

УДК 57.083.3

СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ТЕСТ-СИСТЕМ С КОЛОРИМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ (ОБЗОР)

© 2021 г. В. Г. Панфёров¹, И. В. Сафенкова¹, А. В. Жердев¹, Б. Б. Дзантиев¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 10.09.2020 г.

После доработки 20.10.2020 г.

Принята к публикации 02.11.2020 г.

Методы иммунохроматографического анализа (ИХА), активно используемые в последние годы в медицинской диагностике и контроле качества и безопасности потребительской продукции вследствие быстрого и методически простого тестирования, обычно уступают по чувствительности другим аналитическим методам. В обзоре рассмотрены современные методические решения по обеспечению высокочувствительного ИХА, основанного на использовании наночастиц-маркеров и колориметрической детекции. Охарактеризованы основные направления таких разработок для снижения предела обнаружения: усиление детектируемого сигнала, который генерируется одной наночастицей, и формирование в ходе анализа иммунных комплексов, меченных агрегатами из большого числа наночастиц. Рассматриваются преимущества и ограничения разных подходов. Показано, что их применение обеспечивает снижение предела детекции при иммунохроматографическом анализе на 1–3 порядка, что делает данный метод конкурентоспособным по сравнению с инструментальными методами анализа.

Ключевые слова: иммунохроматография, функционализированные наночастицы, амплификация сигнала, предел обнаружения

DOI: 10.31857/S0555109921020112

Иммунохроматографический анализ (ИХА) совмещает высокоспецифичное взаимодействие антиген – антитело и аффинное отделение образующихся иммунных комплексов при движении жидкости вдоль пористых мембран [1]. Для реализации ИХА используют тест-полоски, представляющие собой мультимембранный композит с перекрывающимися мембранами и нанесенными на них реагентами, вдоль которого за счет капиллярных сил мигрирует жидкая проба. Это движение обеспечивает реализацию аналитических реакций и формирование зон с мечеными иммунными комплексами, связывание в которых оценивается по оптическому или иному сигналу метки и отражает содержание аналита в пробе. Благодаря простоте проведения анализа, подготовки проб, интерпретации результатов и возможности внелабораторного использования ИХА активно используется в различных областях – медицине, ветеринарии, контроле качества и безопасности пищевых продуктов, а также в сельском хозяйстве [1, 2]. Несмотря на все достоинства ИХА, высокие значения предела обнаружения

(ПрО) часто не позволяют выявлять низкие концентрации целевых аналитов в соответствии с практическими требованиями, что ограничивает применение этого метода [3].

В последние годы предложен ряд подходов к снижению ПрО ИХА [4–7]. Однако важно, чтобы достижение этой цели не сопровождалось существенным усложнением анализа и его сопряжением со сложным и дорогим приборным обеспечением. С учетом этого в настоящем обзоре рассмотрены и сравнительно охарактеризованы тест-системы для проведения ИХА, реализующие наиболее простую регистрацию окрашивания на тест-полоске. Если достаточен качественный результат анализа, регистрация проводится невооруженным глазом по наличию/отсутствию окрашенной зоны. При необходимости количественных результатов применяются портативные оптические детекторы, камеры и смартфоны, позволяющие определять интенсивность оптического сигнала. Использование этих недорогих и массово производимых детекторов сохраняет простоту тестирования и не лимитирует массовое применение ИХА [8].

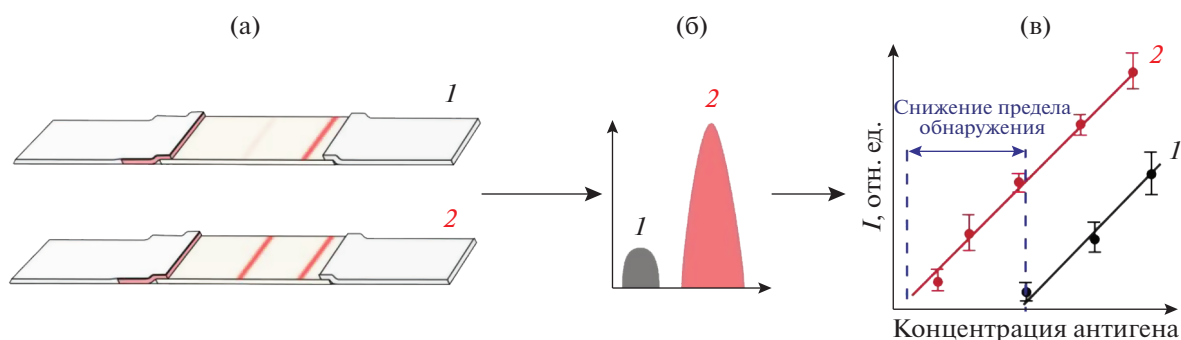


Рис. 1. Снижение предела обнаружения в “сэндвич”-формате ИХА за счет увеличения интенсивности колориметрического сигнала в тестовой зоне: а – внешний вид тест-полосок до (1) и после усиления колориметрического сигнала (2); б – увеличение сигнала в тестовой зоне; в – зависимость интенсивности колориметрического сигнала (I , отн. ед.) от концентрации антигена до (1) и после усиления (2).

В данном обзоре систематизированы подходы к снижению ПрО ИХА с колориметрической детекцией на основании факторов, влияющих на интенсивность регистрируемого сигнала.

Подходы к снижению предела обнаружения ИХА. Эффективное взаимодействие в ИХА обеспечивается корректным выбором соотношения реагентов, мембранной комплектации тест-систем, дополнительными обработками мембран и режимом иммобилизации реагентов на мембранах или наночастицах-маркерах. Все эти факторы важны для высокочувствительного анализа, но обычно они корректно подбираются в рамках стандартных процедур мультипараметрической оптимизации [9].

Однако возможности таких оптимизаций часто недостаточны для достижения низкого ПрО, и требуются более радикальные решения по изменению схемы образования детектируемых меченных комплексов. Большой оптический сигнал, приходящийся на единичное связывание антиген-антитело на мембране тест-полоски, позволяет достигнуть визуально наблюдаемого окрашивания зоны при более низких концентрациях анализата, то есть снизить ПрО (рис. 1).

Предложенные способы увеличения интенсивности колориметрического сигнала в ИХА могут быть разделены на две группы, основанные на:

- изменении физико-химических свойств (состава, размера, формы, коэффициента молярной экстинкции и др.) наночастиц-маркеров;
- увеличении количества метки в зоне регистрации.

Для того, чтобы оценка возможностей разных способов снижения ПрО была достоверной, необходимо применить их к нескольким системам ИХА и определить, во сколько раз снизятся ПрО по сравнению с традиционной методикой проведения анализа. К сожалению, сопоставления с такими наиболее широко используемыми в ИХА маркерами, как сферические наночастицы золота

(НЧЗ) диаметром от 30 до 40 нм, обычно осуществляются для единственного анализата и далеко не во всех публикациях. В результате достижение такого же выигрыша в ПрО при проведении ИХА с другими иммунореагентами не гарантируется. Поэтому далее не будут приводиться конкретные значения ПрО, а результаты сравнения новых разработок с традиционным ИХА будут суммированы в конце обзора.

Влияние физико-химических свойств маркера. Хотя в коммерчески доступных иммунохроматографических тест-системах разнообразие маркеров ограничивается НЧЗ и окрашенными латексными частицами [7], в литературе описано применение в ИХА многих наночастиц-маркеров [10]. Среди них наиболее широко используются НЧЗ различной формы и размера, латексные, углеродные и магнитные наночастицы, квантовые точки и антистоксовые люминофоры. Преимущества предлагаемых альтернатив во многих случаях связаны со снижением ПрО не только для флуоресцентных или магнитных маркеров, требующих дополнительного приборного обеспечения [11], но и для колориметрии, например, при использовании углеродных наночастиц. Оценка возможностей новых наночастиц-маркеров требует учета их физико-химических свойств. В работе [9] предложено рассматривать “паспорта” кандидатных наночастиц, чтобы на основании оценки их оптических, сорбционных и других характеристик можно было сделать априорные выводы о перспективах их применения в ИХА. Однако данный обзор будет ограничен рассмотрением воздействий на наночастицы-маркеры, приводящих к изменению ПрО, а последствия замены одних наночастиц на другие обсуждаться не будут.

Наночастицы золота. Благодаря простым протоколам синтеза и получения комплексов с биомолекулами, а также уникальным оптическим свойствам НЧЗ являются самым распространенным маркером, как в коммерческих тест-системах

мах, так и в научных разработках [12–15]. Основные параметры НЧЗ, определяющие эффективность колориметрической детекции, – их размер и форма [16, 17]. Увеличение размера сферических НЧЗ сопровождается ростом коэффициента молярной экстинкции, что позволяет достичь большей интенсивности окрашивания при равном количестве частиц. Так, для НЧЗ с диаметрами 40, 60 и 80 нм коэффициент молярной экстинкции возрастает в 9, 35 и 87 раз соответственно по сравнению с наночастицами с диаметром 20 нм [18]. Использование более крупных НЧЗ успешно обеспечивало снижение ПрО ИХА для различных аналитов [19–21]. Согласно оценке, проведенной в работе [22], количество НЧЗ, регистрируемых визуально на тест-полоске, определяется их количеством на единицу площади и размером. Для активно используемой в ИХА рабочей нитроцеллюлозной мембраны с размером пор 10 мкм оно составляет от 6.5×10^7 частиц/мм² для НЧЗ с диаметром 16 нм – до 1.4×10^5 частиц/мм² для НЧЗ с диаметром 115 нм. Однако применение в ИХА НЧЗ диаметром более 50 нм ограничено их агрегационной нестабильностью и затрудненной миграцией в пористых мембранах [19, 23]. Методические решения, увеличивающие стабильность крупных НЧЗ, позволяют преодолевать это ограничение, но представляют ноу-хау таких коммерческих производителей, как Nanocomposix (США), Nanohybrids (США), BVI Solutions (Великобритания) и др. Возможности двухстадийного синтеза крупных НЧЗ, пригодных для применения в ИХА, показаны в недавней работе [24].

Для использования крупных НЧЗ в качестве маркера предложен подход, названный “золотым” усилением. По окончании анализа на НЧЗ восстанавливаются соли золота, что приводит к формированию крупных частиц [25, 26]. При таком подходе исключается необходимость движения крупных частиц по порам мембран, поскольку наращивание частиц до диаметра более 1 мкм (рис. 2) происходит после завершения движения жидкости по тест-полоске и иммунохимических взаимодействий. Показано, что НЧЗ становятся центрами восстановления солей золота в присутствии гидросиламина, пероксида водорода, бромид цетилтриметиламмония и аскорбиновой кислоты [27–34].

Методы “серебряного” и “медного” усиления, основанные на восстановлении солей серебра и меди на затравочных НЧЗ, сходны по механизму. Крупные агрегаты серебра, формирующиеся вокруг НЧЗ, создают темноокрашенную концентрированную зону на светлом фоне нитроцеллюлозной мембраны [35, 36]. В работе [37] описана более сложная методика ИХА, включающая восстановление солей серебра и платины на НЧЗ в тестовой зоне и последующую детекцию их ката-

лазной активности в растворе. Для проведения “медного” усиления в работах [38, 39] использовался раствор, содержащий хлорид меди(II), разветвленный полиэтиленмин и аскорбиновую кислоту. Аминогруппы в составе полиэтиленмина способны связывать ионы Cu^{2+} [40]. Формирующиеся комплексы восстанавливались аскорбиновой кислотой с образованием частиц ядро–оболочка только в присутствии затравочных НЧЗ. Использование данного подхода позволило снизить ПрО двух антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, CFP-10 и Ag85B, примерно в 8 раз по сравнению с НЧЗ [38, 39].

Выбор между вариантами усиления определяется удобством их практического применения, в частности, минимальным числом стадий и дополнительных реагентов. “Серебряное” усиление характеризуется значительным увеличением интенсивности окрашивания и занимает мало времени (от 3 до 10 мин). К недостаткам метода относятся низкая стабильность исходных реагентов [41], а также необходимость удаления хлорид- и фосфат-ионов (компонентов тестируемых проб) из-за образования ими малорастворимых солей серебра. Предложенная в работе [42] предварительная пропитка стекловолоконных мембран солью серебра исключает необходимость включать в комплектацию набора для ИХА дополнительный жидкий реагент. “Золотое” усиление позволяет работать с такими достаточно стабильными реагентами, как соли золота, и восстановителями, пероксидом водорода и гидросиламином [25, 33, 34].

Интенсивность колориметрического сигнала на тест-полоске также зависит от формы НЧЗ. Так, в ИХА могут применяться несферические НЧЗ (нанозвезды, наностержни, наноцветы, нанопопкорн и др.), которые обладают большим коэффициентом молярной экстинкции по сравнению со сферическими мелкодисперсными частицами [17, 43]. Оптические свойства нанозвезд золота определяются их размером и формой (количеством граней). В работе [17] показано, что при увеличении диаметра нанозвезд золота с 21 до 55 нм максимальный коэффициент молярной экстинкции увеличивается с 5.7×10^8 до $26.8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Установлено, что для наностержней золота зависимость коэффициента молярной экстинкции от объема близка к линейной ($R^2 = 0.78042$) [44]. При увеличении отношения длины наностержня к диаметру возрастают коэффициент молярной экстинкции и длина волны максимума поглощения. Для мультиплексного детектирования нескольких соединений с помощью одной тест-полоски успешно применяются цветовые различия НЧЗ разной формы [45–47].

Конъюгаты НЧЗ разного размера и формы с антителами отличаются не только оптическими свойствами маркера, но и аффинностью иммун-

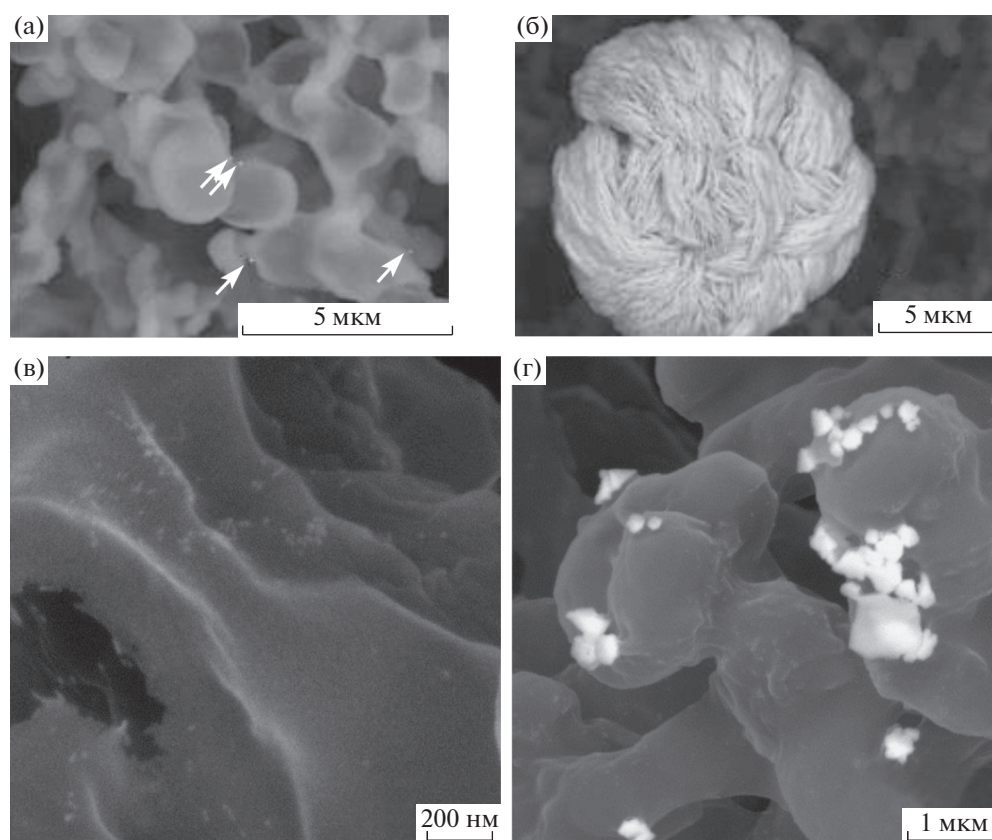


Рис. 2. Изменение размера и морфологии НЧЗ при “серебряном” (а, б) и “золотом” (в, г) усилении: микрофотографии мембран с частицами до усиления (а, в) и после усиления (б, г). Рисунки (а, б) из работы [119] приведены с любезного разрешения издательства Elsevier. Рисунки (в, г) из работы [120] приведены с любезного разрешения издательства Springer Nature.

ного взаимодействия. Большое число антител на одной наночастице увеличивает вероятность формирования поливалентных комплексов с мультивалентными антигенами, характеризующихся большими константами ассоциации [48, 49]. Экспериментально показано изменение аффинности конъюгатов НЧЗ с антителами в зависимости от размера частиц и поверхностной плотности иммобилизованных антител [49–51]. Следует отметить также, что вследствие малой продолжительности взаимодействий в ИХА, составляющей несколько мин, доля иммунных комплексов, успевающих за это время диссоциировать, крайне невелика. Поэтому отличия в свойствах разных конъюгатов наночастиц с антителами, проявляемые в ИХА, определяются, прежде всего, кинетическими константами ассоциации.

Магнитные частицы (МЧ). МЧ представляют собой частицы различной формы и размера (от десятков нм до нескольких мкм), обладающие магнитными свойствами. МЧ состоят из железа, никеля, кобальта или их оксидов, стабилизированных молекулами, адсорбированными на по-

верхности, или включением в полимерные матрицы [52]. Приложение внешнего магнитного поля позволяет отделить МЧ с образованными на их поверхности иммунными комплексами. Данное свойство было использовано в различных форматах иммуноанализа для концентрирования антигена и удаления компонентов матрикса [53]. Эти два эффекта могут применяться и в рамках одного анализа. Так, в работе [54] показано, что при десятикратном магнитном концентрировании *Escherichia coli* из пищевых матриц ПрО снижается в 100 раз благодаря удалению компонентов пробы.

МЧ могут детектироваться не только визуально [55, 56], но и с использованием магнетометров [57]. Такой подход позволяет существенно снизить неспецифический сигнал в биологических пробах [58] и выявить малые количества маркера, а также достичь низких ПрО [59, 60].

Ключевой характеристикой, определяющей применение МЧ в ИХА, является их размер. В работе [61] показано, что использование в качестве маркера в ИХА крупных МЧ (около 1 мкм) ограничено из-за плохой их миграции по мембране и высокого неспецифического связывания, тогда как

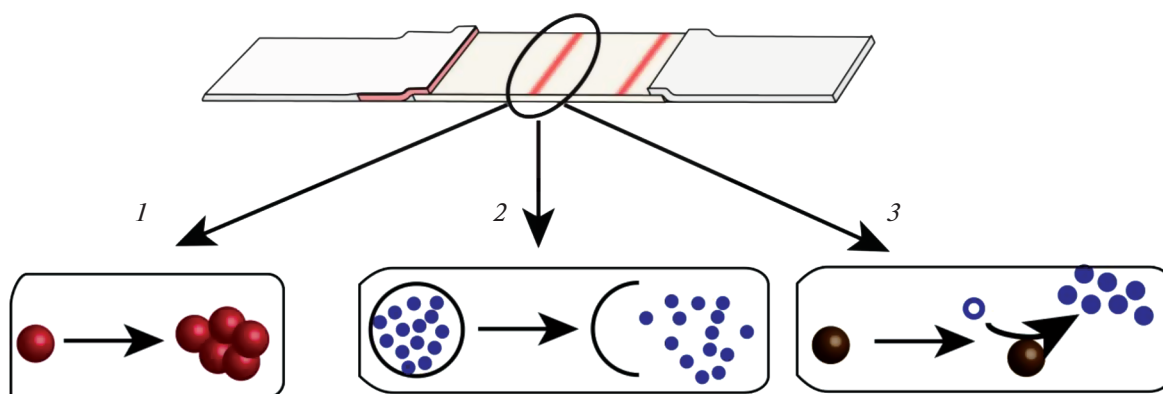


Рис. 3. Схематическое изображение подходов для увеличения количества метки в регистрируемой зоне путем агрегации маркера (1), высвобождения метки из частиц носителей (2), накопления окрашенной метки-продукта в катализируемой наночастицами реакции (3).

МЧ меньшего диаметра (100–200 нм) могут быть успешно использованы. В работе [56] исследовали влияние размера МЧ на интенсивность окрашивания тестовой зоны при проведении ИХА афлатоксина М1. Наибольшие сигналы были достигнуты для частиц с диаметром 180 нм, а их снижение для крупных (500 нм) и мелких (80 нм) МЧ объясняли плохой подвижностью. В работе [62] показано влияние размеров МЧ (от 5 до 23 нм) и их агрегатов после функционализации на чувствительность их индуктивной детекции на тест-полоске. Показано, что наилучший результат достигается для МЧ с размером 12 нм, а агрегация частиц, не препятствующая миграции по мембране, позволяет снизить ПрО.

Модификация МЧ позволяет использовать их как для сепарации, так и высокочувствительной оптической детекции [63]. Например, модификация МЧ квантовыми точками приводила к значительному снижению ПрО вследствие интенсивного флуоресцентного сигнала [64, 65].

Увеличение количества метки в зоне регистрации сигнала. Повышение количества маркера в составе иммунных комплексов увеличивает регистрируемый сигнал и, как следствие, снижает ПрО. Обеспечить это повышение можно тремя основными способами (рис. 3), связанными с:

- включением в состав иммунного комплекса больших количеств маркера (сборка агрегатов наночастиц);
- использованием частиц-носителей, содержащих большое количество маркера;
- каталитической конверсией наночастицами субстрата в детектируемый продукт (также рассматриваемый в таком случае как маркер).

Включение в состав комплекса больших количеств маркера (сборка агрегатов). Формирование агрегатов наночастиц в тестовой зоне увеличивает интенсивность окрашивания. Как отмечалось

выше, использование крупных частиц-маркеров в ИХА затруднено. Сборка агрегатов из небольших частиц позволяет преодолеть это ограничение. Связывание частиц могут обеспечивать высокоаффинные взаимодействия биотин – стрептавидин [66], антитело – антигенное антитело [67] и антитело – антиген [68]. Эффективность данного подхода зависит от свойств матрикса, аффинности реагентов и характеристик частиц (размера, концентрации, плотности иммобилизации реагентов на поверхности и др.). В работе [69] показана возможность варьировать размер агрегатов МЧ (около 400 нм), функционализированных биотинилированными антителами, и конъюгатов НЧЗ – стрептавидин (около 20 нм), изменяя соотношение концентраций частиц и время их инкубации.

Преимуществом данного подхода является простота реализации. Взаимодействующие маркеры, как правило, находятся на тест-полоске в высушенном виде. При проведении анализа происходит их регидратация и инициируются все последующие взаимодействия. Однако в ряде случаев воспроизводимость агрегационных процессов не высока. Кроме того, ламинарная миграция жидкости по тест-полоске препятствует эффективному смешиванию реагентов. Перспективна последовательная сборка иммунных комплексов в зоне связывания, активно используемая в микрофлюидике. Такую сборку может обеспечивать пространственное разделение потоков реагентов [70], различие в скоростях движения реагентов вследствие модификации мембраны [71] или изменение геометрии потоков [72].

Частицы-носители, включающие большое количество метки. Рост оптического сигнала обеспечивает также использование крупных частиц-носителей, например, липосом, высвобождающих большое количество детектируемой метки [73]. Так, одна липосома диаметром 208 ± 42 нм вме-

Таблица 1. Сравнение подходов к снижению пределов обнаружения ИХА

Подход к снижению ПрО	Аналит	Снижение ПрО*, n раз	Ссылка
Изменение диаметра НЧЗ с 52 до 33.4 нм	Х вирус картофеля	3	[20]
Изменение диаметра НЧЗ с 20 до 35 нм	<i>E. coli</i> O157:H7	10	[19]
Восстановление солей золота на поверхности НЧЗ	<i>E. coli</i> O157:H7	6	[106]
	<i>Salmonella typhimurium</i>	7	[106]
	<i>E. coli</i> O157:H7	8	[107]
	Вирус птичьего гриппа	100	[27]
	Вирус болезни Ньюкастла	100	[27]
	<i>Salmonella enteridis</i>	100	[34]
Восстановление солей серебра на поверхности НЧЗ	Абрин-а	100	[42]
	Фумонизин В1	2.5	[108]
	Дезоксиниваленол	2	[108]
	Кадмий	4	[109]
	Х вирус картофеля	10	[110]
	Антигены <i>Helicobacter pylori</i>	10	[111]
	Простат-специфический антиген	3	[41]
Использование наночастиц золота	Прокальцитонин	5	[112]
	Афлатоксин В1	10	[113]
	<i>E. coli</i> O157:H7	100	[114]
Агрегация МЧ и НЧЗ	Х вирус картофеля	33	[69]
Агрегация двух конъюгатов НЧЗ	<i>E. coli</i> O157:H7	100	[67]
	Тропонин I	100	[115]
	Вирус гриппа А	8	[116]
Агрегация трех конъюгатов НЧЗ	Прокальцитонин	30	[66]
Пероксидазные свойства наночастиц железа	Вирус Эбола	100	[85]
Каталитические свойства конъюгатов наночастиц с ПХ	Прогестерон	30	[117]
	<i>E. coli</i> O157:H7	1000	[118]
Каталитические свойства конъюгатов наночастиц с ЩФ	Х вирус картофеля	27	[104]

* Снижение ПрО по сравнению с традиционным ИХА на основе сферических НЧЗ диаметром от 30 до 40 нм.

щает около 3.8×10^5 молекул флуоресцентного красителя сульфородамина В [74]. В работе [75] показано, что при использовании липосом с инкапсулированным сульфородамином в качестве маркера для ИХА *Salmonella typhimurium* ПрО снижается на пять порядков по сравнению с коммерческими тест-системами с НЧЗ.

Применение липосом в ИХА ограничено их невысокой стабильностью в разных средах. Так, разрушение липосом фосфолипазами (содержащимися в пробах) или некоторыми органическими растворителями (экстрагентами) вызывает не-

специфичное окрашивание мембраны. Однако подход, основанный на высвобождении метки, перспективен и может быть реализован с использованием таких более стабильных частиц, как наноконтейнеры [76], альгинатные частицы и др.

Конверсия наночастицами субстрата в детектируемый продукт. Третий подход для усиления оптического сигнала основан на использовании маркеров с каталитической активностью. Образование детектируемого продукта обеспечивает либо непосредственно наночастица (нанозим) [77], либо конъюгированный с ней фермент [78].

В настоящее время известны нанозимы с пероксидазо-, оксидазо-, каталазо- и супероксиддисмутазо- и гидролазо-подобными активностями [77]. Нанозимы активно применяются в различных аналитических системах [79]. Их каталитическая активность определяется, прежде всего, площадью свободной поверхности. Показано увеличение каталитической активности нанозимов при снижении размера частиц [80–82]. Нанозимы с разветвленной поверхностью обладают большей каталитической активностью по сравнению со сферическими частицами [83, 84]. Для ИХА особый интерес представляют окрашенные нанозимы, наночастицы оксида железа [85], платины [86], биметаллические частицы Au-Pt [87, 88] и Pt-Pd [89], частицы Берлинской лазури [90] и др.

Нанозимы могут быть использованы в качестве колориметрической (собственная окраска) [91] и каталитически активной метки (как правило, с пероксидазной активностью) [92, 93]. Снижение ПрО при использовании каталитических свойств основано на конверсии субстрата в детектируемый продукт. Амплификация сигнала достигается в результате формирования единичной частицей нанозима множества молекул регистрируемого продукта. Использование каталитических свойств нанозима позволяет снизить ПрО на 2–3 порядка по сравнению с колориметрической меткой [84, 93, 94]. Применение нанозимов для снижения ПрО ИХА ограничивает неконтролируемая адсорбция на их поверхности компонентов проб [85], снижающая каталитическую активность. Такой же эффект наблюдается при функционализации поверхности нанозимов [95].

Другой вариант каталитически активной метки – ферменты, присоединенные к наночастицам [96]. В качестве таких реагентов в ИФА наиболее широко используются пероксидаза из корней хрена (ПХ) и щелочная фосфатаза (ЩФ). Использование ПХ позволило снизить ПрО ИХА на 2–3 порядка по сравнению с неамплифицированным анализом [97–99]. Однако применение этого маркера ограничено эндогенной пероксидазной активностью проб. Пероксидазы и небелковые компоненты с пероксидазо-подобной активностью, присутствующие в большинстве биопроб, приводят к накоплению окрашенного продукта ферментативной реакции даже при отсутствии антигена в пробе. ЩФ имеет меньшее распространение и активность в биопробах по сравнению с ПХ и поэтому успешно используется в качестве метки для ИХА [70, 100–103]. Применение ЩФ в ИХА обеспечило 27-кратное снижение ПрО [104] и 46-кратное – в дот-иммуноанализе с использованием бумажных носителей [105].

Для эффективного применения каталитического подхода необходимо минимизировать фон, создаваемый неспецифически связанным марке-

ром, а также естественными ферментами, присутствующими в пробе. Для этого может использоваться магнитное концентрирование и отмывка тест-полосок.

Общая сравнительная оценка. Снижение ПрО, наряду с повышением информативности результатов тестирования и мультиплексностью, является перспективным направлением развития ИХА. В табл. 1 представлены преимущества различных использовавшихся подходов. Наиболее интересны универсальные методические решения, которые могут быть применены для широкого спектра аналитов. Системы ИХА, включающие дополнительные стадии, имеют ограниченные перспективы практического использования. Предпочтительна реализация “сухой” системы, то есть тест-полоски, содержащей все реагенты. Представляет интерес также применение портативных средств регистрации оптического сигнала, позволяющее оперативно определять концентрацию аналита и снижать ПрО благодаря не зависящей от человека оценке связывания маркера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04108).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dzantiev B.B., Byzova N.A., Urusov A.E., Zherdev A.V.* // Trends Anal. Chem. 2014. V. 55. P. 81–93.
2. *Li Y.-F., Sun Y.-M., Beier R.C., Lei H.-T., Gee S., Hammock B.D., Wang H., Wang Z., Sun X., Shen Y.-D., Yang J.-Y., Xu Z.-L.* // Trends Anal. Chem. 2017. V. 88. P. 25–40.
3. *Ye H., Xia X.* // J. Mater. Chem. 2018. V. 6. № 44. P. 7102–7111.
4. *Liu L., Yang D., Liu G.* // Biosens. Bioelectron. 2019. V. 136. P. 60–75.
5. *Mahmoudi T., de la Guardia M., Shirdel B., Mokhtarzadeh A., Baradaran B.* // Trends Anal. Chem. 2019. V. 116. P. 13–30.
6. *Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H.* // Lab. Chip. 2019. V. 19. № 15. P. 2486–2499.
7. *Zhou Y., Ding L., Wu Y., Huang X., Lai W., Xiong Y.* // Trends Anal. Chem. 2019. V. 112. P. 147–160.
8. *Urusov A.E., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // Biosensors. 2019. V. 9. № 3. Article 89. <https://doi.org/10.3390/bios9030089>
9. *Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic Applications. Chapter 2. Rijeka: InTech, 2018. P. 9–43.
10. *Goryacheva I.Y., Lenain P., De Saeger S.* // Trends Anal. Chem. 2013. V. 46. P. 30–43.
11. *Gong X., Cai J., Zhang B., Zhao Q., Piao J., Peng W., Gao W., Zhou D., Zhao M., Chang J.* // J. Mater. Chem. 2017. V. 5. № 26. P. 5079–5091.
12. *Wong R., Tse H.* Lateral Flow Immunoassay Totowa: Humana Press, 2009. 223 p.

13. Jans H., Huo Q. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. № 7. P. 2849–2866.
14. Dykman L., Khlebtsov N. // Chem. Soc. Rev. 2012. V. 41. № 6. P. 2256–2282.
15. Krajczewski J., Kořataj K., Kudelski A. // RSC Adv. 2017. V. 7. № 28. P. 17559–17576.
16. Liu X., Atwater M., Wang J., Huo Q. // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2017. V. 58. № 1. P. 3–7.
17. De Puig H., Tam J.O., Yen C.-W., Gehrke L., Hamad-Schifferli K. // J. Phys. Chem. C. 2015. V. 119. № 30. P. 17408–17415.
18. Dolimyi A.I. // Colloid J. 2017. V. 79. № 5. P. 611–620.
19. Cui X., Huang Y., Wang J., Zhang L., Rong Y., Lai W., Chen T. // RSC Adv. 2015. V. 5. № 56. P. 45092–45097.
20. Safenkova I., Zherdev A., Dzantiev B. // Anal. Bioanal. Chem. 2012. V. 403. № 6. P. 1595–1605.
21. Chen X., Leng Y., Hao L., Duan H., Yuan J., Zhang W., Huang X., Xiong Y. // Theranostics. 2020. V. 10. № 8. P. 3737–3748.
22. Khlebtsov B.N., Tumskiy R.S., Burov A.M., Pylaev T.E., Khlebtsov N.G. // ACS Appl. Nano Mater. 2019. V. 2. № 8. P. 5020–5028.
23. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., van Amerongen A. // Anal. Bioanal. Chem. 2009. V. 393. № 2. P. 569–582.
24. Byzova N.A., Zherdev A.V., Khlebtsov B.N., Burov A.M., Khlebtsov N.G., Dzantiev B.B. // Sensors. 2020. V. 20. № 12. Article 3608.
<https://doi.org/10.3390/s20123608>
25. Dias J.T., Svedberg G., Nystrand M., Andersson-Svahn H., Gantelius J. // Sci. Rep. 2017. V. 7. Article 6837.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-07030-0>
26. Zayats M., Baron R., Popov I., Willner I. // Nano Lett. 2005. V. 5. № 1. P. 21–25.
27. Li J., Zou M., Chen Y., Xue Q., Zhang F., Li B., Wang Y., Qi X., Yang Y. // Anal. Chim. Acta. 2013. V. 782. P. 54–58.
28. Liu X., Xu H., Xia H., Wang D. // Langmuir. 2012. V. 28. № 38. P. 13720–13726.
29. Ahmed S.R., Oh S., Baba R., Zhou H., Hwang S., Lee J., Park E.Y. // Nanoscale Res. Lett. 2016. V. 11. Article 65.
<https://doi.org/10.1186/s11671-016-1290-3>
30. Lan M., Guo Y., Zhao Y., Liu Y., Gui W., Zhu G. // Anal. Chim. Acta. 2016. V. 938. P. 146–155.
31. Wang X., Niessner R., Knopp D. // Analyst. 2015. V. 140. № 5. P. 1453–1458.
32. Zhang Z., Wang H., Chen Z., Wang X., Choo J., Chen L. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 114. P. 52–65.
33. Newman J.D.S., Blanchard G.J. // Langmuir. 2006. V. 22. № 13. P. 5882–5887.
34. Bu T., Huang Q., Yan L., Huang L., Zhang M., Yang Q., Yang B., Wang J., Zhang D. // Food Control. 2018. V. 84. P. 536–543.
35. Gupta S., Huda S., Kilpatrick P.K., Velev O.D. // Anal. Chem. 2007. V. 79. № 10. P. 3810–3820.
36. Liu R., Zhang Y., Zhang S., Qiu W., Gao Y. // Appl. Spectrosc. Rev. 2014. V. 49. № 2. P. 121–138.
37. Huang D., Lin B., Song Y., Guan Z., Cheng J., Zhu Z., Yang C.J. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2019. V. 11. № 22. P. 1800–1806.
38. Phan L.M.T., Kim E.B., Cheon S.A., Shim T.S., Hwa K.J., Park T.J. // Sens. Actuat. B Chem. 2020. V. 317. Article 128220.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128220>
39. Phan L.M.T., Rafique R., Baek S.H., Nguyen T.P., Park K.Y., Kim E.B., Kim J.G., Park J.P., Kailasa S.K., Kim H.-J., Chung C., Shim T.S., Park T.J. // Biosens. Bioelectron. 2018. V. 121. P. 111–117.
40. Kislenko V.N., Oliynyk L.P. // J. Polymer Sci. A Polymer Chem. 2002. V. 40. № 7. P. 914–922.
41. Rodríguez M.O., Covián L.B., García A.C., Blanco-López M.C. // Talanta. 2016. V. 148. P. 272–278.
42. Yang W., Li X., Liu G., Zhang B., Zhang Y., Kong T., Tang J., Li D., Wang Z. // Biosens. Bioelectron. 2011. V. 26. № 8. P. 3710–3713.
43. Nehl C.L., Liao H., Hafner J.H. // Nano Lett. 2006. V. 6. № 4. P. 683–688.
44. Near R.D., Hayden S.C., Hunter R.E., Thackston D., El-Sayed M.A. // J. Phys. Chem. C. 2013. V. 117. № 45. P. 23950–23955.
45. Anfossi L., Di Nardo F., Russo A., Cavalera S., Giovannoli C., Spano G., Baumgartner S., Lauter K., Baggiani C. // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. № 9. P. 1905–1913.
46. Di Nardo F., Alladio E., Baggiani C., Cavalera S., Giovannoli C., Spano G., Anfossi L. // Talanta. 2019. V. 192. P. 288–294.
47. Di Nardo F., Baggiani C., Giovannoli C., Spano G., Anfossi L. // Microchim. Acta. 2017. V. 184. № 5. P. 288–294.
48. Mani V., Wasalathanthri D.P., Joshi A.A., Kumar C.V., Rusling J.F. // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 23. P. 10485–10491.
49. Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // J. Immunol. Methods. 2010. V. 357. № 1–2. P. 17–25.
50. Saha B., Evers T.H., Prins M.W.J. // Anal. Chem. 2014. V. 86. № 16. P. 8158–8166.
51. Byzova N.A., Safenkova I.V., Slutskaya E.S., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Bioconjug. Chem. 2017. V. 28. № 11. P. 2737–2746.
52. Xianyu Y., Wang Q., Chen Y. // Trends Anal. Chem. 2018. V. 106. P. 213–224.
53. Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // Nanotechnol. Russ. 2017. V. 12. № 9–10. P. 471–479. (Урусов А.Е., Петракова А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Росс. нанотехнол. 2017. Т. 12. № 9–10. С. 3–11.)
54. Li Q., Qi H., Zhong Z., Zhou H.-X., Deng C.-Y., Zhu H., Li J.-F., Wang X.-L. // Intern. J. Nanomed. 2011. № 6. P. 3033–3039.
55. Liu F., Zhang H., Wu Z., Dong H., Zhou L., Yang D., Ge Y., Jia C., Liu H., Jin Q., Zhao J., Zhang Q., Mao H. // Talanta. 2016. V. 161. P. 205–210.
56. Liu D., Huang Y., Wang S., Liu K., Chen M., Xiong Y., Yang W., Lai W. // Food Control. 2015. V. 51. P. 218–224.
57. Moyano A., Serrano-Pertierra E., Salvador M., Martínez-García J., Rivas M., Blanco-López M.C. //

- Diagnostics. 2020. V. 10. № 5. Article 288.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics10050288>
58. Gas F., Baus B., Queré J., Chapelle A., Dreanno C. // *Talanta*. 2016. V. 147. P. 581–589.
59. Guteneva N.V., Znoyko S.L., Orlov A.V., Nikitin M.P., Nikitin P.I. // *Microchim. Acta*. 2019. V. 186. № 9. Article 621.
<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3726-9>
60. Bragina V.A., Znoyko S.L., Orlov A.V., Pushkarev A.V., Nikitin M.P., Nikitin P.I. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 15. P. 9852–9857.
61. Yan J., Liu Y., Wang Y., Xu X., Lu Y., Pan Y., Guo F., Shi D. // *Sens. Actuat. B Chem.* 2014. V. 197. P. 129–136.
62. Salvador M., Gallo-Cordova Á., Moyano A., Martínez-García J.C., Blanco-López M.C., Morales M.P., Rivas M. // *Analyst*. 2020. V. 145. № 17. P. 5905–5914.
63. Huang Z., Hu S., Xiong Y., Wei H., Xu H., Duan H., Lai W. // *Trends Anal. Chem.* 2019. V. 114. P. 151–170.
64. Wang C., Xiao R., Wang S., Yang X., Bai Z., Li X., Rong Z., Shen B., Wang S. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 146. Article 111754.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111754>
65. Guo L., Shao Y., Duan H., Ma W., Leng Y., Huang X., Xiong Y. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 7. P. 4727–4734.
66. Taranova N.A., Urusov A.E., Sadykhov E.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta*. 2017. V. 184. № 10. P. 4189–4195.
67. Chen M., Yu Z., Liu D., Peng T., Liu K., Wang S., Xiong Y., Wei H., Xu H., Lai W. // *Anal. Chim. Acta*. 2015. V. 876. P. 71–76.
68. Zhong Y., Chen Y., Yao L., Zhao D., Zheng L., Liu G., Ye Y., Chen W. // *Microchim. Acta*. 2016. V. 183. № 6. P. 1989–1994.
69. Razo S.C., Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Anal. Chim. Acta*. 2018. V. 1007. P. 50–60.
70. Preechakasedkit P., Siangproh W., Khongchareonporn N., Ngamrojanavanich N., Chailapakul O. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. V. 102. P. 27–32.
71. Lutz B., Liang T., Fu E., Ramachandran S., Kauffman P., Yager P. // *Lab Chip*. 2013. V. 13. № 14. P. 2840–2847.
72. Parolo C., Medina-Sánchez M., de la Escosura-Muñiz A., Merkoçi A. // *Lab. Chip*. 2013. V. 13. № 3. P. 386–390.
73. Edwards K.A., Baeumner A.J. // *Talanta*. 2006. V. 68. № 5. P. 1421–1431.
74. Edwards K.A., Baeumner A.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 386. № 5. P. 1335–1343.
75. Shukla S., Leem H., Kim M. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2011. V. 401. № 8. P. 2581–2590.
76. Hofmann C., Duerkop A., Baeumner A.J. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019. V. 58. № 37. P. 12840–12860.
77. Wu J., Wang X., Wang Q., Lou Z., Li S., Zhu Y., Qin L., Wei H. // *Chem. Soc. Rev.* 2019. V. 48. № 4. P. 1004–1076.
78. Gao X., Xu L.-P., Wu T., Wen Y., Ma X., Zhang X. // *Talanta*. 2016. V. 146. P. 648–654.
79. Huang Y., Ren J., Qu X. // *Chem. Rev.* 2019. V. 119. № 6. P. 4357–4412.
80. Peng F.F., Zhang Y., Gu N. // *Chinese Chem. Lett.* 2008. V. 19. № 6. P. 730–733.
81. Asati M.A., Santra D.S., Kaittanis M.C., Nath D.S., Perez P.J.M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2009. V. 48. № 13. P. 2308–2312.
82. Komkova M.A., Karyakina E.E., Karyakin A.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2018. V. 140. № 36. P. 11302–11307.
83. Wu J., Qin K., Yuan D., Tan J., Qin L., Zhang X., Wei H. // *ACS Appl. Mater. Interf.* 2018. V. 10. № 15. P. 12954–12959.
84. Gao Z., Ye H., Tang D., Tao J., Habibi S., Minerick A., Tang D., Xia X. // *Nano Lett.* 2017. V. 17. № 9. P. 5572–5579.
85. Duan D., Fan K., Zhang D., Tan S., Liang M., Liu Y., Zhang J., Zhang P., Liu W., Qiu X., Kobinger G.P., Fu G.G., Yan X. // *Biosens. Bioelectron.* 2015. V. 74. P. 134–141.
86. Lin S., Zheng D., Li A., Chi Y. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2019. V. 411. № 18. P. 4063–4071.
87. Loynachan C.N., Thomas M.R., Gray E.R., Richards D.A., Kim J., Miller B.S., Brookes J.C., Agarwal S., Chudasama V., McKendry R.A., Stevens M.M. // *ACS Nano*. 2018. V. 12. № 1. P. 279–288.
88. Shim K., Lee W.C.; Heo Y.U.; Shahabuddin M., Park M.S., Hossain M.S.A., Kim J.H. // *Sci. Rep.* 2018. V. 9. № 1. Article 894.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-36759-5>
89. Zhao Y., Yang M., Fu Q., Ouyang H., Wen W., Song Y., Zhu C., Lin Y., Du D. // *Anal. Chem.* 2018. V. 90. № 12. P. 7391–7398.
90. Zhao B., Huang Q., Dou L., Bu T., Chen K., Yang Q., Yan L., Wang J., Zhang D. // *Sens. Actuat. B Chem.* 2018. V. 275. P. 223–229.
91. He Q., Yang H., Chen Y., Shen D., Cui X., Zhanga C., Xiao H., Eremin S.A., Fang Y., Zhao S. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2020. V. 187. Article 113317.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113317>
92. Song W., Zhao B., Wang C., Ozaki Y., Lu X. // *J. Mater. Chem. B*. 2019. V. 7. № 6. P. 850–875.
93. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. // *Microchim. Acta*. 2020. V. 187. № 5. Article 268.
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-04253-3>
94. Jiang T., Song Y., Wei T., Li H., Du D., Zhu M., Lin Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 77. P. 687–694.
95. Gao L., Zhuang J., Nie L., Zhang J., Zhang Y., Gu N., Wang T., Feng J., Yang D., Perrett S., Yan X. // *Nat. Nanotechnol.* 2007. V. 2. № 9. P. 577–583.
96. Zu I.R.F., Ginsberg V.K., Houts T., Rabble J., Merrick H., Ullman E.F., Fischer M.M., Chung Slzto C., Stiso S.N., Utman D.J. // *Clin. Chem.* 1985. V. 31. № 7. P. 1144–1150.
97. Cho I.-H., Irudayaraj J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 10. P. 3313–3319.
98. Ren W., Cho I.-H., Zhoua Z., Irudayaraj J. // *Chem. Commun.* 2016. V. 52. P. 4930–4933.
99. Kim H.-S., Oh B.-K. // *BioChip J.* 2014. V. 8. № 1. P. 1–7.

100. *Santivañez S.J., Rodriguez M.L., Rodriguez S., Sako Y., Nkouawa A., Kobayashi Y., Sotomayor A.L., Peralta J.E., Valcarcel M., Gonzalez A.E., Garcia H.H., Ito A.* // *J. Clin. Microbiol.* 2015. V. 53. № 12. P. 3859–3863.
101. *Endo F., Tabata T., Sadato D., Kawamura M., Ando N., Oboki K., Ukaji M., Kobayashi K., Kobayashi Y., Ikeda T., Shibasaki F.* // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 2. Article e0171314.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171314>
102. *Ono T., Kawamura M., Arao S., Nariuchi H.* // *J. Immunol. Methods.* 2003. V. 272. № 1–2. P. 211–218.
103. *Akter S., Kustila T., Leivo J., Muralitharan G., Vehniäinen M., Lamminmäki U.* // *Biosensors.* 2019. V. 9. № 2. Article 79.
<https://doi.org/10.3390/bios9020079>
104. *Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. № 1. Article № 25.
<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2595-3>
105. *Lathwal S., Sikes H.D.* // *Lab. Chip.* 2016. V. 16. № 8. P. 1374–1382.
106. *Shin J.H., Hong J., Go H., Park J., Kong M., Ryu S., Kim K.-P., Roh E., Park J.-K.* // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. № 1. P. 290–297.
107. *Wang J., Chen M., Sheng Z., Liu D., Wu S., Lai W.-H.* // *RSC Adv.* 2015. V. 5. № 76. P. 62300–62305.
108. *Yu Q., Li H., Li C., Zhang S., Shen J., Wang Z.* // *Food Control.* 2015. V. 54. P. 347–352.
109. *Xing C., Kuang H., Hao C., Liu L., Wang L., Xu C.* // *Food Agric. Immunol.* 2014. V. 25. № 2. P. 287–300.
110. *Drygin Y.F., Blintsov A.N., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Osipov A.P., Varitzev Y.A., Uskov A.I., Kravchenko D.V., Atabekov J.G.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. № 1. P. 179–189.
111. *Byzova N.A., Zherdev A.V., Sveshnikov P.G., Sadykhov E.G., Dzantiev B.B.* // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2015. V. 51. № 5. P. 608–617. (Бызова Н.А., Жердев А.В., Свешников П.Г., Садыхов Э.Г., Дзантиев Б.Б. // Прикл. биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. № 5. С. 520–530.)
112. *Serebrennikova K.V., Samsonova J.V., Osipov A.P., Senapati D., Kuznetsov D.V.* // *Nano Hybrids Compos.* 2017. V. 13. P. 47–53.
113. *Ji Y., Ren M., Li Y., Huang Z., Shu M., Yang H., Xiong Y., Xu Y.* // *Talanta.* 2015. V. 142. P. 206–212.
114. *Zhang L., Huang Y., Wang J., Rong Y., Lai W., Zhang J., Chen T.* // *Langmuir.* 2015. V. 31. № 19. P. 5537–5544.
115. *Choi D.H., Lee S.K., Oh Y.K., Bae B.W., Lee S.D., Kim S., Shin Y.-B., Kim M.-G.* // *Biosens. Bioelectron.* 2010. V. 25. № 8. P. 1999–2002.
116. *Wiriyachaiporn N., Maneerakorn W., Apiwat C., Dharakul T.* // *Microchim. Acta.* 2015. V. 182. № 1–2. P. 85–93.
117. *Samsonova J.V., Safronova V.A., Osipov A.P.* // *Talanta.* 2015. V. 132. P. 685–689.
118. *Cho I.-H., Bhunia A., Irudayaraj J.* // *Int. J. Food Microbiol.* 2015. V. 206. P. 60–66.
119. *Wada A., Sakoda Y., Oyamada T., Kida H.* // *J. Virol. Methods.* 2011. V. 178. № 1–2. P. 82–86.
120. *Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* // *Microchim. Acta.* 2018. V. 185. № 11. Article 506.
<https://doi.org/10.1007/s00604-018-3052-7>

Approaches for Increasing Sensitivity of Immunochromatographic Test-Systems with Colorimetric Detection (Review)

V. G. Panferov^a, I. V. Safenkova^a, A. V. Zherdev^a, and B. B. Dzantiev^{a,*}

^a*Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: dzantiev@inbi.ras.ru*

Recently, immunochromatographic assay (ICA) methods have found a wide range of uses in medical diagnostic, quality control, and consumer safety products because of their rapidity and methodological simplicity of testing; however, ICAs are usually less sensitive than other analytical methods. In this review, we survey modern methodological solutions for ensuring high sensitivity of ICAs based on the use of nanoparticle markers and colorimetric detection and characterize the main direction of such works focusing on lowering the detection limit amplification of the detectable signal generated by a single nanoparticle and forming, during the assay, immune complexes labeled with aggregates consisting of a large number of nanoparticles. The advantages and limitations of different approaches are discussed. We show that their use provides a decrease in the detection limit of ICA by 1–3 orders of magnitude, which makes this method quite competitive compared with instrumental methods of analysis.

Keywords: immunochromatography, functionalized nanoparticles, signal amplification, limit of detection