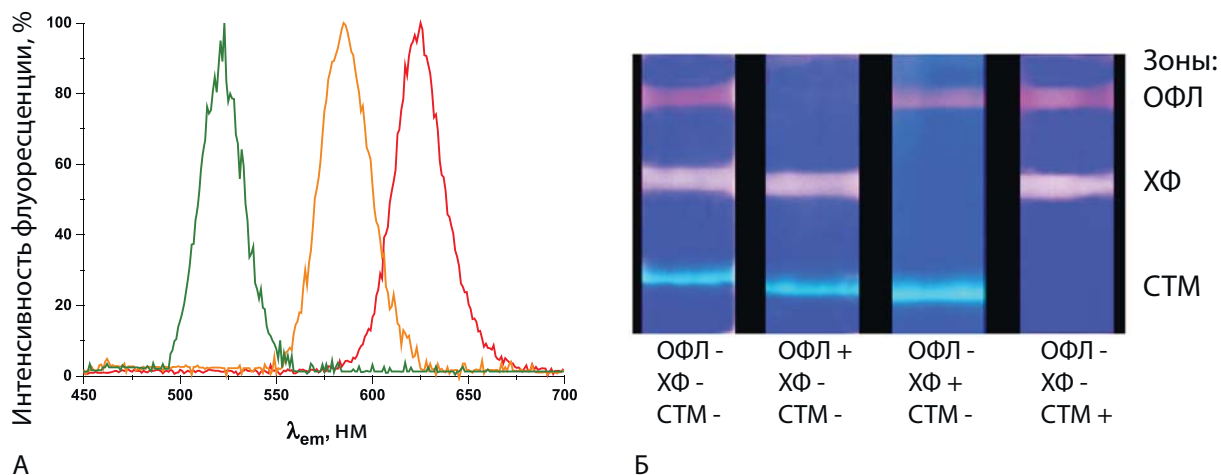
Для преодоления этого ограничения рассмотрены отличия сочетаний антиген–антитело по кинетике связывания. Показано, что в зависимости от количественных характеристик взаимодействия и скорости достижения химического равновесия пары иммунореагентов подразделяются на чувствительные и нечувствительные к смещению зоны связывания (рис. 28). На основании экспериментальной характеристики иммунореагентов для обнаружения антибиотиков реализована мультиплексная тест-система, в которой для всех аналитов сохраняются пределы обнаружения монопараметрических тест-систем.



**Рис. 28.** Концентрационные зависимости конкурентной иммунохроматографии тетрациклина (А) и хлорамфеникола (Б) при разных положениях зон связывания на тест-полоске. Указанные для кривых величины 4, 11,5 и 19 мм соответствуют расстояниям от начала рабочей мембраны до тестовой зоны (на основании [С82])

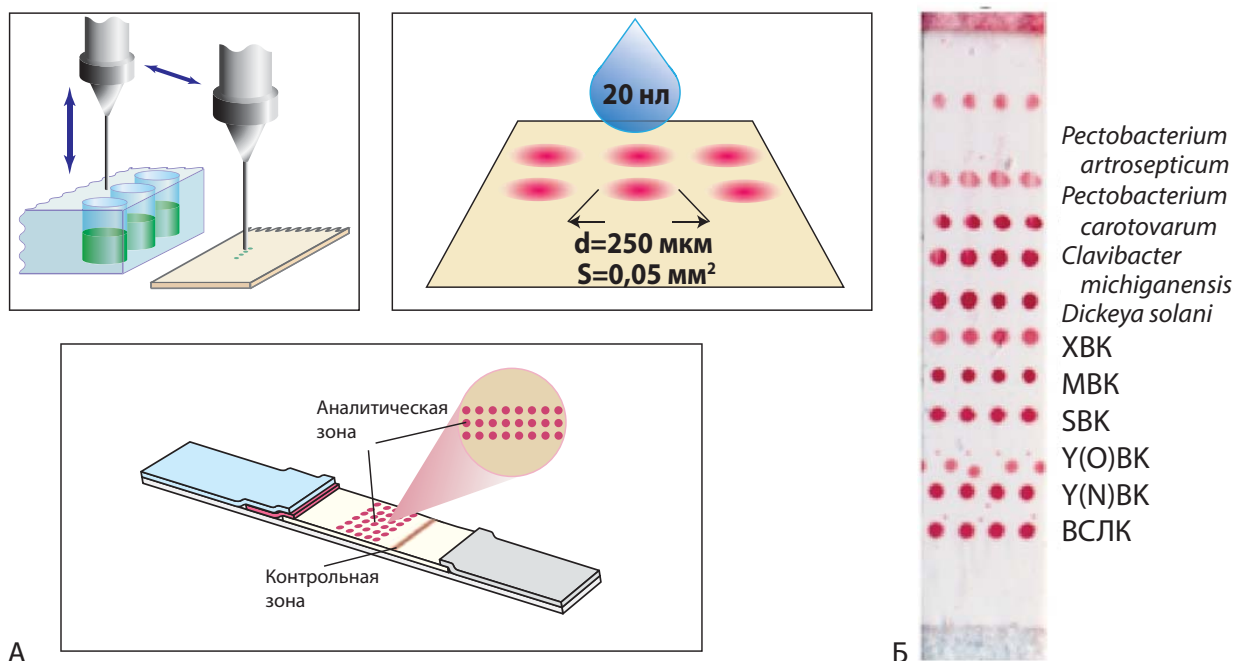
Отмечено, что использование в мультizonной иммунохроматографии маркеров с разными оптическими характеристиками обеспечивает простую идентификацию формирующихся зон связывания, не требующую оценки их

расположения. Так, для трех антибиотиков и трех видов квантовых точек (ядро – CdSe, оболочка – ZnS) с разными спектрами флуоресценции реализована соответствующая мультиплексная тест-система (рис. 29).



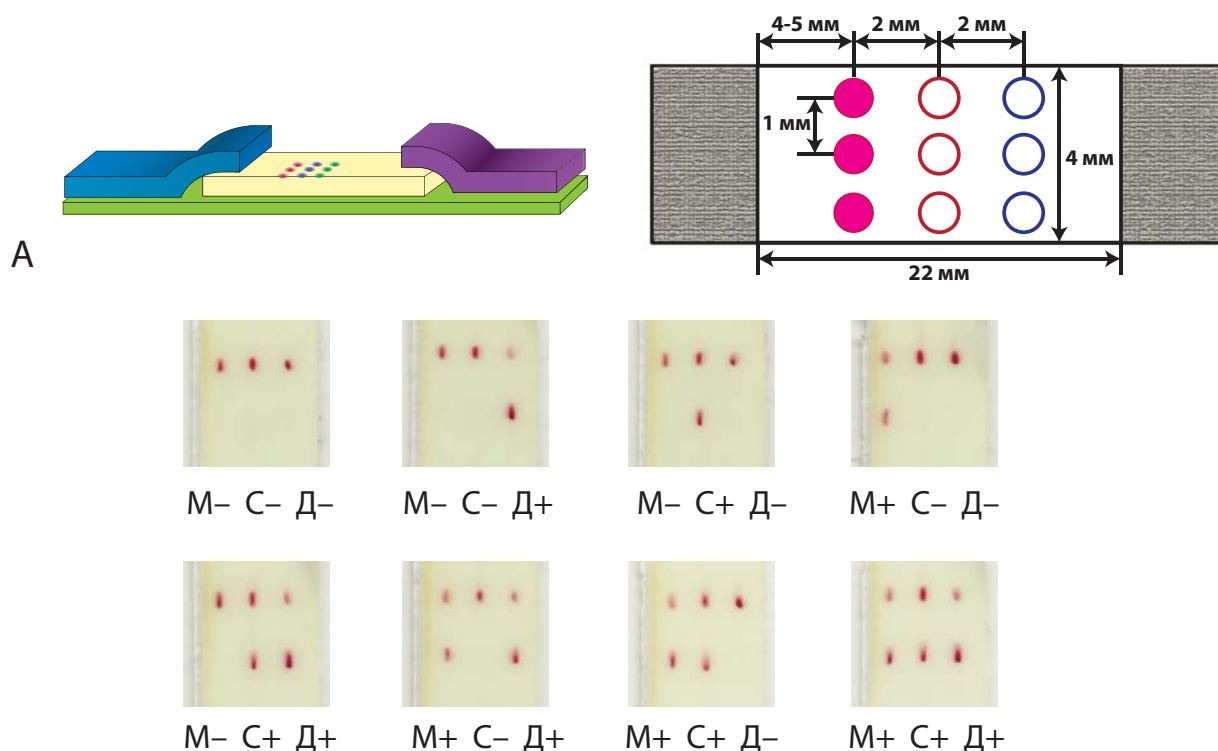
**Рис. 29.** Спектры флуоресценции трех видов квантовых точек (А) и иммунохроматография антибиотиков офлоксацина (ОФЛ), хлорамфеникола (ХФ) и стрептомицина (СТМ) с их использованием (Б) (на основании [С30])

С учетом ограниченных размеров иммунохроматографических тест-систем рассмотрены возможности миниатюризации зон связывания. Предложен формат двумерной иммунохроматографии с нанесением на рабочую мембрану упорядоченных массивов точек иммунореагентов разной специфичности (рис. 30), позволяющий формировать на одной тест-полоске несколько десятков участков для реализации разных вариантов взаимодействий – тестовые и контрольные зоны для разных анализов, контроль превышения нескольких пороговых уровней для одного соединения, повторности для количественного измерения концентраций антигенов. Разработаны и апробированы системы двумерной иммунохроматографии для выявления и оценки содержания психоактивных веществ (конкурентный формат, до 4 антигенов), вирусных и бактериальных фитопатогенов («сэндвич» формат, до 10 антигенов). Показана интеграция в этих системах преимуществ иммуночипов (производительный одновременный контроль многих анализов) и иммунохроматографии (экспрессное простое тестирование).



**Рис. 30.** Принцип двумерной иммунохроматографии (А) и его применение для выявления шести вирусных и четырех бактериальных патогенов картофеля (Б) (на основании [С19,С35])

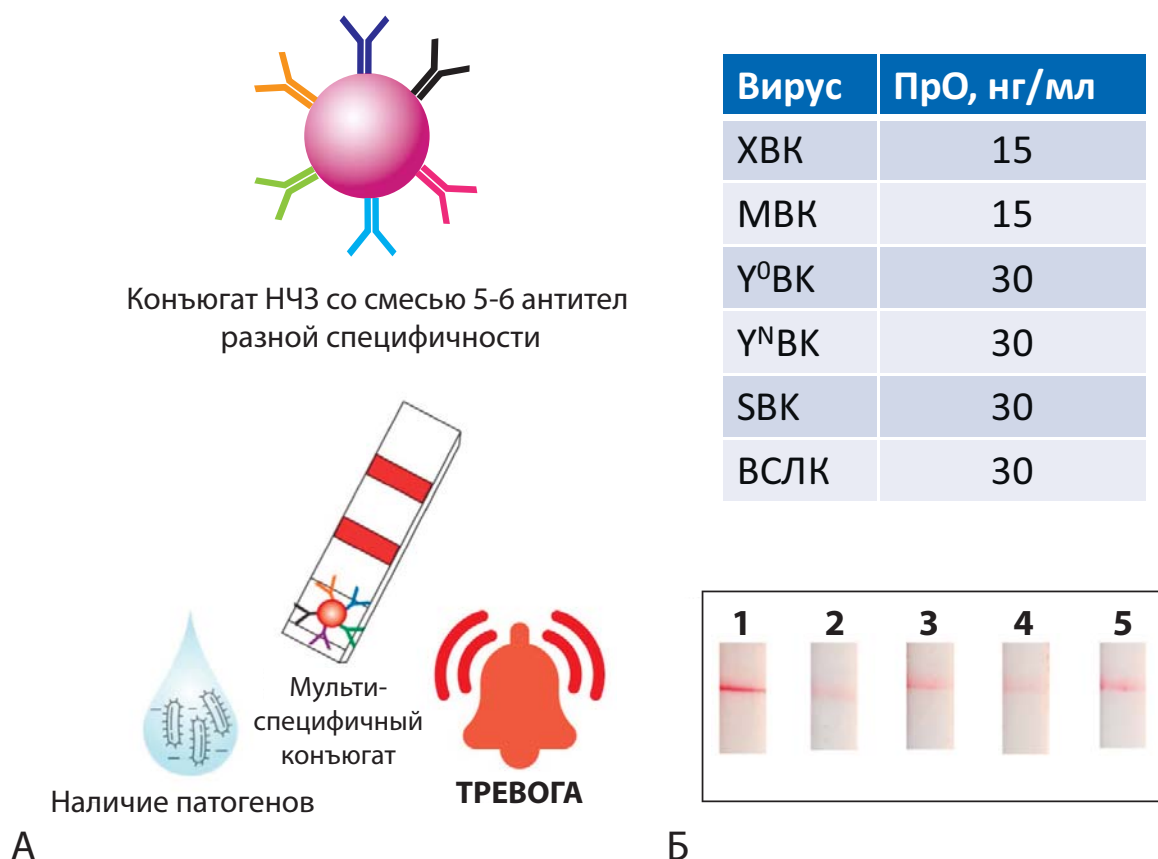
Для высокоскоростной мультиплексной иммунохроматографии использовано ламинарное течение реагентов по порам рабочей мембраны. С учетом этой особенности все реагенты нанесены на рабочую мембрану с формированием вертикальных рядов точек (конъюгат антитело–наночастица, специфические антитела тестовой зоны, антивидовые антитела контрольной зоны) для независимых процессов одновременного выявления нескольких аналитов (рис. 31, А). Ускорение контакта пробы с иммунореагентами из-за уменьшения числа мембранных компонентов и быстрого вымывания конъюгата позволяет проводить тестирование в течение 1–1,5 мин. Данный принцип реализован для контроля биомаркеров инфаркта миокарда и воспалительных процессов (рис. 31, Б). Показана применимость такой мультитрековой иммунохроматографии для проб крови, подготовка которых к тестированию ограничивается адсорбцией интерферирующих компонентов на стартовой впитывающей мембране непосредственно в ходе иммунохроматографии.



**Рис. 31.** Принцип мультитрековой иммунохроматографии (А) и его применение (Б) для одновременного контроля трех биомаркеров – миоглобина (М), С-реактивного белка (С) и Д-димера (Д) (на основании [С73])

Отмечено, что в ряде случаев проведение мультианализа не сопряжено с необходимостью выявления каждого из контролируемых соединений, так как действия по результатам тестирования не зависят от индивидуальных особенностей аналитов или же идентификация может быть перенесена на повторное тестирование небольшого числа проб, положительных по результатам первичного тестирования. Для такого первичного скрининга пораженности растения хотя бы одним из наиболее распространенных патогенов предложен «тревожный» иммунохроматографический тест, в котором используется конъюгат наночастицы–маркера со смесью антител разной специфичности (рис. 32). Показана его эффективность при мониторинге до шести патогенов картофеля.





**Рис. 32.** Принцип «тревожного» иммунохроматографического теста для контроля присутствия в пробе одного или нескольких анализов без их идентификации (А) и результаты его применения при мониторинге фитопатогенов (Б) (на основании [С78])

### Общая оценка полученных результатов

Изучены кинетические особенности взаимодействий иммунореагентов в мультizonной иммунохроматографии, обусловленные разной локализацией зон связывания. С их учетом разработаны подходы к выбору расположения реагентов, сохраняющему аналитические характеристики монопараметрических систем при переходе к мультианализу. Предложены оригинальные способы производительной одновременной иммунохроматографии большого числа анализов. Универсальность данных подходов позволяет использовать их для решения различных задач, требующих экспрессного выявления и оценки содержания многих анализов в пробе.

## Глава 6. Способы изменения пределов обнаружения иммунохроматографических систем

### Общая характеристика исследований по данному направлению

В последние годы наблюдается бум разработок иммуноаналитических систем со все более и более низкими пределами обнаружения. В ведущих профильных журналах доминируют описания новых маркеров, новых схем образования регистрируемых комплексов и усиления сигнала, направленных на достижение рекордных минимумов выявляемых концентраций аналитов – см. недавние обзоры [25,26,100–103]. Однако этот бум не привел к существенным изменениям аналитических технологий, используемых в массовой практике. Причина такого разрыва – в разрозненности работ по созданию новых иммуноаналитических форматов, отсутствию доказательного выявления факторов, обеспечивающих их преимущества, проверок результатов приоритетных разработок для других аналитов. Теоретические оценки возможностей иммунохимического выявления низких концентраций аналитов, проведенные Jackson T.M. и Ekins R.P [104] и Taylor J. с соавт. [105], не учитываются при рассмотрении новых разработок.

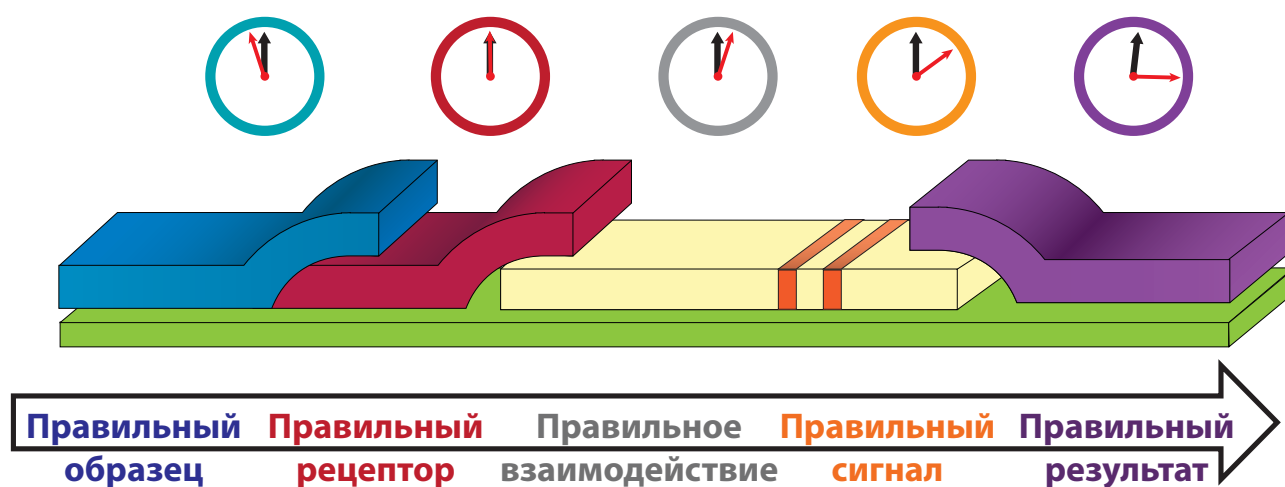
В этой связи важно понимать, влияют ли предлагаемые изменения на те параметры межмолекулярных взаимодействий и процессов генерации сигнала, которые являются лимитирующими для данных аналитических систем [106,107]. Поэтому проведенные разработки новых способов снижения пределов обнаружения основывались на общих закономерностях, установленных при изучении иммунохроматографических систем.

---

См. №№ С7, С9, С11, С22, С33, С37, С45, С46, С49, С50, С59-С62, С65, С66, С74, С82, С93, С94, С101, С114, С119 «Списка научных публикаций ...» и №№ П5-П7, П14, П19, П20, П21, П23-П25 «Списка патентов ...» с указанием изданий и авторских коллективов.

### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Предложено разделение способов воздействия на параметры ИХ на пять групп, соответствующих последовательности расположения компонентов тест-системы и происходящих в ней процессов и обеспечивающих улучшение аналитических характеристик посредством изменений в (1) подготовке пробы, (2) используемом рецепторном реагенте, (3) условиях взаимодействий в ходе иммунохроматографии, (4) генерации регистрируемого сигнала, (5) обработке и интерпретации получаемых результатов – см. рис. 33.



**Рис. 33.** Пять групп способов воздействия на параметры иммунохроматографии, локализованных во времени и в пространстве (на основании [С66])

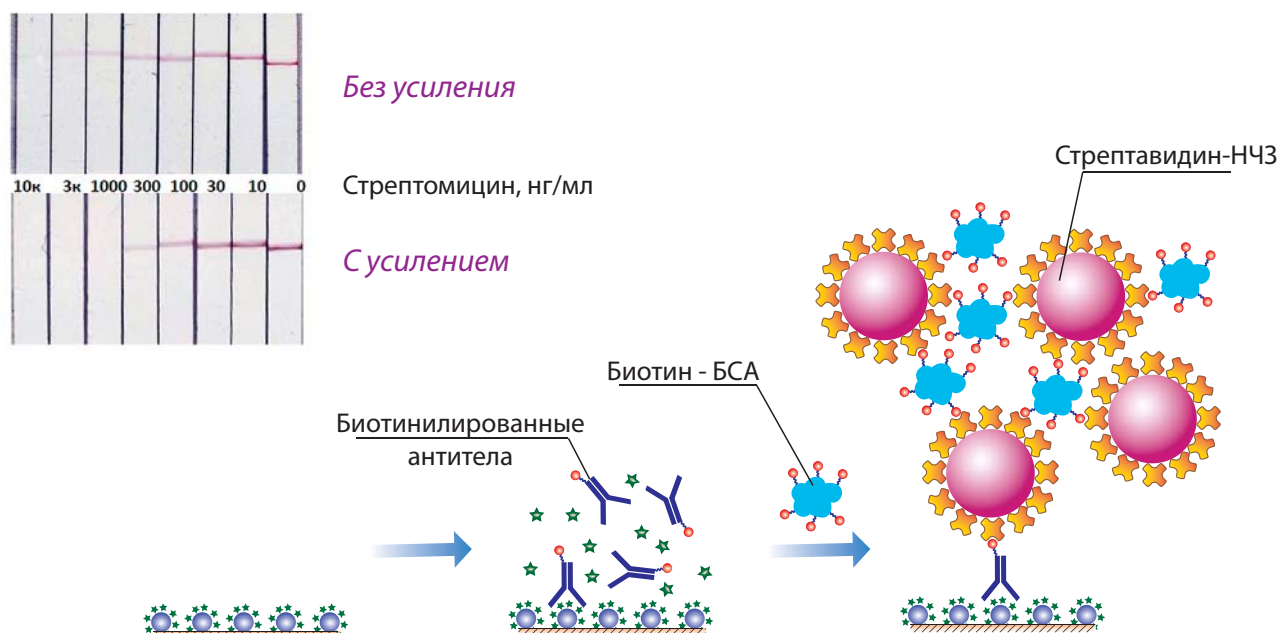
Рассмотрены лимитирующие факторы процессов, относящихся к разным стадиям проведения иммунохроматографию. На основании их изучения и количественной оценки предложен ряд решений, обеспечивающих снижение пределов обнаружения аналитов:

- перевод взаимодействия аналита и меченных наночастицами антител за пределы мембран тест-полоски – прединкубация с пробой коллоидного раствора конъюгата;

- управление динамикой высвобождения меченых наночастиц (замедленное движение, обеспечивающее связывание антител с антигеном во всем объеме пробы) посредством нанесения на мембрану

для конъюгата длительно растворяющихся реагентов и использования дополнительных мембран;

– сочетание нескольких видов функционализированных наночастиц или наночастиц и связывающих их реагентов для формирования в тестовой зоне агрегатов с усилением регистрируемого сигнала (рис. 34);



**Рис. 34.** Сборка комплексов функционализированных наночастиц в тестовой зоне как средство изменения предела обнаружения иммунохроматографии (на основании [С50,С81])

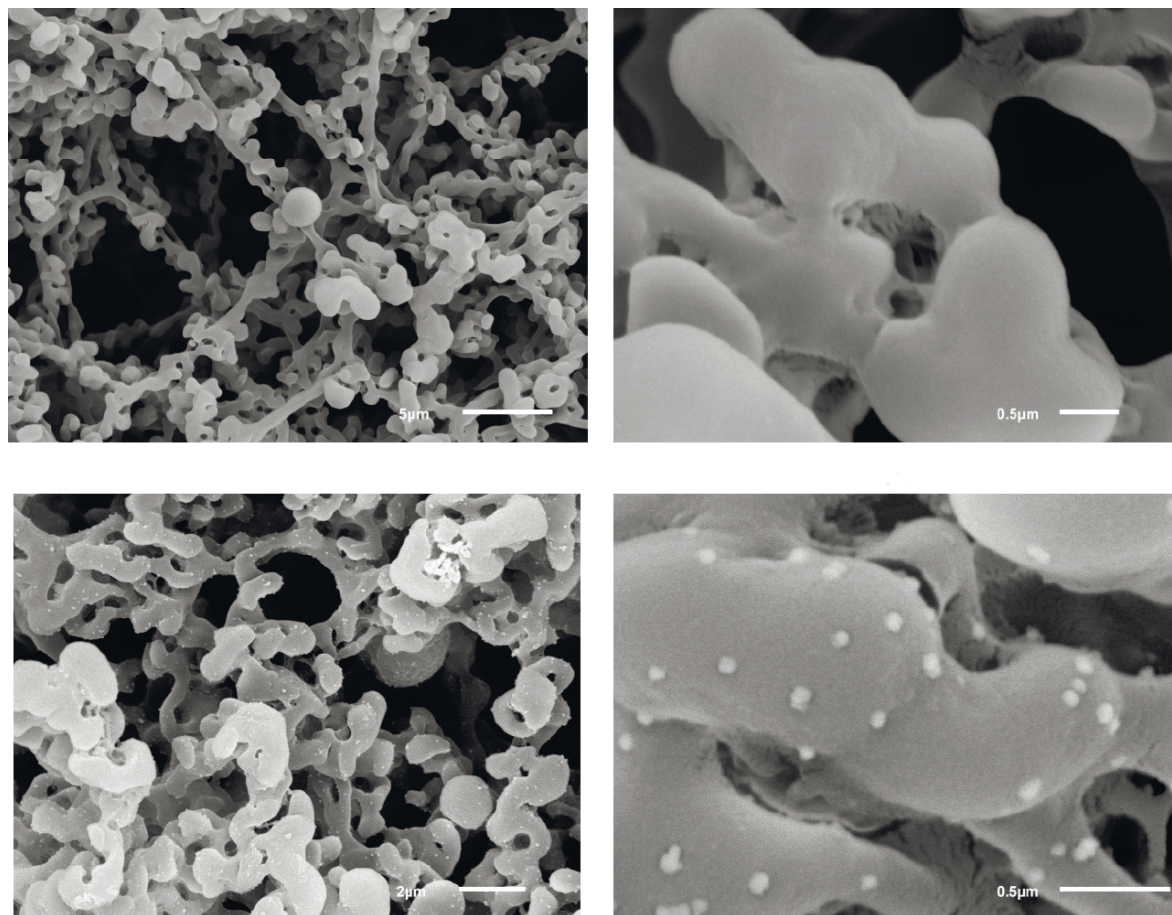
– использование взаимодействия специфических и антивидовых антител для агрегации их конъюгатов с наночастицами в тестовой зоне;

– изменение ширины потока при движении реагентов по тест-полоске с целью концентрирования компонентов выявляемых меченых комплексов в узкой зоне связывания;

– пропускание по тест-полоске нескольких потоков жидкости для последовательного формирования выявляемых комплексов и эффективного удаления непрореагировавших компонентов;

– использование для усиления оптического сигнала в тестовой зоне ферментов, иммобилизуемых на наночастицах и трансформирующих хромогенные субстраты.

– увеличение размеров наночастиц золота в составе выявляемых иммунных комплексов, обеспечиваемое восстановлением на их поверхности солей серебра или золота (рис. 35).

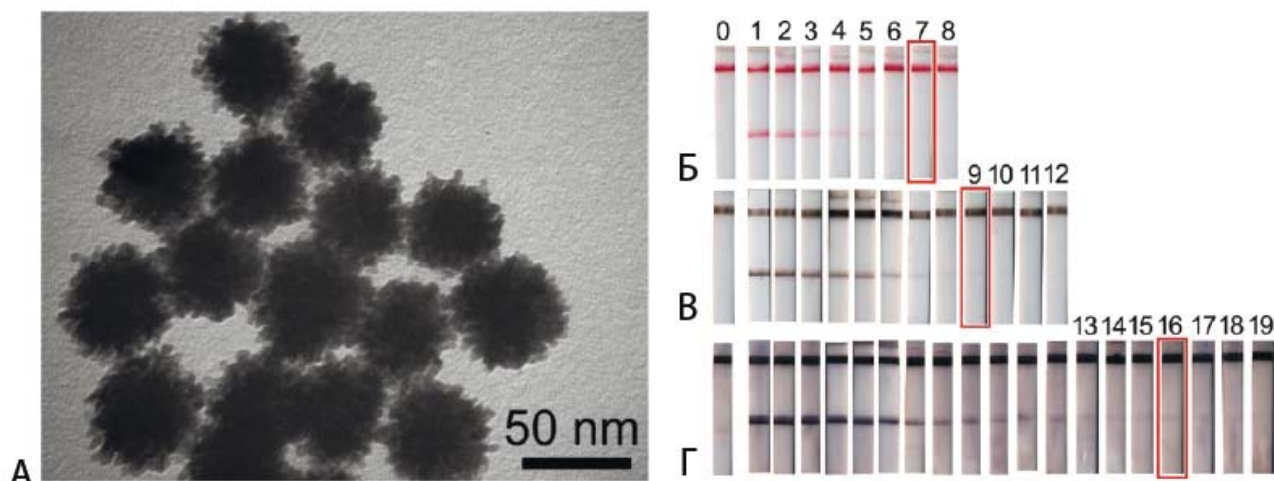


**Рис. 35.** Сканирующая электронная микроскопия рабочей нитроцеллюлозной мембраны при проведении иммунохроматографии фитопатогена *Ralstonia solanacearum* до (вверху) и после (внизу) роста связанных с иммунными комплексами наночастиц золота при восстановлении соли золота. Справа – увеличенные участки микрофотографий, расположенных слева от них (на основании [С61])

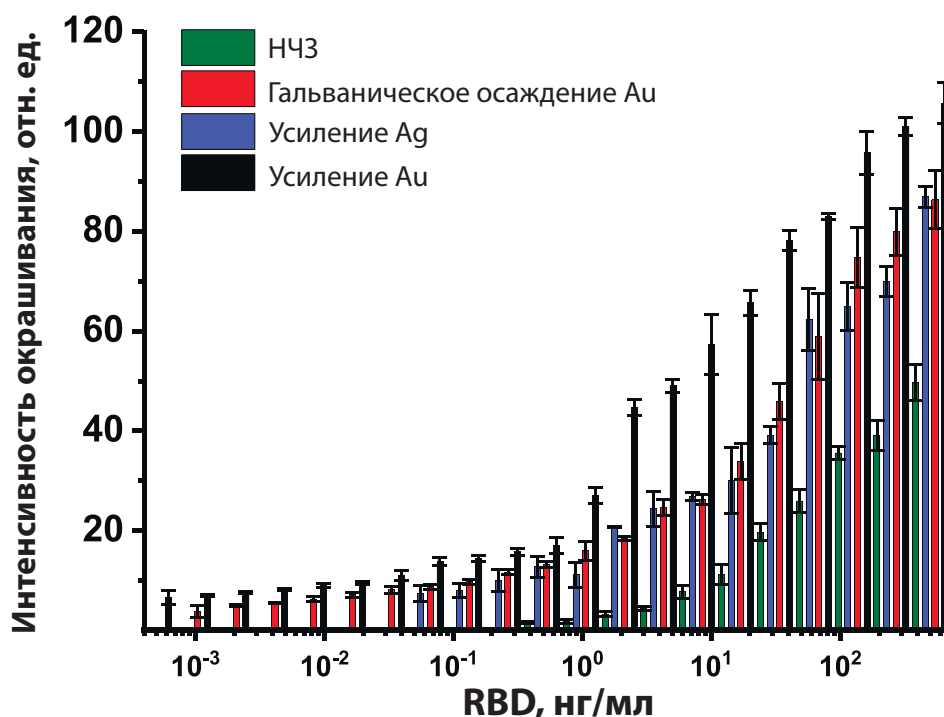
Проведено сопоставление разных видов наночастиц в качестве нанозимов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции. Показана толерантность активности нанозимов к высоким концентрациям пероксида водорода, обеспечивающая их эффективное применение в иммунохроматографии при работе с растительными пробами.

Изучено влияние способов получения би- и триметаллических наночастиц (Au@Ag, Au@Pt, Au@Ag@Pt) – нанозимов на их структуру

и каталитические свойства. Для оптимальных маркерных препаратов при выявлении фитопатогенов и антигена вируса SARS-CoV-2 установлено снижение пределов обнаружения иммунохроматографии в 200–500 раз по сравнению с традиционной колориметрией наночастиц золота (рис. 36, 37).



**Рис. 36.** Электронная микрофотография Au@Pt наночастиц (А). Результаты иммунохроматографического контроля X-вируса картофеля с использованием НЧЗ (Б) и Au@Pt наночастиц до (В) и после (Г) нанозимной реакции (1–19 – последовательные разведения положительной пробы, 0 – отрицательная проба) (на основании [C111])



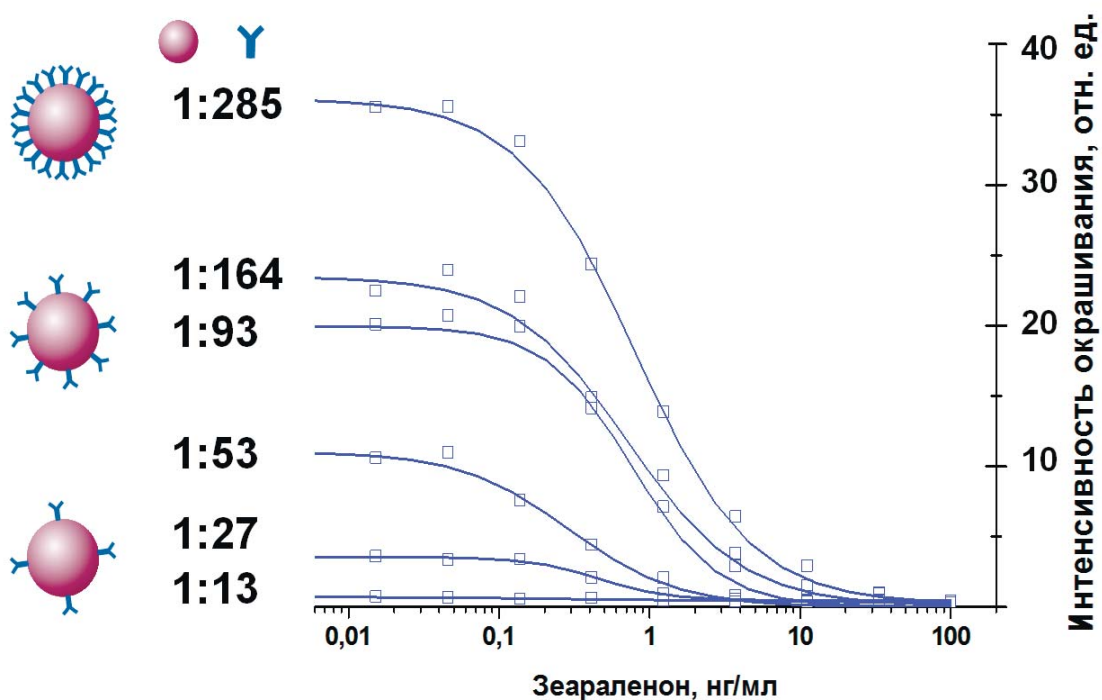
**Рис. 37.** Концентрационные зависимости иммунохроматографического выявления RBD антигена вируса SARS-CoV-2 при использовании разных вариантов модификации наночастиц–маркеров (на основании [C109])

Охарактеризованы возможности видеоцифровой регистрации результатов иммунохроматографии. Изучено ее применение для объективной интерпретации результатов и количественной оценки содержания аналитов, отличительные особенности инструментального выявления низких концентраций аналитов в конкурентных и «сэндвич» форматах иммуноанализа.

Рассмотрены аналитические задачи, требующие не рекордных пределов обнаружения, а контроля превышения определенного уровня концентрации аналита. Для этих целей предложено:

- использование зон связывания, отличающихся по содержанию и аффинности иммобилизуемых иммунореагентов и благодаря этому позволяющих контролировать несколько пороговых концентраций аналита;

- варьирование состава конъюгатов антигенный гаптен – белковый носитель и антитело – наночастица для сдвига предела обнаружения и диапазона определяемых концентраций (рис. 38);



**Рис. 38.** Оценка изменения состава конъюгатов антитело–наночастица как средства воздействия на предел обнаружения и рабочий диапазон иммунохроматографии (на основании [С33,С83])

– сдвиг порогового уровня качественной (визуальной) оценки наличия аналита добавлением его к пробе или нанесением на начальные участки тест-полоски в фиксированной концентрации, меньшей по сравнению с пороговой.

Показана эффективность описанных выше решений при иммунохроматографическом выявлении различных низко- и высокомолекулярных аналитов. Разработаны методики тестирования, исключая влияние компонентов биопроб на процессы, которые изменяют аналитические характеристики иммунохроматографии. Получены патенты на ряд решений, предложенных в ходе диссертационного исследования.

#### Общая оценка полученных результатов

Разработан комплекс способов снижения пределов обнаружения аналитов, систематизированных в соответствии с их воздействием на разные этапы проведения иммунохроматографии. Тем самым становится возможной количественная оценка принципиальных преимуществ новых форматов иммунохроматографии, отделенная от свойств реагентов определенной селективности. Предложен ряд подходов, обеспечивающих минимизацию пределов обнаружения в иммунохроматографии или соответствие пороговых уровней тест-систем наиболее информативной дифференциации положительных и отрицательных проб.



## **Глава 7. Разработка, характеристика и апробация тест-систем для обнаружения антигенов разных классов**

### Общая характеристика исследований по данному направлению

На сегодняшний день потребителям доступны тысячи тест-систем многих производителей для проведения иммунохроматографических тестирований (см. сводные данные на сайтах <http://www.biocompare.com>; <https://www.antibodies-online.com>), охватывающих все практически востребованные аналиты и позволяющих выявлять их в необходимых концентрационных диапазонах. Возникающие новые социальные заказы быстро удовлетворяются – см. для примера иммунодиагностику COVID-19 [12,108–110].

Однако, несмотря на накопленный опыт, разработка иммунохроматографических систем по-прежнему трактуется как определенное искусство. Даже наиболее подробные рекомендации [46, 64,111,112] не претендуют на однозначные алгоритмы гарантированного перехода от исходных реагентов к эффективно работающей системе. Особенности объектов разработки часто требуют дополнительных исследований, усложняя и замедляя достижение конечной цели. Поэтому важной частью исследований, представленных в диссертации, является апробация разрабатываемых тест-систем на репрезентативных выборках биопроб. Ее результаты позволят оценить эффективность предложенных способов совершенствования иммунохроматографии, а также учесть требования к реагентам и условиям тестирования, предъявляемые исходя из особенностей различных контролируемых соединений и видов проб.

---

См. №№ С1-С7, С9-С12, С15-С17, С19, С21-С25, С30-С32, С34, С35, С38, С40, С42, С47, С49, С50, С52, С53, С55-С57, С59-С63, С67-С71, С74-С80, С82-С84, С86-С89, С91-С94, С97-С100, С102-С111, С113, С114 «Списка научных публикаций ...» и №№ П1-П4, П8, П9, П13, П15-П18, П22, П23 «Списка патентов ...» с указанием изданий и авторских коллективов.

### Краткое изложение проведенных работ и полученных результатов

Разработаны и апробированы экспрессные аналитические системы для решения ряда задач медицинской и агротехнической диагностики, контроля качества и безопасности потребительской продукции, оценки загрязнённости окружающей среды. Определяемые аналиты существенно отличались по размерам, иммунохимическим и физико-химическим свойствам, что позволило оценить универсальность решений, предложенных в диссертационной работе для обеспечения высокочувствительной и производительной иммунохроматографии.

Проведенные работы включали:

- получение и характеристику реагентов – компонентов тест- систем;
- выбор наиболее эффективных протоколов пробоподготовки;
- оптимизацию условий проведения иммунохроматографии – выбор концентраций и состава реагентов, режимов их нанесения на мембраны тест-полоски, стабилизирующих реагентов, дополнительных обработок мембран;
- описание формирования иммунных комплексов при разных условиях взаимодействия при проведении иммунохроматографии;
- метрологическую характеристику тест-систем (пределы обнаружения, рабочие диапазоны, воспроизводимость количественных измерений);
- оценку селективности тест-систем по отношению к структурным аналогам и метаболитам определяемых соединений;
- оценку стабильности аналитических характеристик тест-систем при разных режимах их хранения;
- оценку полноты выявления целевых аналитов при тестировании разных матриц;
- характеристику применения разработанных систем к реальным пробам, в том числе сравнение с альтернативными методиками.

Результаты разработок суммированы в табл. 9.

**Таблица 9.** Основные характеристики разработанных иммунохроматографических систем

<i><b>Аналит</b></i>	<i><b>Аналитический метод, его особенности</b></i>	<i><b>Предел обнаружения</b></i>
Пестициды / пробы растительных сельскохозяйственных культур и соков, модельные растворы		
2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота	ИХ с НЧЗ	12 нг/мл
Атразин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Поверхностно активные вещества ./ пробы бытовых и сточных вод		
Бисфенол А	ИХ с НЧЗ	0,1 пг/мл
Микотоксины / пробы зерновой сельскохозяйственной продукции, детского питания		
Охратоксин А	ИХ с НЧЗ	5 нг/мл
Афлатоксин В1	ИХ с НЧЗ	160 пг/мл
Зеараленон	ИХ с НЧЗ	5 пг/мл
Т-2 токсин	ИХ с НЧЗ	0,05 нг/мл
Дезоксиниваленол	ИХ с НЧЗ	125 нг/мл (2,2 мкг/г)
Фумонизин В1	ИХ с НЧЗ	0,6 нг /мл
Антибиотики и бактериостатики / пробы молока, мяса, мёда, контроль в крови пациентов		
Хлорамфеникол	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Хлорамфеникол	ИХ с квантовыми точками	0,1 нг/мл
Ампициллин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Стрептомицин	ИХ с НЧЗ	15 нг/мл
Офлоксацин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Ципрофлоксацин	ИХ с НЧЗ	10 пг/мл
Тетрациклин	ИХ с НЧЗ	0,4 нг/мл
Бацитрацин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Амфеникол	ИХ с НЧЗ	0,5 нг/мл
Тилозин	ИХ с НЧЗ	0,09 нг/мл
Линкомицин	ИХ с НЧЗ	8 пг/мл
Неомицин	ИХ с НЧЗ	0,1 нг/мл
Пищевые красители / пробы пищевых продуктов		
Судан I	ИХ с НЧЗ	2,5 нг/мл
Бета-агонисты / пробы мяса		
Рактопамин	ИХ с НЧЗ	0,05 нг/мл

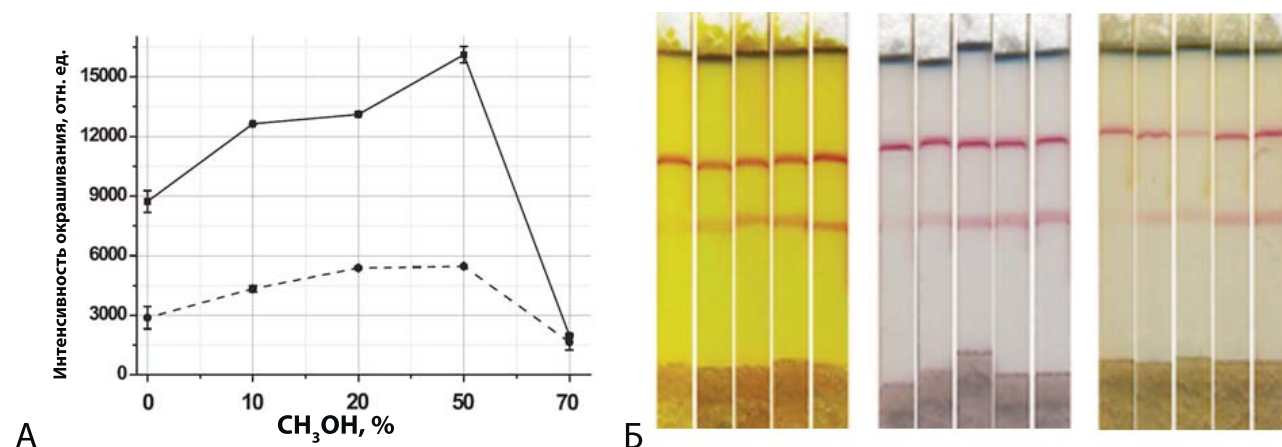
Сальбутамол	ИХ с НЧЗ	0,08 нг/мл
Фитотоксины / контроль растительных экстрактов		
Колхицин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Фикотоксины / пробы рыбы и морепродуктов		
Микроцистин	ИХ с НЧЗ	0,2 нг/мл
Психоактивные вещества / контроль в моче пациентов		
Морфин	Мульти-ИХ	3,5 нг/мл
Кокаин	Мульти-ИХ	7,5 нг/мл
Амфетамин	Мульти-ИХ	1,5 нг/мл
Метамфетамин	Мульти-ИХ	27,5 нг/мл
Кардиомаркеры / контроль в крови пациентов		
Тропонин I	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Д-димер	ИХ с НЧЗ	100 нг/мл
Белок, связывающий жирные кислоты	ИХ с НЧЗ	3,8 нг/мл
Воспалительные маркеры / контроль в крови пациентов		
С-реактивный белок	ИХ с НЧЗ	600 нг/мл
С-реактивный белок	ИХ с флуоресцентным маркером	1 нг/мл
Прокальцитонин	ИХ с НЧЗ	1 нг/мл
Белковые маркеры для идентификации мясного сырья / пробы мяса и мясопродуктов		
Тропонин I	ИХ с НЧЗ	25 нг/мл
Миоглобин	ИХ с НЧЗ	5 нг/мл
Иммуноглобулин G	ИХ с НЧЗ	9,8 нг/мл
Иммуноглобулин Y	ИХ с НЧЗ	8,2 нг/мл
Прочие биомаркеры / контроль в моче и крови пациентов		
Человеческий сывороточный альбумин	ИХ с НЧЗ	70 нг/мл (моча)
Эпидермальный фактор роста человека	ИХ с НЧЗ	10 пг/мл
Общий уровень IgE	ИХ с квантовыми точками	2 МЕ/мл
Специфические антитела к бактериальным патогенам и к аллергенам / контроль в крови (люди, крупный рогатый скот)		
Антитела к возбудителю туберкулеза	ИХ с НЧЗ	160 нг/мл
Антитела к аллергену тимофеевки	ИХ с НЧЗ	15 МЕ/мл

Антитела к возбудителю бруцеллеза	ИХ с НЧЗ	200 МЕ/мл
Бактериальные патогены человека и животных / контроль разных видов биопроб		
Дифтерийный токсин	ИХ с НЧЗ	3 нг/мл
Возбудитель туберкулеза	ИХ с НЧЗ	10 <sup>6</sup> клеток/мл
Возбудитель бруцеллеза	ИХ с НЧЗ	10 <sup>5</sup> клеток/мл
Возбудитель туберкулеза крупного рогатого скота	ИХ с НЧЗ	10 <sup>6</sup> клеток/мл
<i>Helicobacter pylori</i>	ИХ с НЧЗ	30 нг/мл
Вирусные и бактериальные патогены растений / контроль в сельскохозяйственных растениях		
Вирус шарки сливы	ИХ с НЧЗ	3 нг/мл
X вирус картофеля	ИХ с НЧЗ	8 нг/мл
X вирус картофеля	ИХ с ферментативным усилением	0,3 нг/мл
X вирус картофеля	ИХ с двойным усилением	0,25 нг/мл
X вирус картофеля	ИХ с наращиванием НЧЗ	17 пг/мл
X вирус картофеля	ИХ с изотермической амплификацией	0,14 нг/г
Вироид картофеля	ИХ с изотермической амплификацией	10 <sup>6</sup> копий
<i>Clavibacter michiganensis</i>	ИХ с НЧЗ	10 <sup>5</sup> КОЕ/мл
<i>Clavibacter michiganensis</i>	ИХ с нанозимным усилением	3*10 <sup>2</sup> КОЕ/мл
<i>Dickeya solani</i>	ИХ с НЧЗ	10 <sup>5</sup> КОЕ/мл
<i>Dickeya solani</i>	ИХ с изотермической амплификацией	1,4*10 <sup>3</sup> КОЕ/г
<i>Pectobacterium atrosepticum</i>	ИХ с НЧЗ	2*10 <sup>5</sup> КОЕ/мл
<i>Ralstonia solanacearum</i>	ИХ с НЧЗ	2*10 <sup>2</sup> КОЕ/мл
Вирус скручивания листьев картофеля	ИХ с НЧЗ	3 нг/мл

Адаптация аналитических систем к контролю разных видов проб потребовала разработки дополнительных решений, обеспечивающих эффективные иммунные взаимодействия и учет особенностей выявляемых аналитов и характеризующих биоматрикс.

Так, например, для иммунохроматографии микотоксинов и пищевых красителей, характеризующихся низкой растворимостью в водно-

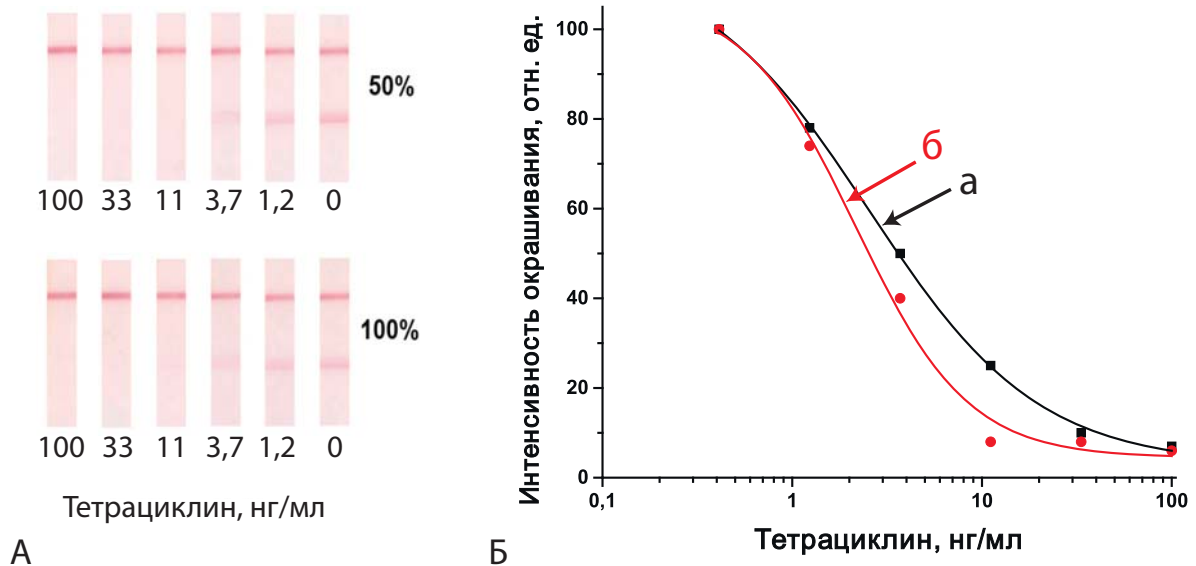
солевых средах, сопоставлена эффективность иммунных взаимодействий при разном составе водно-органических смесей (рис. 39). Выбраны оптимальные сочетания растворов для экстракции аналитов (до 50–70% метанола) и последующего проведения иммунохроматографии (разбавление до 15–20% метанола).



**Рис. 39.** Иммунохроматографическое выявление пищевого красителя Судан I: зависимость регистрируемого оптического сигнала от концентрации метанола для двух комплекций тест-системы (А) и внешний вид тест-полосок при тестировании разных пищевых продуктов (Б) (на основании [С42])

Для иммунохроматографии линейных алкилбензолсульфонатов, экотоксикантов с эндокринразрушающей активностью, предложено исключение из реакционной среды традиционно используемых детергентов, препятствующих доступности аналитов для антител, и выбраны белковые компоненты, предотвращающие неспецифические взаимодействия в ходе иммунохроматографии.

Иммунореагенты – компоненты тест-систем для выявления антибиотиков, контролируемых в качестве токсичных контаминант пищевой продукции, адаптированы для мониторинга антибиотиков в крови человека (см. для примера рис. 40). Информация, получаемая при одновременном контроле в крови уровней антибиотиков и воспалительных маркеров с использованием разработанных тест-систем, обеспечивает возможность оценки эффективности антибиотикотерапии и выбора индивидуальной дозировки препаратов.

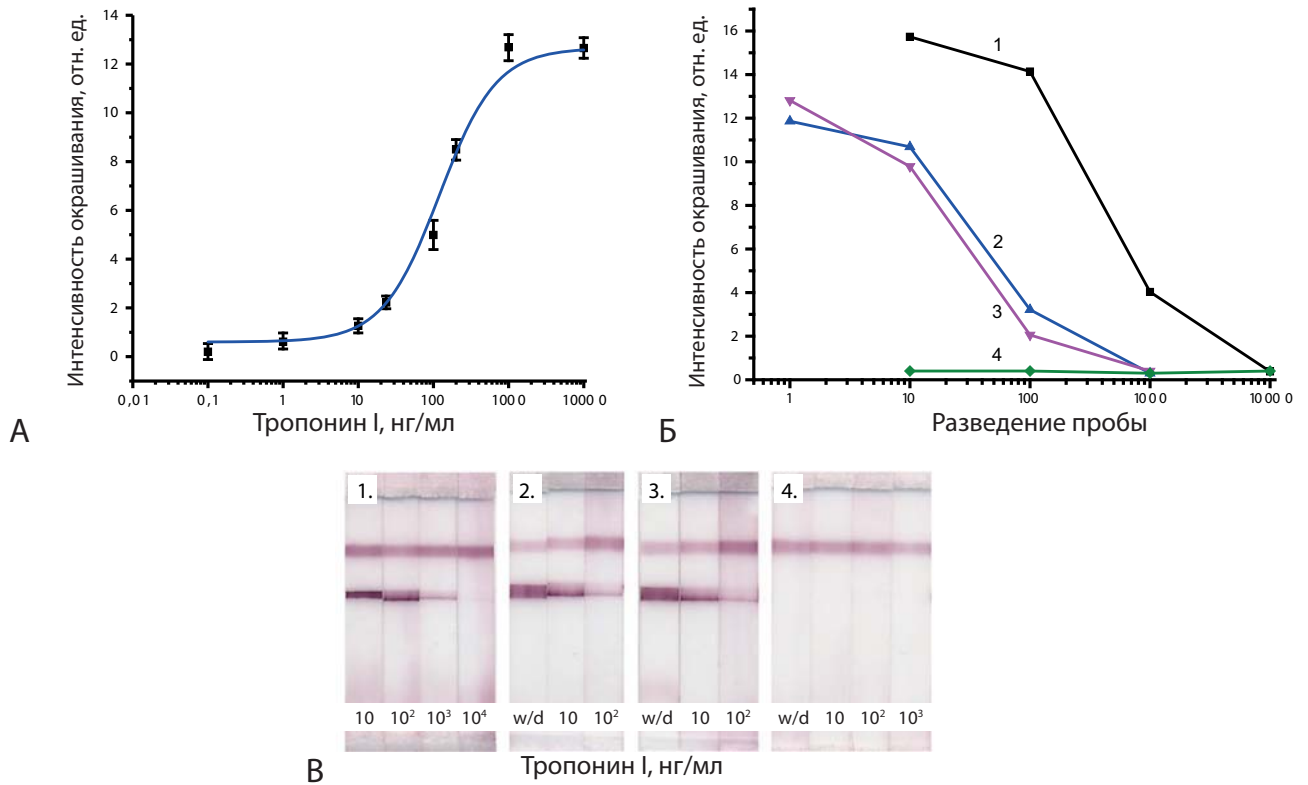


**Рис. 40.** Внешний вид тест-полосок (А) и концентрационные зависимости интенсивности окрашивания тестовой зоны (Б) при определении тетрациклина в крови человека (а – неразбавленная проба, б – двукратное разведение) (на основании [С55])

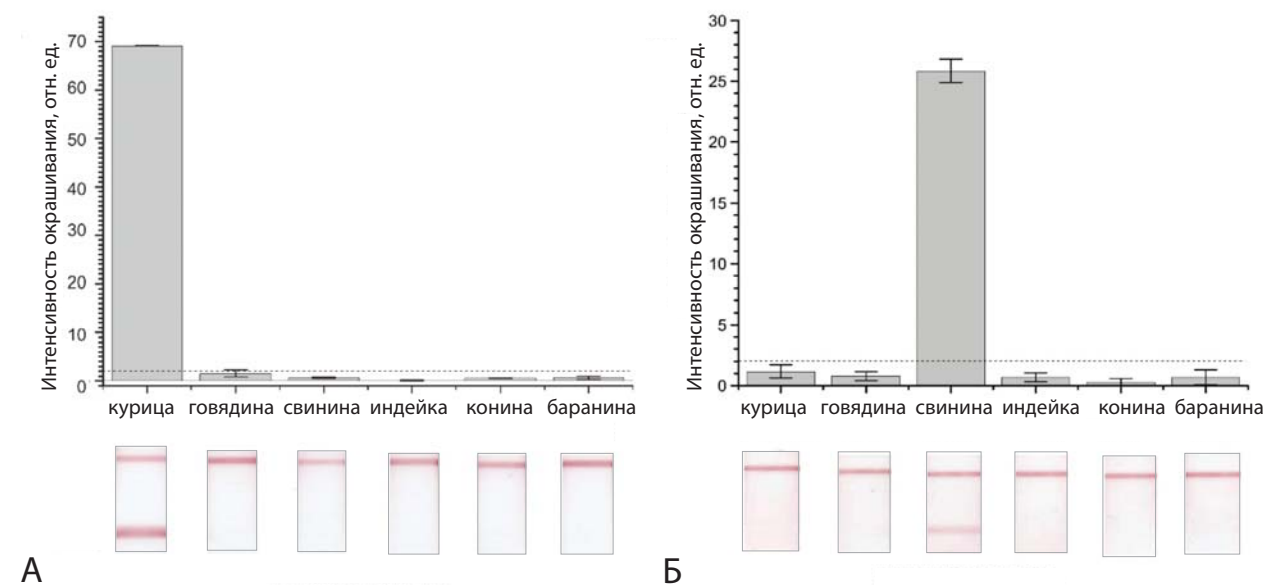
При выборе белковых идентификаторов видовой принадлежности сырья в производстве мясопродуктов показаны преимущества тропонинов как термостабильных белков с негидролизруемыми антигенными детерминантами. Предложены быстрые протоколы пробоподготовки, минимизирующие влияние матрикса проб на результаты тестирования, но сохраняющие антигенные свойства тропонинов. Охарактеризованы возможности контроля в мясном сырье и конечных продуктах миоглобинов и иммуноглобулинов как селективных биомаркеров разных систематических групп теплокровных животных. Сформирована и апробирована панель тест-систем для характеристики состава мясопродуктов (см. для примера рис. 41).

Предложен ряд аналитических систем обнаружения фитопатогенов и идентификации сырья при производстве мясных продуктов с интеграцией изотермической амплификации селективно выявляемых нуклеотидных последовательностей и быстрого бесприборного контроля продуктов амплификации с помощью тест-полосок (рис. 42).

Установлены требования к используемым мембранным компонентам и дополнительным взаимодействующим межмолекулярным модулям.



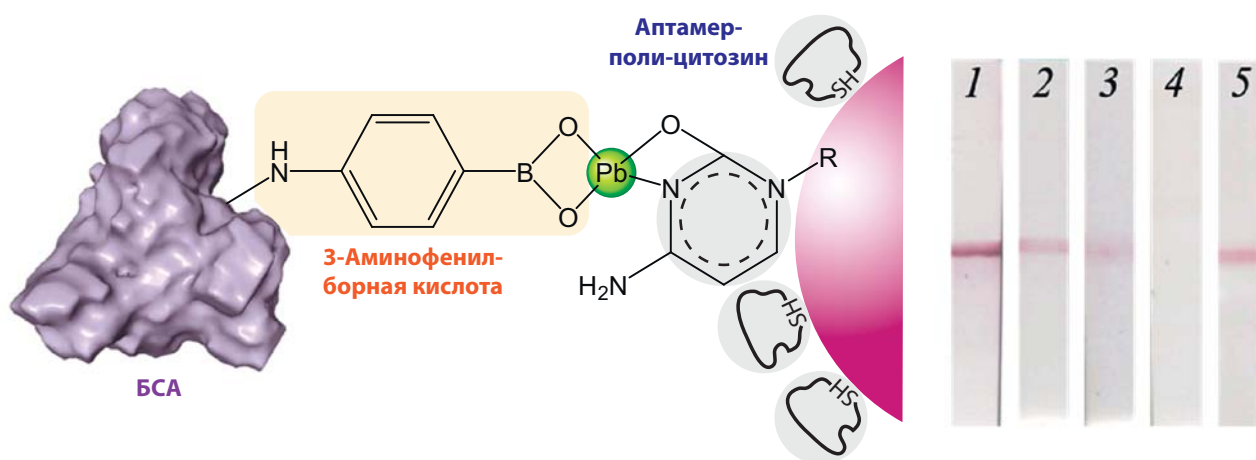
**Рис. 41.** Иммунохроматографическое выявление тропонина I в мясопродуктах: калибровочная кривая (А), интенсивности окрашивания (Б) и внешний вид тест-полосок (В) при тестировании проб с разным содержанием тропонина I: 1 – мясной фарш, 2, 3 – мясосодержащие сосиски, 4 – вегетарианские сосиски (на основании [С99])



**Рис. 42.** Характеристика селективности выявления куриного (А) и свиного (Б) мяса в пищевых продуктах при использовании сочетания рекомбиназной полимеразной реакции и иммунохроматографии (на основании [С106])



Для обнаружения ионов тяжелых металлов реализован вариант проточного мембранного анализа с использованием олигонуклеотидных рецепторов – аптамеров (рис. 43).



**Рис. 43.** Взаимодействия при аптахромографическом обнаружении ионов свинца и внешний вид тест-полосок (на основании [С102])

В рамках совместных работ с профильными научными организациями – Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Федеральный исследовательский центр картофеля им. А.Г. Лорха, Всероссийский центр карантина растений, Национальный центр биотехнологии (Нурсултан, Казахстан) и др. – проведена апробация разработанных аналитических систем на репрезентативных панелях биопроб, оценка корреляции результатов, получаемых с использованием новых и традиционных аналитических систем, а также характеристика конкурентных преимуществ предложенных подходов.

### Общая оценка полученных результатов

Следует признать, что на сегодняшний день по-прежнему отсутствуют универсальные протоколы, которые бы сводили разработку новой иммунохроматографической тест-системы к реализации стандартного алгоритма и гарантировали получение требуемых

результатов за фиксированное время. Однако в ходе проведенных исследований предложен и апробирован ряд подходов, расширяющих методический инструментарий таких разработок, упрощающих адаптацию тест-систем к особенностям различных видов проб.

Результаты апробации иммунохроматографических систем при тестировании разных видов биопроб подтверждают эффективность и универсальность способов обеспечения низких пределов определения и высокой производительности, предложенных в ходе диссертационного исследования.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Итоги выполненного исследования**

Представленные выше результаты отражают разработку общего инструментария для описания иммунохроматографических систем и оценки возможностей их аналитического применения, включающего математические модели, закономерности иммунных взаимодействий в разных условиях, способы управления количеством и кинетикой образования выявляемых иммунных комплексов.

Исходя из установленных закономерностей, предложен ряд новых подходов к управлению селективностью и пределами обнаружения иммунохроматографических систем; экспериментально подтверждена их эффективность. Для разработанных систем, реализующих данные подходы при выявлении ряда практически значимых аналитов (представителей пестицидов, микотоксинов, антибиотиков и бактериостатиков, биомаркеров острого инфаркта миокарда и воспалительных процессов, маркеров для идентификации сырья в мясопродуктах, антител к патогенам человека и животных, вирусных и бактериальных патогенов), показано снижение пределов обнаружения на один–два порядка по сравнению с традиционной иммунохроматографией, что делает эти системы эффективной альтернативой приборным иммуноаналитическим методам.

### **Выводы**

Полученные в диссертационной работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Поливалентные взаимодействия антиген–антитело разнонаправленно влияют на иммунохроматографические системы с конкурентным и неконкурентным связыванием антигенов. Так, для корпускулярных антигенов (вирусы растений) поливалентные взаимодействия

приводят к снижению кинетических констант диссоциации до двух порядков с сопоставимым снижением пределов обнаружения в сэндвич-формате иммунохроматографии.

2. Процессы в иммунохроматографических системах представляют собой сочетание гомогенных взаимодействий, приближающихся к химическому равновесию, и гетерогенных взаимодействий, реализуемых в неравновесных условиях. Данное положение позволяет предложить математические модели форматов иммунохроматографии, которые имеют алгебраические решения и позволяют характеризовать факторы, влияющие на формирование выявляемых иммунных комплексов. Корректность таких описаний подтверждается соответствием расчетных и экспериментальных зависимостей.
3. Использование при проведении иммунохроматографии магнитных частиц в качестве носителей антител обеспечивает интеграцию быстрых процессов формирования иммунных комплексов и их отделения. Осуществляемые таким образом концентрирование и очистка иммунных комплексов приводят к снижению пределов обнаружения до 50 раз.
4. Иммобилизация антител на поверхности металлических наночастиц повышает их устойчивость к действию органических растворителей и делает возможным проведение иммунохроматографии гидрофобных соединений (микотоксины, ряд пестицидов и пищевых красителей) в присутствии до 30% метанола.
5. Изменение состава конъюгатов низкомолекулярный антиген – белковый носитель и антитело – нанодисперсный носитель позволяет при проведении иммунохроматографии установить требуемый порог концентрации аналита, разделяющий положительные и отрицательные результаты тестирования проб.

6. Варьирование концентраций и соотношения иммунореагентов при проведении конкурентного иммуноанализа, влияя на комплексообразование с антителами структурно близких антигенов, вызывает изменение селективности их выявления.
7. Показано снижение пределов обнаружения иммунохроматографических систем на один–два порядка при управлении последовательностью взаимодействий и усилении регистрируемого сигнала посредством ряда подходов, в том числе непрямо́й иммобилизации антител на поверхности наночастиц и агрегации функционализированных наночастиц при их движении по мембранам.

#### **Рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы**

Общий характер установленных закономерностей, подтвержденный демонстрацией применимости для различных антигенов и наночастиц, позволяет рекомендовать их к использованию при разработке систем иммунохроматографического выявления различных новых аналитов, значимых для медицинской и ветеринарной диагностики, контроля качества и безопасности продуктов питания и другой потребительской продукции, экологического мониторинга, обеспечения биобезопасности, а также контролируемых при реализации биотехнологических процессов и проведении фундаментальных био- и иммунохимических исследований.

Помимо этого направления исследований, перспективными задачами для дальнейшей разработки темы, развития предложенных в диссертационной работе подходов и решений представляются:

1. Повышение точности измерения содержания аналитов при использовании иммунохроматографических систем для тестирования различных видов поликомпонентных проб.

2. Адаптация принципа иммунохроматографии к тестированию больших объемов проб, непрерывному мониторингу появления аналита в контролируемых объектах.
3. Создание производных антител и носителей на их основе, обеспечивающих максимальное связывание антигенов в неравновесных условиях взаимодействий.
4. Разработка способов достоверного выявления в пробах единичных молекул аналитов на основании иммунных взаимодействий.
5. Применение иммунохроматографических систем для количественной характеристики содержания в пробе нескольких структурно близких соединений с использованием перекрестно реагирующих антител.
6. Применение в проточных мембранных аналитических системах рецепторных молекул разных классов – аптамеров, комплементарных олигонуклеотидов, полимеров с молекулярными отпечатками и др.
7. Теоретические описания и рекомендации по управлению пределом обнаружения и селективностью для других иммуноаналитических и иммуносенсорных систем.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rees A.R. Understanding the human antibody repertoire // *MAbs*. – 2020. – V. 12, N 1. – Article 1729683.
2. Rudenko N., Fursova K., Shepelyakovskaya A., Karatovskaya A., Brovko F. Antibodies as biosensors' key components: State-of-the-art in Russia 2020–2021 // *Sensors*. – 2021. – V. 21, N 22. – Article 7614.
3. Mattes M.J. Binding parameters of antibodies – a reappraisal // *Tumor Targeting*. – 1999. – V. 4, N 2. – P. 63–69.
4. Robin M., Tayakout-Fayolle M., Pitault I., Jallut C., Drazek L. Estimation of kinetic parameters involved in solid-phase immunoassays by affinity chromatography // *Industrial and Engineering Chemistry Research*. – 2020. – V. 59, N 24. – P. 11113–11124.
5. Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Kaplun A.P., Dzantiev B.B. Experimental study and mathematical modeling of the interaction between antibodies and antigens on the surface of liposomes // *Molecular Immunology*. – 2002. – V. 39, N 7-8. – P. 413–422.
6. Dzantiev B.B., Urusov A.E., Zherdev A.V. Modern techniques of immunochemical analysis: Integration of sensitivity and rapidity // In: «Biochemistry and Biotechnology for Modern Medicine» (ed. S. Komisarenko). – Kyiv: Moskalenko, 2013. – P. 382–399..
7. Wu A.H.B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry // *Clinica Chimica Acta*. – 2006. – V. 369, N 2. – P. 119–124.
8. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В. Иммуноаналитические методы // В кн.: «Биохимические методы анализа» (под ред. Б.Б. Дзантиева). – М.: Наука, 2010. – С. 303–332.
9. Wood W.G. The discovery and development of the antigen-antibody reaction. Part 1: A brief history // In: «Antibodies Applications and New Developments» (ed. E.P. Meulenberg). – Sharja: Bentham Science, 2012. – P. 3–13.
10. O'Farrell B. Evolution in lateral flow-based immunoassay systems // In: «Lateral Flow Immunoassay» (eds. R. Wong, H. Tse). – New York: Humana Press, 2009. – P. 1–33.
11. Leavitt S. "A private little revolution": The home pregnancy test in American culture // *Bulletin of the History of Medicine*. – 2006. – V. 80, N 2. – P. 317–345.
12. Zhou Y.F., Wu Y.H., Ding L., Huang X.L., Xiong Y.H. Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay // *TRAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 145. – Article 116452.
13. Carnegie P.R., Pacheco G. Immunochromatography: A combination of chromatography and immunodiffusion on a micro-scale // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. – 1964. – V. 117, N 1. – P. 137–141.

14. Blake A., Coley J., Smith R. Devices for carrying out chemical and clinical tests, and their use // US Patent. – 1985. – N 4,742,011.
15. Campbell R.L., Wagner D.B., O'Connell J.P. Solid-phase assay with visual readout // US Patent. – 1987. – N 4,703,017.
16. Rosenstein R.W., Bloomster T.G. Solid-phase assay employing capillary flow // US Patent. – 1989. – N 4,855,240.
17. Weller M.G. Immunochromatographic techniques – a critical review // Fresenius Journal of Analytical Chemistry. – 2000. – V. 366, N 6–7. – P. 635–645.
18. Von Lode P. Point-of-care immunotesting: Approaching the analytical performance of central laboratory methods // Clinical Biochemistry. – 2005. – V. 38, N 7. – P. 591–606.
19. Lidgard G., Park R. Simplifying detection technologies // IVD Technologies. – 2006. – May issue. – P. 28–33.
20. Goryacheva I.Yu., Lenain P., De Saeger S. Nanosized labels for rapid immunotests // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. – 2013. – V. 46. – P. 30–43.
21. Quesada-Gonzalez D., Merkoci A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors // Biosensors and Bioelectronics. – 2015. – V. 73. – P. 47–63.
22. Fenzl C., Hirsch T., Baeumner A.J. Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. – 2016. – V. 79. – P. 306–316.
23. Liu L.Y., Yang D.T., Liu G.Z. Signal amplification strategies for paper-based analytical devices // Biosensors and Bioelectronics. – 2019. – V. 136. – P. 60–75.
24. Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H. Sensitivity enhancement in lateral flow assays: a systems perspective // Lab on a Chip. – 2019. – V. 19, N 15. – P. 2486–2499.
25. Shirshahi V., Liu G.Z. Enhancing the analytical performance of paper lateral flow assays: From chemistry to engineering // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. – 2021. – V. 136. – Article 116200.
26. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы улучшения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 107–116.
27. Anfossi L., Di Nardo F., Cavalera S., Giovannoli C., Baggiani C. Multiplex lateral flow immunoassay: An overview of strategies towards high-throughput point-of-need testing // Biosensors. – 2019. – V. 9, N 1. – Article 2.
28. Wu Y.H., Zhou Y.F., Leng Y.K., Lai W.H., Huang X.L., Xiong Y.H. Emerging design strategies for constructing multiplex lateral flow test strip sensors // Biosensors and Bioelectronics. – 2020. – V. 157. – Article 112168.
29. Manmana Y., Kubo T., Otsuka K. Recent developments of point-of-care (POC) testing platform for biomolecules // TrAC – Trends in Analytical Chemistry. – 2021. – V. 135. – Article 116160.



30. Mak W.C., Beni V., Turner A.P.F. Lateral-flow technology: From visual to instrumental // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2016. – V. 79. – P. 297–305.
31. Quesada-Gonzalez D., Merkoci A. Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2017. – V. 92. – P. 549-562.
32. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches // *Biosensors*. – 2019. – V. 9, N 3. – Article 89.
33. Kholafazad-Kordasht H., Hasanzadeh M., Seidi F. Smartphone based immunosensors as next generation of healthcare tools: Technical and analytical overview towards improvement of personalized medicine // *TrAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 145. – Article 116455.
34. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О., Венгеров Ю.Ю., Старовойтова Т.А., Тогузов Р.Т. Системы экспрессной иммунодетекции биологически активных соединений // *Клиническая и лабораторная диагностика*. – 2002. – № 8. – С. 25–32.
35. Бызова Н.А., Баландина Ю.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографических тест-систем и методов количественной регистрации результатов мембранного анализа // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*. – 2003. – Т. 7, № 9. – С. 189–192.
36. Бызова Н.А., Ярков С.П., Злобин В.Н., Смирнова Н.И., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографического экспресс-теста для выявления микроальбуминурии // *Физиология и патология иммунной системы*. – 2005. – Т. 7, № 8. – С. 41–45.
37. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс // М.: Фаир-Пресс, 1999. —720 с.
38. Ancheyta J. Chemical reaction kinetics: Concepts, methods and case studies // John Wiley & Sons Ltd., 2017. – 287 p.
39. Zhang H.D., Williams P.S., Zborowski M., Chalmers J.J. Binding affinities/avidities of antibody-antigen interactions: Quantification and scale-up implications // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2006. – V. 95, N 5. – P. 812–829.
40. Lindenberg K., Metzler R., Oshanin G. Chemical kinetics: Beyond the textbook // World Scientific Publishing Europe Ltd., 2019. – 605 p.
41. Englebienne P. Use of colloidal gold surface plasmon resonance peak shift to infer affinity constants from the interactions between protein antigens and antibodies specific for single or multiple epitopes // *Analyst*. – 1998. – V. 123, N 7. – P. 1599–1603.
42. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent-assay // *Journal of Immunological Methods*. – 1985. – V. 77, N 2. – P. 305–319.
43. Bobrovnik S.A. Determination of antibody affinity by ELISA. Theory // *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. – 2003. – V. 57, N 3. – P. 213–236.

44. Torano A., Moreno I., Infantes J.A., Dominguez M. Development of a competitive inhibition kinetic ELISA to determine the inhibition constant ( $K_i$ ) of monoclonal antibodies // *Journal of Immunological Methods*. – 2021. – V. 493. – Article 113042.
45. Mottin D., Razan F., Nogues C., Jullien M.C. Out-of-equilibrium measurements of kinetic constants on a biosensor // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93, N 19. – P. 7266–7274.
46. Rapid lateral flow test strips, considerations for product development / Merck Millipore // Billerica, MA, USA: EMD Millipore Corporation. – 2013. – 36 p.
47. Mosley G.L., Nguyen P., Wu B.M., Kamei D.T. Development of quantitative radioactive methodologies on paper to determine important lateral-flow immunoassay parameters // *Lab on a Chip*. – 2016. – V. 16, N 15. – P. 2871–2881.
48. Rey E.G., O'Dell D., Mehta S., Ericicson D. Mitigating the hook effect in lateral flow sandwich immunoassays using real-time reaction kinetics // *Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 89, N 9. – P. 5095–5100.
49. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / М.: Высшая школа, 1991. – 288 с.
50. Weller M.G. Classification of protein microarrays and related techniques // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2003. – V. 375, N 1. – P. 15–17.
51. *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques* (ed. D. Wild). – Amsterdam, Netherlands, Elsevier Science. – 4th edition. – 2013. – 1036 p.
52. Sharma S., Byrne H., O'Kennedy R.J. Antibodies and antibody-derived analytical biosensors // *Biosensor Technologies for Detection of Biomolecules*. – 2016. – V. 60, N 1. – P. 9–18.
53. Qian S., Bau H.H. A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // *Analytical Biochemistry*. – 2003. – V. 322, N 1. – P. 89–98.
54. Qian S., Bau H.H. Analysis of lateral flow biodetectors: Competitive format // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – V. 326, N 2. – P. 211–224.
55. Zeng N.Y., Wang Z.D., Li Y.R., Du M., Liu X.H. Inference of nonlinear state-space models for sandwich-type lateral flow immunoassay using extended Kalman filtering // *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. – 2011. – V. 58, N 7. – P. 1959–1966.
56. Berli C.L.A., Kler P.A. A quantitative model for lateral flow assays // *Microfluidics and Nanofluidics*. – 2016. – V. 20, N 7. – Article 104.
57. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Математическое моделирование биоаналитических систем // *Успехи биологической химии*. – 2017. – Т. 57. – С. 385–438.
58. Gasperino D., Baughman T., Hsieh H.V., Bell D., Weigl B.H. Improving lateral flow assay performance using computational modeling // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2018. – V. 11. – P. 219–244.
59. Liu Z., He X.C., Li A., Qu Z.G., Xu F. A two-dimensional mathematical model for analyzing the effects of capture probe properties on the performance of lateral flow assays // *Analyst*. – 2019. – V. 144, N 18. – P. 5394–5403.

60. Zeng N.Y., Wang Z.D., Zhang H., Kim K.E., Li Y.R., Liu X.H. An improved particle filter with a novel hybrid proposal distribution for quantitative analysis of gold immunochromatographic strips // *IEEE Transactions on Nanotechnology*. – 2019. – V. 18. – P. 819–829.
61. Spicer C.D., Jumeaux C., Gupta B., Stevens M.M. Peptide and protein nanoparticle conjugates: versatile platforms for biomedical applications // *Chemical Society Reviews*. – 2018. – V. 47. – P. 3574–3620.
62. Posthuma-Trumpie G.A., Wichers J.H., Koets M., Berendsen L.B.J.M., van Amerongen A. Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 402, N 2. – P. 593–600.
63. Gong X.Q., Cai J., Zhang B., Zhao Q., Piao J.F., Peng W.P., Gao W.C., Zhou D.M., Zhao M., Chang J. A review of fluorescent signal-based lateral flow immunochromatographic strips // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2017. – V. 5, N 26. – P. 5079–5091.
64. Connolly R., O'Kennedy R. Magnetic lateral flow immunoassay test strip development – Considerations for proof of concept evaluation // *Methods*. – 2017. – V. 116. – P. 132–140.
65. Yang J.C., Wang K., Xu H., Yan W.Q., Jin Q.H., Cui D.X. Detection platforms for point-of-care testing based on colorimetric, luminescent and magnetic assays: A review // *Talanta*. – 2019. – V. 202. – P. 96–110.
66. Moyano A., Serrano-Pertierra E., Salvador M., Martinez-Garcia J.C., Rivas M., Blanco-Lopez M.C. Magnetic lateral flow immunoassays // *Diagnostics*. – 2020. – V. 10, N 5. – Article 288.
67. Mulvaney S.P., Kidwell D.A., Lanese J.N., Lopez R.P., Sumera M.E. Wei E. Catalytic lateral flow immunoassays (cLFIA<sup>(TM)</sup>): Amplified signal in a self-contained assay format // *Sensing and Bio-Sensing Research*. – 2020. – V. 30. – Article 100390.
68. Yan J., Liu Y.Y., Wang Y.L., Xu X.W., Lu Y., Pan Y.J., Guo F.F., Shi D.L. Effect of physiochemical property of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> particle on magnetic lateral flow immunochromatographic assay // *Sensors and Actuators B Chemical*. – 2014. – V. 197. – P. 129–136.
69. Worsley G.J., Kumarswami N., Minelli C., Noble J.E. Characterisation of antibody conjugated particles and their influence on diagnostic assay response // *Analytical Methods*. – 2015. – V. 7, N 22. – P. 9596–9603.
70. Babaei-Afrapoli Z., Faridi-Majidi R., Negahdari B., Dabir K., Tavoosidana G. Evaluating gold nanoparticles parameters in competitive immunochromatographic assay via dot blot and Bradford assay as new approaches // *Microchemical Journal*. – 2021. – V. 170. – Article 106525.
71. Tisone T.C., O'Farrell B. Manufacturing the next generation of highly sensitive and reproducible lateral flow immunoassay // In: «Lateral Flow Immunoassay» (eds. R. Wong, H. Tse). – New York: Humana Press, 2009. – P. 131–156.
72. Saha B., Evers T.H., Prins M.W.J. How antibody surface coverage on nanoparticles determines the activity and kinetics of antigen capturing for biosensing // *Analytical Chemistry*. – 2014. – V. 86, N 16. – P. 8158–8166.

73. Tripathi K., Driskell J.D. Quantifying bound and active antibodies conjugated to gold nanoparticles: A comprehensive and robust approach to evaluate immobilization chemistry // *ACS Omega*. – 2018. – V. 3, N 7. – P. 8253–8259.
74. Di Nardo F., Cavalera S., Baggiani C., Giovannoli C., Anfossi L. Direct vs mediated coupling of antibodies to gold nanoparticles: The case of salivary cortisol detection by lateral flow immunoassay // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2019. – V. 11, N 36. – P. 32758–32768.
75. Miller J.J., Levinson S.S. Interferences in Immunoassay // Chapter 7. In: «Immunoassay» (eds. E.D. Diamandis, T.K Christopoulos) / San Diego: Humana Press, 1996. – P. 165–190.
76. McGrath T.F., Elliott C.T., Fodey T.L. Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 4032, N 1. – P. 75–92.
77. Zhang Z., Zeng K., Liu J.F. Immunochemical detection of emerging organic contaminants in environmental waters // *TRAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 87. – P. 49–57.
78. Richardson S.D., Kimura S.Y. Water analysis: Emerging contaminants and current issues // *Analytical Chemistry*. – 2020. – V. 92, N 1. – P. 473–505.
79. Winger L.A., Dessi J.L., Self C.H. Enhanced specificity for small molecules in a convenient format which removes a limitation of competitive immunoassay // *Journal of Immunological Methods*. – 1996. – V. 199, N 2. – P. 185–191.
80. Marega R., Desroche N., Huet A.C., Paulus M., Pantaleon C.S., Larose D., Arbault P., Delahaut P., Gillard N. A general strategy to control antibody specificity against targets showing molecular and biological similarity: *Salmonella* case study // *Scientific Reports*. – 2020. – V. 10, N 1. – Article 18439.
81. Oubina A., Barcelo D., Marco M.P. Effect of competitor design on immunoassay specificity: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for 2,4-dinitrophenol // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – V. 387, N 3. – P. 267–279.
82. Pastor-Navarro N., Gallego-Iglesias E., Maquieira A., Puchades R. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides – Application to bee honey analysis // *Talanta*. – 2007. – V. 71, N 2. – P. 923–933.
83. Burkin M.A., Galvidis I.A., Eremin S.A. Specific and generic immunorecognition of glycopeptide antibiotics promoted by unique and multiple orientations of hapten // *Biosensors*. – 2009. – V. 9, N 2. – Article 52.
84. Yuan M., Liu B., Liu E.M., Sheng W., Zhang Y., Crossan A., Kennedy I., Wang S. Immunoassay for phenylurea herbicides: Application of molecular modeling and quantitative structure-activity relationship analysis on an antigen-antibody interaction study // *Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 83, N 12. – P. 4767–4774.
85. Wang L.T., Jiang W.M., Shen X., Li X.M., Huang X.A., Xu Z.L., Sun Y.M., Chan S.W., Zeng L.W., Eremin S.A., Lei H.T. Four hapten spacer sites modulating class specificity: Nondirectional multianalyte immunoassay for 31 beta-agonists and analogues // *Analytical Chemistry*. – 2018. – V. 90, N 4. – P. 2716–2724.

86. Wang J.Y., Peng T., Zhang X.Y., Xie S.L., Zheng P.M., Yao K., Ke Y.B., Wang Z.H.; Jiang H.Y. Application of quantitative structure-activity relationship analysis on an antibody and alternariol-like compounds interaction study // *Journal of Molecular Recognition*. – 2019. – V. 32, N 6. – Article e2776.
87. Holmes T.H. Generalized mathematical model for immunoassay interference // *Autoimmune Reviews*. – 2020. – V. 19, N 11. – Article 102663.
88. Wang L.T., Wang J., Zhang A., Huang X.A., Lei H.T. Two binding epitopes modulating specificity of immunoassay for  $\beta$ -agonist detection: Quantitative structure-activity relationship // *Food Chemistry*. – 2022. – V. 371. – Article 131071.
89. Li J., Macdonald J. Multiplexed lateral flow biosensors: Technological advances for radically improving point-of-care diagnoses // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 83. – P. 177–192.
90. Li Y.F., Sun Y.M., Beier R.C., Lei H.T., Gee S., Hammock B.D., Wang H., Wang Z.H., Sun X.L., Shen Y.D., Yang J.Y., Xu Z.L. Immunochemical techniques for multianalyte analysis of chemical residues in food and the environment: A review // *TRAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 88. – P. 25–40.
91. Lim C.T., Zhang Y. Bead-based microfluidic immunoassays: The next generation // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2007. – V. 22, N 7. – P. 1197–1204.
92. Tighe P.J., Ryder R.R., Todd I., Fairclough L.C. ELISA in the multiplex era: Potentials and pitfalls // *Proteomics Clinical Applications*. – 2015. – V. 9, N 3–4. – P. 406–422.
93. Butvilovskaya V.I., Popletaeva S.B., Chechetkin V.R, Zubtsova Z.I., Tsybul'skaya M., Samokhina L.O., Vinnitskii L.I., Ragimov A.A., Pozharitskaya E.I., Grigor'eva G.A., Meshalkina N.Y., Golysheva S.V., Shilova N.V., Bovin N.V., Zasedatelev A.S., Rubina A.Y. Multiplex determination of serological signatures in the sera of colorectal cancer patients using hydrogel biochips // *Cancer Medicine*. – 2016. – V. 5, N 7. – P. 1361–1372.
94. Graham H., Chandler D.J., Dunbar S.A. The genesis and evolution of bead-based multiplexing // *Methods*. – 2019. – V. 158. – P. 2–11.
95. Chinnasamy T., Segerink L.I., Nystrand M., Gantelius J., Svahn H.A. A lateral flow paper microarray for rapid allergy point of care diagnostics // *Analyst*. – 2014. – V. 139, N 10. – P. 2348–2354.
96. Foubert A., Beloglazova N.V., Gordienko A., Tessier M.D., Drijvers E., Hens Z., De Saeger S. Development of a rainbow lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four mycotoxins // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2017. – V. 65, N 33. – P. 7121–7130.
97. Hofmann E.R., Davidson C., Chen H., Zacharko M., Dorton J.E., Kilper G.K., Graves C., Miklos A.E., Rhea K., Ma J., Goodwin B.G., Sozhamannan S. Blind spot: A Braille patterned novel multiplex lateral flow immunoassay sensor array for the detection of biothreat agents // *ACS Omega*. – 2021. – V. 6, N 35. – P. 22700–22708.

98. Hanafiah K.M., Arifin N., Bustami Y., Noordin R., Garcia M., Anderson D. Development of multiplexed infectious disease lateral flow assays: Challenges and opportunities // *Diagnostics*. – 2017. – V. 7, N. 3. – Article 51.
99. Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Design of multiplex lateral flow tests: A case study for simultaneous detection of three antibiotics // *Biosensors*. – 2020. – V. 10, N 3. – Article 17.
100. Wu Y.F., Tilley R.D., Gooding J.J. Challenges and solutions in developing ultrasensitive biosensors // *Journal of the American Chemical Society*. – 2019. – V. 141, N 3. – P. 1162–1170.
101. Van-Thuan N., Song S., Park S., Joo C. Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2020. – V. 152. – Article 112015.
102. Momenbeitollahi N., Cloet T., Li H.Y. Pushing the detection limits: Strategies towards highly sensitive optical-based protein detection // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2021. – V. 413, N. 24. – P. 5995–6011.
103. Usha S.P., Manoharan H., Deshmukh R., Alvarez-Diduk R., Calucho E., Sai V.V.R., Merkoci A. Attomolar analyte sensing techniques (AttoSens): A review on a decade of progress on chemical and biosensing nanoplatfoms // *Chemical Society Reviews*. – 2021. – V. 50, N 23. – P. 13012–13089.
104. Jackson T.M., Ekins R.P. Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent Eu<sup>3+</sup> chelates as non-radioisotopic tracers // *Journal of Immunological Methods*. – 1986. – V. 87, N 1. – P. 13–20.
105. Taylor J., Picelli G., Harrison D.J. An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays // *Electrophoresis*. – 2001. – V. 22, N 17. – P. 3699–3708.
106. Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays // Chapter 2. In: «Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications» (ed. L. Anfossi). – London: InTechOpen, 2018. – P. 9–43.
107. Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Пределы обнаружения иммуноаналитических систем: Лимитирующие факторы и способы снижения // *Журнал аналитической химии*. – 2022. – Т. 77, № 4. – С. 298–311.
108. Jia Y., Sun. H., Tian J.P., Song Q.M., Zhang W.W. Paper-based point-of-care testing of SARS-CoV-2 // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2021. – V. 9. – Article 773304.
109. Zhou Y.F., Wu Y.H., Ding L., Huang X.L., Xiong Y.H. Point-of-care COVID-19 diagnostics powered by lateral flow assay // *TRAC – Trends in Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 145. – Article 116452.
110. Rosati G., Idili A., Parolo C., Fuentes-Chust C., Calucho E., Hu L.M., Castro e Silva C.C., Rivas L., Nguyen E.P., Bergua J.F., Alvarez-Diduk R., Munoz J., Junot C., Penon O., Monferrer D., Delamarche E., Merkoci A. Nanodiagnosics to face SARS-CoV-2 and future pandemics: From an idea to the market and beyond // *ACS Nano*. – 2021. – V. 15, N 11. – P. 17137–17149.
111. Parolo C., Sena-Torralba A., Bergua J.F., Calucho E., Fuentes-Chust C., Hu L.M., Hu L., Rivas L., Alvarez-Diduk R., Nguyen E.P., Cinti S., Quesada-

- Gonzalez D., Merkoci A. Tutorial: Design and fabrication of nanoparticle-based lateral-flow immunoassays // *Nature Protocols*. – 2020. – V. 15, N 12. – P. 3788–3816.
112. Wang Z.X., Zhao J., Xu X.X., Guo L.L., Xu L.G., Sun M.Z., Hu S.D., Kuang H., Xu C.L., Li A.K. An overview for the nanoparticles-based quantitative lateral flow assay // *Small Methods*. – 2022. – V. 6, N 1. – Article 2101143.

## СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ, В КОТОРЫХ ИЗЛОЖЕНЫ ОСНОВНЫЕ НАУЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ

- C1. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Жердев А.В., Блинцов А.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции вирусов растений // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 225–231. (Английская версия: Byzova N.A., Safenkova I.V., Chirkov S.N., Zherdev A.V., Blintsov A.N., Dzantiev B.B., Atabekov I.G. Development of immunochromatographic test systems for express detection of plant viruses // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2009. – V. 45, N 2. – P. 204–209.)
- C2. Бызова Н.А., Свиридов В.В., Гаврилова Н.Ф., Распопова Е.Н., Яковлева И.В., Генералова А.Н., Лукин Ю.В., Черкасова В.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная системы детекции дифтерийного токсина // Биоорганическая химия. – 2009. – Т. 35, № 4. – С. 533–541. (Английская версия: Byzova N.A., Jerdev A.V., Dzantiev B.B., Sviridov V.V., Gavrilova N.F., Raspopova E.N., Jakovleva I.V., Generalova A.N., Lukin J.V., Cherkasova V.V. Immunochromatographic and latex-agglutination systems for diphtheria toxin detection // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. – 2009. – V. 35, N 4. – P. 482–489.)
- C3. Бызова Н.А., Жердев А.В., Бикетов С.Ф., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической системы для экспресс-детекции клеток *Mycobacterium tuberculosis* // Биотехнология. – 2010, № 3. – С. 70–77.
- C4. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Взаимодействие вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции вируса // Биохимия. – 2010. – Т. 75, № 11. – С. 1583–1595. (Английская версия: Byzova N.A., Safenkova I.V., Chirkov S.N., Avdienko V.G., Guseva A.N., Mitrofanova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Atabekov J.G. Interaction of plum pox virus with specific colloidal gold-labeled antibodies and development of immunochromatographic assay of the virus // Biochemistry (Moscow). – 2010. – V. 75, N 11. – P. 1393–1403.)
- C5. Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Андреев И.В., Санков М.Н., Мартынов А.И., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографический анализ специфического сывороточного IgE человека для диагностики аллергии на пыльцу тимофеевки луговой // Иммунология. – 2010. – Т. 31, № 1. – С. 47–51.
- C6. Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay with photometric detection for rapid determination of the herbicide atrazine and other triazines in foodstuffs // Journal of AOAC International. – 2010. – V. 93, N 1. – P. 36–43.
- C7. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Rapid pretreatment-free immunochromatographic assay of chloramphenicol in milk // Talanta. – 2010. – V. 81, N 3. – P. 838–848.



- C8. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Correlation between the composition of multivalent antibody conjugates with colloidal gold nanoparticles and their affinity // *Journal of Immunological Methods*. – 2010. – V. 357, N 1–2. – P. 17–25.
- C9. Бызова Н.А., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографический метод экспрессного определения ампициллина в молоке и кисло-молочных продуктах // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2011. – Т. 47, № 6. – С. 685–693. (Английская версия: Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic technique for express determination of ampicillin in milk and dairy products // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2011. – V. 47, N 6. – P. 627–634.)
- C10. Урусов А.Е., Костенко С.Н., Свешников П.Г., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Определение охратоксина А иммунохроматографическим методом // *Журнал аналитической химии*. – 2011. – Т. 66, № 8. – С. 884–890. (Английская версия: Urusov A.E., Kostenko S.N., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay for the detection of ochratoxin A // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2011. – V. 66, N 8. – P. 770–776.)
- C11. Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Eremin S.A., Sveshnikov P.G., Dzantiev B.B. Pretreatment-free immunochromatographic assay for the detection of streptomycin and its application to the control of milk and dairy products // *Analytica Chimica Acta*. – 2011. – V. 701, N 2. – P. 209–217.
- C12. Бызова Н.А., Жердев А.В., Ескендинова С.З., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Муканов К.К., Раманкулов Е.М., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для экспрессной детекции липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2012. – Т. 48, № 6. – С. 653–661. (Английская версия: Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Unysheva G.B., Mukanov K.K., Ramankulov E.M. Development of immunochromatographic test system for rapid detection of the lipopolysaccharide antigen and cells of the causative agent of bovine brucellosis // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2012. – V. 48, N 6. – P. 590–597.)
- C13. Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение атомно-силовой микроскопии для характеристики единичных межмолекулярных взаимодействий // *Успехи биологической химии*. – 2012. – Т. 52. – С. 281–314. (Английская версия: Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of atomic force microscopy for characteristics of single intermolecular interactions // *Biochemistry (Moscow)*. – 2012. – V. 77, N 13. – P. 1536–1552.)
- C14. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. v. 403, N 6. – P. 1595–605.
- C15. Бызова Н.А., Лухверчик Л.Н., Жердев А.В., Пивень Н.В., Бураковский А.И., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции эпидермального фактора роста человека // *Прикладная*

- биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 6. – С. 606–612. (Английская версия: Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Likhverchik L.N., Piven N.V., Burakovskii A.I. Development of an immunochromatographic test system for the detection of human epidermal growth factor // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2013. – V. 49, N 6. – P. 606–612.)
- C16. Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Sankov M.N., Andreev I.V., Martynov A.I., Dzantiev B.B. Quantum-dot-based immunochromatographic assay for total IgE in human serum // PLOS One. – 2013. – V. 8, N 10. – Article e77485. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q1)**.
- C17. Berlina A.N., Taranova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Y.Y., Dzantiev B.B. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2013. – v. 405, N 14. – P. 4997-5000. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q1)**.
- C18. Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Antibody-based biosensors // Chapter 6. In: “Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants” (eds. Dimitrios Nikolelis, Theodoros Varsakas, Arzum Erdem, Georgia-Paraskevi Nikoleli). – London – New York, Taylor & Francis,. 2013. – ISBN 9781466576322. – P. 161–196.
- C19. Taranova N.A., Byzova N.A., Zaiko V.V., Starovoitova T.A., Vengerov Yu.Yu., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Integration of lateral flow and microarray technologies for multiplex immunoassay: application to the determination of drugs // Microchimica Acta. – 2013. – V. 180, N 11-12. – P. 1165–1172. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C20. Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V. Immunochromatographic methods in food analysis. Trends in Analytical Chemistry. – 2014. – V. 55. – P. 81–93. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C21. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Pankratova G.K., Varitsev Yu.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid detection of potato ring rot caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2014. – V. 50, N 6. – P. 675–682.
- C22. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Use of gold nanoparticle-labeled secondary antibodies to improve the sensitivity of an immunochromatographic assay for aflatoxin B1 // Microchimica Acta. 2014. – V. 181, N 15–16. – P. 1939–1946. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C23. Бызова Н.А., Жердев А.В., Свешников П.Г., Садыхов Э.Г., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов *Helicobacter pylori*. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 5. – С. 520–530. (Английская версия: Byzova N.A., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Development of an immunochromatographic test system for the detection of *Helicobacter pylori* antigens // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2015. – V. 51, N 5. – P. 608–617.)
- C24. Петракова А.В., Урусов А.Е., Возняк М.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая тест-система для детекции Т-2 токсина. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 6. – С. 616–

623. (Английская версия: Petrakova A.V., Urusov A.E., Voznyak M.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic test system for the detection of T-2 toxin // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2015. – V. 51, N 6. – P. 688–694.)
- C25. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото – антиген // *Биотехнология*. – 2015, № 2. – С. 76–81. (Английская версия: Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Avbienio V.G., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay for serodiagnosis of tuberculosis using an antigen–colloidal gold conjugate // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2015. – V. 51, N 8. – P. 834–839.)
- C26. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса // *Успехи биологической химии*. – 2015. – Т. 55. – С. 391–420. (Английская версия: Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Detection of intermolecular interactions based on surface plasmon resonance registration // *Biochemistry (Moscow)*. – 2015. – V. 80, N 13. – P. 1820–1832.) **(Scopus – Q2)**.
- C27. Lei H., Mu H., Wang B., Xu Z., Tian Y., Shen Y., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Stereospecific recognition and quantitative structure-activity relationship between antibodies and enantiomers: ofloxacin as model hapten // *Analyst*. – 2015. – V. 140, N 4. – P. 1037–1045. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C28. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Eskendirova S.Z., Baltin K.K., Mukanov K.K., Ramankulov E.M., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B. Express immunochromatographic detection of antibodies against *Brucella abortus* in cattle sera based on quantitative photometric registration and modulated cut-off level // *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*. – 2015. – V. 36, N 1. – P. 80–90.
- C29. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development and application of a label-free fluorescence method for determining the composition of gold nanoparticle–protein conjugates // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2015. – V. 16, N 1. – P. 907–923. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C30. Taranova N.A., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. «Traffic light» immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for simultaneous detection of several antibiotics in milk // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2015. – V. 63. – P. 255–261. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C31. Taranova N.A., Kruglik A.S., Zvereva E.A., Shmanai V.V., Vashkevich I.I., Semyonov D.A., Eremin S.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Highly sensitive immunochromatographic identification of tetracycline antibiotics in milk // *International Journal of Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 2015. – Article 347621.
- C32. Urusov A.E., Petrakova A.V., Kuzmin P.G., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Shafeev G.A., Dzantiev B.B. Application of gold nanoparticles produced by

- laser ablation for immunochromatographic assay labeling // *Analytical Biochemistry*. – 2015. – V. 491. – P. 65–71. (**Web of Science – Q2**).
- C33. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Cut-off on demand: Adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol // *Analytical Methods*. – 2015. – V. 7, N 15. – P. 6378–6384. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q2**).
- C34. Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Drenova N.V., Kornev K.P., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of the sensitive lateral flow immunoassay with silver enhancement for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers // *Talanta*. – 2016. – V. 152. – P. 521–530. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C35. Safenkova I.V., Pankratova G.K., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Vengerov Yu.Yu., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Multiarray on a test strip (MATS): Rapid multiplex immunodetection of priority potato pathogens // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2016. – V. 408, N 22. – P. 6009–6017. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C36. Safenkova I.V., Slutskaia E.S., Panferov V.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Complex analysis of concentrated antibody – gold nanoparticle conjugates' mixtures using asymmetric flow field-flow fractionation // *Journal of Chromatography A*. – 2016. – V. 1477. – P. 56–63. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C37. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. «Multistage in one touch» design with a universal labelling conjugate for high-sensitive lateral flow immunoassays // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. – V. 86. – P. 575–579. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C38. Петракова А.В., Урусов А.Е., Жердев А.В., Лью Л., Ксю Ч., Дзантиев Б.Б. Применение наночастиц магнетита для разработки высокочувствительных иммунохроматографических тест-систем для определения микотоксинов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2017. – Т. 53, № 4. – С. 420–426. (Английская версия: Petrakova A.V., Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Liu L., Xu C. Application of magnetite nanoparticles for the development of highly sensitive immunochromatographic test systems for mycotoxin detection // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2017. – V. 53, N 4. – P. 470–475.)
- C39. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Математическое моделирование биоаналитических систем // *Успехи биологической химии*. – 2017. – Т. 57. – С. 385–438. (Английская версия: Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical modeling of bioassays // *Biochemistry (Moscow)*. – 2017. – V. 82, N 13. – P. 1744–1766.) (**Scopus – Q2**).
- C40. Урусов А.Е., Петракова А.В., Бартош А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографический анализ Т-2 токсина с использованием меченых антивидовых антител // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2017. – Т. 53, № 5. – С. 528–533. (Английская версия: Urusov A.E., Petrakova A.V., Bartosh A.V., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic assay of T-2 toxin using labeled anti-

- species antibodies // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – V. 53, N 5. – P. 594–599.)
- C41. Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных наночастиц в иммуноанализе // Российские нанотехнологии. – 2017. – Т. 12, № 9–10. – С. 3–13. (Английская версия: Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Application of magnetic nanoparticles in immunoassay // Nanotechnologies in Russia. – 2017. – V. 12, N 9–10. – P. 471–479.)
- C42. Berlina A.N., Zherdev A.V., Xu C., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Development of lateral flow immunoassay for rapid control and quantification of the presence of the colorant Sudan I in spices and seafood // Food Control. – 2017. – V. 73, part B. – P. 247–253. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C43. Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutsкая E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Less is more: Comparison of antibodies – gold nanoparticle conjugates of different ratio // Bioconjugate Chemistry. – 2017. – V. 28, N 11. – P. 2737–2746. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C44. Byzova N.A., Zherdev A.V., Vengerov Yu.Yu., Starovoitova T.A., Dzantiev B.B. A triple immunochromatographic test for simultaneous determination of cardiac troponin I, fatty acid binding protein, and C-reactive protein biomarkers // Microchimica Acta. – 2017. – V. 184, N 2. – P. 463–471. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C45. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Setting up the cut-off level of a sensitive barcode lateral flow assay with magnetic nanoparticles // Talanta. – 2017. – V. 164. – P. 69–76. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C46. Petrakova A.V., Urusov A.E., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. «External» antibodies as the simplest tool for sensitive immunochromatographic tests // Talanta. – 2017. – V. 175. – P. 77–81. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C47. Safenkova I.V., Zaitsev I.A., Varitsev Yu.A., Byzova N.A., Drenova N.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of lateral flow immunoassay for rapid diagnosis of potato blackleg caused by *Dickeya* species // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2017. – V. 409, N 7. – P. 1915–1927. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C48. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay // Analytical Chemistry. – 2017. – V. 89, N 8. – P. 4419–4427. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C49. Taranova N.A., Urusov A.E., Sadykhov E.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Bifunctional gold nanoparticles as an agglomeration-enhancing tool for highly sensitive lateral flow tests: a case study with procalcitonin // Microchimica Acta. – 2017. – V. 184, N 10. – P. 4189–4195. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C50. Urusov A.E., Petrakova A.V., Gubaydullina M.K., Zherdev A.V., Eremin S.A., Kong D., Liu L., Xu C., Dzantiev B.B. High-sensitivity immunochromatographic assay for fumonisin B1 based on indirect antibody labelling // Biotechnology Letters. – 2017. – V. 39, N 5. – P. 751–758. (**Scopus – Q2**).

- C51. Берлина А.Н., Бартош А.В., Сотников Д.В., Жердев А.В., Ху Ч., Дзантиев Б.Б. Комплексы золотых наночастиц с антителами в иммунохроматографии: Сравнение прямой и непрямой иммобилизации антител при детекции антибиотиков // Российские нанотехнологии. – 2018. – V. 13, № 7–8. – С. 80–87. (Английская версия: Berlina A.N., Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Complexes of gold nanoparticles with antibodies in immunochromatography: Comparison of direct and indirect immobilization of antibodies for the detection of antibiotics // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – V. 13, N 7–8. – P. 430–438.)
- C52. Губайдуллина М.К., Урусов А.Е., Жердев А.В., Ху Ч., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы с использованием конъюгата антивидовые антитела – коллоидное золото: Особенности и возможности на примере определения охратоксина А // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2018. – Т. 59, № 2. – С. 144–150. (Английская версия: Gubaidullina M.K., Urusov A.E., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Immunochromatographic test systems using the conjugate anti-species antibodies – colloid gold: Features and benefits on the example of determination of ochratoxin A // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2018. – V. 73, N 2. – P. 62–67.)
- C53. Зверева Е.А., Шпакова Н.А., Жердев А.В., Ху Ч., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографический метод высокочувствительного определения бета-агониста рактопamina в пищевых продуктах // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 421–426. (Английская версия: Zvereva E.A., Shpakova N.A., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Highly sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta-agonist ractopamine in foods // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2018. – V. 54, N 4. – P. 436–441.)
- C54. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Самохвалов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Изучение роста нативных и модифицированных белками наночастиц золота и их конъюгатов в присутствии гидроксилamina и тетрахлоораурата // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13, № 11-12. – С. 59–67. (Английская версия: Panferov V.G., Samokhvalov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Study of growth of bare and protein-modified gold nanoparticles in the presence of hydroxylamine and tetrachloroaurate // Nanotechnologies in Russia. – 2018. – V. 13, N 11-12. – P. 614–622.)
- C55. Berlina A.N., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Development of lateral flow immunoassay for determination of tetracycline in human serum // Antibiotics. – 2018. – V. 7, N 4. – Article 99. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C56. Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Multiplex highly sensitive immunochromatographic assay based on the use of non-processed antisera // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2018. – V. 410, N 7. – P. 1903–1910. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C57. Byzova N.A., Vinogradova S.V., Porotikova E.V., Terechova Y.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid detection of grapevine leafroll associated virus // Biosensors. – 2018. – V. 8, N 4. – Article 111. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q2**).

- C58. Mu H., Xu Z., Liu Y., Sun Y., Wang B., Sun X., Wang Z., Eremin S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Lei H. Probing the molecular interaction of ofloxacin enantiomers with corresponding monoclonal antibodies by multiple spectrometry // *Spectrochimica Acta A Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2018. – V. 194. – P. 83–91. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q2**).
- C59. Panferov V.G., Safenkova I.V., Byzova N.A, Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Silver-enhanced lateral flow immunoassay for highly-sensitive detection of potato leafroll virus // *Food and Agricultural Immunology*. – 2018. – V. 29, N 1. – P. 445–457. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q2**).
- C60. Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Enhancement of lateral flow immunoassay by alkaline phosphatase: a simple and highly sensitive test for potato virus X // *Microchimica Acta*. – 2018. – V. 185, N 1. – Article 25. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C61. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Post-assay growth of gold nanoparticles as a tool for highly sensitive lateral flow immunoassay. Application to the detection of potato virus X // *Microchimica Acta*. – 2018. – V. 185, N 11. – Article 506. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C62. Razo S.C., Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles // *Analytica Chimica Acta*. – 2018. – V. 1007. – P. 50–60. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C63. Razo S.C., Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. How to improve sensitivity of sandwich lateral flow immunoassay for corpuscular antigens on the example of potato virus Y? // *Sensors*. – 2018. – V. 18, N 11. – Article 3975. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C64. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Theoretical and experimental comparison of different formats of immunochromatographic serodiagnostics // *Sensors*. – 2018. – V. 18, N 1. – Article 36. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C65. Urusov A.E., Gubaydullina M.K., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. A new kind of highly sensitive competitive lateral flow assay displaying direct analyte-signal dependence. Application to the determination of the mycotoxin deoxynivalenol // *Microchimica Acta*. – 2018. – V. 185, N 1. – Article 29. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C66. Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays // Chapter 2. In: «Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications» (ed. Laura Anfossi). – London: InTechOpen, 2018. – ISBN 978-1-78923-902-7. – P. 9-43.
- C67. Zherdev A.V., Vinogradova S.V., Byzova N.A., Porotikova E.V., Kamionskaya A.M., Dzantiev B.B. Methods for diagnosis of grapevine viral infections // *Agriculture*. – 2018. – V. 8, N 12. – Article 195. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q2**).

- C68. Zvereva E.A., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Highly sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta-agonist salbutamol and its structural analogs in foods // *Food Control*. – 2018. – V. 86. – P. 50–58. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C69. Бызова Н.А., Жердев А.В., Придворова С.М., Дзантиев Б.Б. Разработка экспрессной иммунохроматографической тест-системы для детекции D-димера // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2019. – Т. 55, № 3. – С. 293–302. (Английская версия: Byzova N.A., Zherdev A.V., Pridvorova S.M., Dzantiev B.B. Development of rapid immunochromatographic test system for D-dimer detection // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2019. – V. 55, N 3. – P. 305–312.)
- C70. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Khassenov B.B., Baltin K.K., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantaev K.K., Dzantiev B.B. Triple immunochromatographic system for simultaneous serodiagnosis of bovine brucellosis, tuberculosis, and leukemia // *Biosensors*. – 2019. – V. 9, N 4. – Article 115. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q2**).
- C71. Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. ELISA and lateral flow immunoassay for the detection of food colourants: State of the art // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2019. – V. 49, N 3. – P. 209–223. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q2**).
- C72. Buglak A.A., Zherdev A.V., Lei H.T., Dzantiev B.B. QSAR analysis of immune recognition for triazine herbicides based on immunoassay data for polyclonal and monoclonal antibodies // *PLOS One*. – 2019. – V. 14, N 4. – Article e0214879. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C73. Byzova N.A., Vengerov Yu.Yu., Voloshchuk S.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of a lateral flow highway: Ultra-rapid multitasking immunosensor for cardiac markers // *Sensors*. – 2019. – V. 19, N 24. – Article 4594. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C74. Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Simultaneous immunochromatographic assay of several antibiotics: Modulation of detection limits and working ranges // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2019. – V. 35, N 6. – P. 1634–1639.
- C75. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Recombinase polymerase amplification combined with a magnetic nanoparticle-based immunoassay for fluorometric determination of troponin T // *Microchimica Acta*. 2019. – V. 186, N 8. – Article 549. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C76. Petrakova A.V., Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Gold nanoparticles of different shape for bicolor lateral flow test // *Analytical Biochemistry*. – 2019. – V. 568. – P. 7–13. (**Web of Science – Q2**).
- C77. Razo S.C., Panferova N.A., Panferov V.G., Safenkova I.V., Drenova N.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. Enlargement of gold nanoparticles for sensitive immunochromatographic diagnostics of potato brown rot // *Sensors*. – 2019. – V. 19, N 1. – Article 153. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).



- C78. Safenkova I.V., Panferova N.A., Panferov V.G., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Alarm lateral flow immunoassay for detection of the total infection caused by the five viruses // *Talanta*. – 2019. – V. 195. – P. 739–744. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C79. Sobolev A.M., Byzova N.A., Goryacheva I.Yu., Zherdev A.V. Silanized quantum dots as labels in lateral flow test strips for C-reactive protein. // *Analytical Letters*. – 2019. – V. 51, N 12. – P. 1874–1887.
- C80. Sotnikov D.V., Berlina A.N., Ivanov V.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Adsorption of proteins on gold nanoparticles: One or more layers? // *Colloids and Surfaces B*. – 2019. – V. 173. – P. 557–563. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C81. Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Towards lateral flow quantitative assays: Detection approaches // *Biosensors*. – 2019. – V. 9, N 3. – Article 89. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C82. Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Design of multiplex lateral flow tests: A case study for simultaneous detection of three antibiotics // *Biosensors*. – 2020. – V. 10, N 3. – Article 17. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C83. Bartosh A.V., Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Kuang H., Dzantiev B.B. Highly sensitive zearalenone lateral flow test with indirect labeling in baby food // *Food and Agricultural Immunology*. – 2020. – V. 31, N 1. – P. 653–666. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C84. Byzova N.A., Serchenya T.S., Vashkevich I.I., Zherdev A.V., Sviridov O.V., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay for rapid qualitative and quantitative control of veterinary drug bacitracin in milk // *Microchemical Journal*. – 2020. – V. 156. – Article 104884. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C85. Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Khlebtsov N.G., Dzantiev B.B. Advantages of highly spherical gold nanoparticles as labels for lateral flow immunoassay // *Sensors*. – 2020. – V. 20, N 12. – Article 3608. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C86. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Popravko D.S., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. An immunochromatographic test system for the determination of antibiotic lincomycin in foodstuffs of animal origin // *Journal of Chromatography B*. – 2020. – V. 1141. – Article 122014. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C87. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B. Development of the double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs // *Food Chemistry*. – 2020. – V. 318. – Article 126510. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C88. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Nucleic acid lateral flow assay with recombinase polymerase amplification: solutions for high-sensitive detection of RNA virus // *Talanta*. – 2020. – V. 210. – Article 120616. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C89. Ivanov A.V., Shmyglya I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Safenkova I.V. The challenge for rapid detection of high-structured circular RNA: Assay of potato

- spindle tuber viroid based on recombinase polymerase amplification and lateral flow tests // *Plants*. – 2020. – V. 9, N 10. – Article 1369. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C90. Komova N.S., Berlina A.N., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immune recognition of closed and open lactam ring and its influence on immunoassays of ampicillin antibiotics // *Oriental Journal of Chemistry*. – 2020. – V. 36, N 1. – P. 21–25.
- C91. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Urchin peroxidase-mimicking Au@Pt nanoparticles as a label in lateral flow immunoassay: impact of nanoparticle composition on detection limit of *Clavibacter michiganensis* // *Microchimica Acta*. – 2020. – V. 187. – Article 268. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C92. Safenkova I.V., Ivanov A.V., Slutskaya E.S., Samokhvalov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Key significance of DNA-target size in lateral flow assay coupled with recombinase polymerase amplification // *Analytica Chimica Acta*. – 2020. – V. 1102. – P. 109–118. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C93. Serebrennikova K.V., Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Popravko D.S., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. A comparative study of approaches to improve the sensitivity of lateral flow immunoassay of antibiotic lincomycin // *Biosensors*. – 2020. – V. 10, N 12. – Article 198. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C94. Sotnikov D.V., Barshevskaya L.V., Zherdev A.V., Khassenov B.B., Baltin K.K., Eskendirova S.Z., Mukanov K.K., Mukantaev K.K., Dzantiev B.B. Immunochromatographic system for serodiagnostics of cattle brucellosis using gold nanoparticles and signal amplification with quantum dots // *Applied Sciences*. – 2020. – V. 10, N 3. – Article 738. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C95. Sotnikov D.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Avdienko V.G., Kozlova I.V., Babayan S.S., Gergert V.Y., Dzantiev B.B. A mechanism of gold nanoparticle aggregation by immunoglobulin G preparation // *Applied Sciences*. – 2020. – V. 10, N 2. – Article 475. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C96. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Byzova N.A., Zvereva E.A., Bartosh A.V., Dzantiev B.B. Mathematical modeling of the immunochromatographic test-systems in competitive format: Analytical and numerical approaches // *Biochemical Engineering Journal*. – 2020. – V. 164. – Article 107763. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C97. Zvereva E.A., Byzova N.A., Hendrickson O.D., Popravko D.S., Belichenko K.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Immunochromatographic detection of myoglobin as a specific biomarker of porcine muscle tissues in meat products // *Applied Sciences*. – 2020. – V. 10, N 21. – Article 7437. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C98. Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic tests for the detection of microcystin-LR toxin in water and fish samples // *Analytical Methods*. – 2020. – V. 12, N 3. – P. 392–400. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.

- C99. Zvereva E.A., Popravko D.S., Hendrickson O.D., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Lateral flow immunoassay to detect the addition of beef, pork, lamb, and horse muscles in raw meat mixtures and finished meat products // *Foods*. – 2020. – V. 9, N 11. – Article 1662. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C100. Зверева Е.А., Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы для детекции микроцистина-LR в морепродуктах // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 303–310. (Английская версия: Zvereva E.A., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Immunochromatographic test systems for detection of microcystin-LR in seafood // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2021. – V. 57, N 3. – P. 403–409.)
- C101. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы улучшения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 107–116. (Английская версия: Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Methods for increasing sensitivity of immunochromatographic test systems with colorimetric detection (review) // *Applied Biochemistry and Microbiology*. – 2021. – V. 57, N 2. – P. 143–151.)
- C102. Berlina A.N., Komova N.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Combination of phenylboronic acid and oligocytosine for selective and specific detection of lead(ii) by lateral flow test strip // *Analytica Chimica Acta*. – 2021. – V. 1155. – Article 338318. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C103. Hendrickson O.D., Byzova N.A., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Sensitive lateral flow immunoassay of an antibiotic neomycin in foodstuffs // *Journal of Food Science and Technology – Mysore*. – 2021. – V. 58, N 1. – P. 292–301. (**Scopus – Q2**).
- C104. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Sensitive lateral flow immunoassay for detection of pork additives in raw and cooked meat products // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 359. – Article 129927. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C105. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Vostrikova N.L., Chernukha I.M., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Lateral flow immunoassay for sensitive detection of undeclared chicken meat in meat products // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 344. – Article 128598. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C106. Ivanov A.V., Popravko D.S., Safenkova I.V., Zvereva E.A., Dzantiev B.B., Zherdev A.V. Rapid full-cycle technique to control adulteration of meat products: Integration of accelerated sample preparation, recombinase polymerase amplification, and test-strip detection // *Molecules*. – 2021. – V. 26, N 22. – Article 6804. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C107. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Multiplex assay of viruses integrating recombinase polymerase amplification, barcode / anti-barcode pairs, blocking anti-primers, and lateral flow assay // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93, N 40. – P. 13641–13650. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).

- C108. Ivanov A.V., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Recombinase polymerase amplification assay with and without nuclease-dependent-labeled oligonucleotide probe // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22, N 21. – Article 11885. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C109. Panferov V.G., Byzova N.A., Biketov S.F., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Comparative study of in situ techniques to enlarge gold nanoparticles for highly sensitive lateral flow immunoassay of SARS-CoV-2 // Biosensors. – 2021. – V. 11, N 7. – Article 229. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C110. Panferov V.G., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Peroxidase-mimicking nanozyme with surface-dispersed Pt atoms for the colorimetric lateral flow immunoassay of C-reactive protein // Microchimica Acta. – 2021. – V. 188. – Article 309. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C111. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The steadfast Au@Pt soldier: Peroxide-tolerant nanozyme for signal enhancement in lateral flow immunoassay of peroxidase-containing samples // Talanta. – 2021. – V. 235. – Article 121961. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C112. Razo S.C., Elovenkova A.I., Safenkova I.V., Drenova N.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Comparative study of four colored nanoparticle labels in lateral flow immunoassay // Nanomaterials. – 2021. – V. 11, N 12. – Article 3277. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C113. Razo S.C., Safenkova I.V., Drenova N.V., Kharchenko A.A., Tsybmal Y.S., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Pakina E.N., Dzantiev B.B. New lateral flow immunoassay for on-site detection of *Erwinia amylovora* and its application on various organs of infected plants // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2021. – V. 114. – Article 101637. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.
- C114. Serebrennikova K.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Biketov S.F., Dzantiev B.B. Lateral flow immunoassay of SARS-CoV-2 antigen with SERS-based registration: Development and comparison with traditional immunoassays // Biosensors. – 2021. – V. 11, N 12. – Article 510. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q2)**.
- C115. Sotnikov D.V., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Retention of activity by antibodies immobilized on gold nanoparticles of different sizes: Fluorometric method of determination and comparative evaluation // Nanomaterials. – 2021. – V. 11, N 11. – Article 3117. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C116. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Lateral flow serodiagnosis in the double-antigen sandwich format: Theoretical consideration and confirmation of advantages // Sensors. – 2021. – V. 21, N 1. – Article 39. **(Web of Science – Q1; Scopus – Q1)**.
- C117. Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Zvereva E.A., Eremin S.A., Dzantiev B.B. Changing cross-reactivity for different immunoassays using the same antibodies: Theoretical description and experimental confirmation // Applied Sciences. – 2021. – V. 11, N 14. – Article 6581. **(Web of Science – Q2; Scopus – Q2)**.

- C118. Taranova N.A., Byzova N.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Comparative assessment of different gold nanoflowers as labels for lateral flow immunosensors // *Sensors*. – 2021. – V. 21, N 21. – Article 7098. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).
- C119. Taranova N.A., Slobodenuyk V.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Network of gold conjugates for enhanced sensitive immunochromatographic assays of troponins // *RSC Advances*. – 2021. – V. 11, N 27. – P. 16445–16452. (**Web of Science – Q2; Scopus – Q1**).
- C120. Wang J., Shen X., Zhong P., Li Z., Tang Q., Huang X., Zherdev A.V., Dzantiev B.B., Eremin S.A., Xiao Z., Lei H., Li X. Heterologous immunoassay strategy for enhancing detection sensitivity of banned dye rhodamine B in fraudulent food // *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*. – 2021. – V. 8. – Article 17. (**Web of Science – Q1; Scopus – Q1**).

**СПИСОК ПАТЕНТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ  
ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

- П1. Жердев А.В., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Дзантиев Б.Б. Способ определения антител к возбудителю туберкулеза // Патент РФ на изобретение № 2395092 от 17 сентября 2008 г.
- П2. Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Зверева Е.А. Жердев А.В., Еремин С.А., Грачев О.В., Горбовский А.Д., Свешников П.Г. Способ иммунохроматографического определения антибиотиков в молоке и молочных продуктах // Патент РФ на изобретение № 2406090 от 18 февраля 2009 г.
- П3. Ескендинова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Балтин К.К., Жердев А.В., Раманкулов Е.М., Муканов К.К., Булашев А.К., Шенжанов К.Т., Унышева Г.Б. Экспресс-способ серологической диагностики бруцеллеза крупного рогатого скота на основе иммунохроматографического анализа // Инновационный патент Республики Казахстан на изобретение № 25460 от 23 декабря 2010 г.
- П4. Ескендинова С.З., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Сотников Д.В., Жердев А.В., Балтин К.К., Унышева Г.Б., Булашев А.К., Муканов К.К., Раманкулов Е.М. Способ экспресс-обнаружения и идентификации *Brucella abortus* в биологическом материале на основе иммунохроматографического анализа // Инновационный патент Республики Казахстан на изобретение № 25922 от 23 августа 2011 г.
- П5. Урусов А.Е., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ снижения предела обнаружения иммунохроматографических методов контроля содержания низкомолекулярных соединений // Патент РФ на изобретение № 2497126 от 30 декабря 2011 г.
- П6. Жердев А.В., Урусов А.Е., Дзантиев Б.Б. Способ повышения диагностической эффективности иммунохроматографических систем определения патогенов // Патент РФ на изобретение № 2557936 от 25 декабря 2012 г.
- П7. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Тест-полоска для высокочувствительного иммунохроматографического анализа // Патент РФ на изобретение № 2523393 от 19 марта 2013 г.
- П8. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Метод получения межмолекулярных конъюгатов для иммунохроматографического определения специфических антител // Патент РФ на изобретение № 2530560 от 28 июня 2012 г.
- П9. Сотников Д.В., Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа для серодиагностики // Патент РФ на изобретение № 2532352 от 28 июня 2012 г.
- П10. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа с диссоциирующей флуоресцентной меткой // Патент РФ на изобретение № 2535061 от 26 июля 2012 г.

- П11. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ иммунохроматографического определения специфических антител // Патент РФ на изобретение № 2545909 от 19 марта 2013 г.
- П12. Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа, основанный на обратимой иммобилизации иммунореагентов в магнитном поле // Патент РФ на изобретение № 2575840 от 31 октября 2013 г.
- П13. Розиев Р.А., Соколов В.А., Орешкина И.В., Гончарова А.Я., Касмынина Ю.С., Дзантиев Б.Б., Бызова Н.А., Жердев А.В. Иммунохроматографическая тест-система // Патент РФ на полезную модель № 158294 от 11 ноября 2014 г.
- П14. Урусов А.Е., Таранова Н.А., Семейкина А.А., Петракова А.В., Губайдуллина М.К., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ проведения иммунохроматографического анализа с высокой степенью выявления маркера // Патент РФ на изобретение № 2623075 от 30 декабря 2015 г.
- П15. Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для иммунохроматографической экспрессной внелабораторной диагностики заболевания винограда, вызываемого вирусом скручивания листьев // Патент РФ на полезную модель № 192778 от 1 октября 2019 г.
- П16. Бызова Н.А., Таранова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной детекции токсичных контаминантов – поверхностно активных веществ нонилфенола и бисфенола А в питьевых, бытовых, природных и сточных водах // Патент РФ на полезную модель № 196383 от 27 февраля 2020 г.
- П17. Бызова Н.А., Таранова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для иммунохроматографической одновременной индивидуальной детекции фторхинолоновых антибиотиков офлоксацина, энрофлоксацина и ципрофлоксацина в продуктах питания // Патент РФ на полезную модель № 196919 от 20 марта 2020 г.
- П18. Урусов А.Е., Шпакова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Карта сравнения для количественной интерпретации результатов иммунохроматографических тестов // Патент РФ на полезную модель № 200112 от 7 октября 2020 г.
- П19. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для мультиплексного иммунохроматографического анализа патогенов вирусной и бактериальной природы с дополнительной стадией усиления сигнала // Патент РФ на полезную модель № 201487 от 17 декабря 2020 г.
- П20. Сотников Д.В., Баршевская Л.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ повышения чувствительности иммунохроматографического серодиагностического анализа с использованием двух маркеров // Патент РФ на изобретение № 2739752 от 28 декабря 2020 г.
- П21. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ иммунохроматографической серодиагностики с последовательным

добавлением реагентов // Патент РФ на изобретение № 2741199 от 22 января 2021 г.

- П22. Бызова Н.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для иммунохроматографической экспрессной лабораторной и внелабораторной одновременной индивидуальной детекции токсичных контаминантов в воде // Патент РФ на полезную модель № 202181 от 5 февраля 2021 г.
- П23. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Устройство для иммунохроматографической высокочувствительной и внелабораторной детекции фитопатогенной бактерии *Clavibacter michiganensis*, основанное на повышении интенсивности регистрируемого колориметрического сигнала за счет каталитических свойств наномаркера // Патент РФ на полезную модель № 202193 от 5 февраля 2021 г.
- П24. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ высокочувствительного иммунохроматографического анализа с двойной конкуренцией // Патент РФ на изобретение № 2748901 от 1 июня 2021 г.
- П25. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способ иммунохроматографического анализа для серодиагностики с комбинированной схемой связывания антител // Патент РФ на изобретение № 2753237 от 12 августа 2021 г.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность своему научному консультанту Б.Б. Дзантиеву за огромную помощь в работе, рекомендации по организации исследований и интерпретации результатов. Искренне благодарен коллегам – нынешним и бывшим сотрудникам, аспирантам и студентам лаборатории иммунобиохимии – за их вклад в разработку иммунохроматографических систем для обнаружения различных соединений: Бартош А.В., Баршевской Л.В., Беличенко К.А., Берлиной А.Н., Бызовой Н.А., Венгерову Ю.Ю., Гендриксон О.Д., Губайдуллиной М.К., Еловенковой А.И., Зайко В.В., Зверевой Е.А., Иванову А.В., Иванову В.С., Комовой Н.С., Костенко С.Н., Панфёрову В.Г., Панфёровой Н.А., Петраковой А.В., Поправко Д.С., Придворовой С.М., Разо Ш., Самохвалову А.В., Сафенковой И.В., Семейкиной А.А., Серебренниковой К.В., Слободенюку В.Д., Смирновой Н.И., Сотникову Д.В., Тарановой Н.А., Урусову А.Е., Шпаковой Н.А. Неоценимую пользу работе принесло взаимодействие с коллективами других лабораторий нашего института и центра, российских и зарубежных партнеров. Благодарю всех соавторов работ, подготовленных и опубликованных в рамках диссертационного исследования.