ЖУРНАЛ АНАЛИТИЧЕСКОЙ ХИМИИ, 2022, том 77, № 4, с. 298–311

ОБЗОРЫ

УДК 543.57.083.3

ПРЕДЕЛЫ ОБНАРУЖЕНИЯ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ: ЛИМИТИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ И СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ

© 2022 г. А. В. Жердев[a], Б. Б. Дзантиев[a], *

[a] Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

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

Поступила в редакцию 10.09.2021 г.
После доработки 06.10.2021 г.
Принята к публикации 06.10.2021 г.

Одним из приоритетных направлений развития современных иммуноаналитических систем стало обеспечение достоверного выявления и определения все более низких концентраций аналитов. В этой связи востребована оценка факторов, влияющих на предел обнаружения и лимитирующих дальнейшее снижение этой величины. В мини-обзоре рассмотрено разнообразие иммуноаналитических систем, теоретические оценки их пределов обнаружения. Охарактеризованы возможности снижения предела обнаружения, предоставляемые изменением состава определяемых иммунных комплексов, использованием новых маркеров, включаемых в эти комплексы, различными способами их регистрации и усиления регистрируемого сигнала. Обсуждаются подходы, предлагаемые для выявления в тестируемых пробах единичных молекул целевых соединений.

Ключевые слова: иммуноаналитические методы, иммунные комплексы, маркеры, предел обнаружения, способы усиления сигнала, выявление единичных молекул.

DOI: 10.31857/S0044450222040156

Иммунохимические методы выявления и определения содержания различных соединений, основанные на применении антител, нашли широкое применение в современной практике – в медицинской и ветеринарной диагностике, контроле качества и безопасности потребительской продукции (прежде всего, продуктов питания), экологическом мониторинге [1, 2]. Все иммунохимические методы основаны на образовании комплекса антител с определяемым антигеном (аналитом), который регистрируется инструментально или визуально. Разнообразные наборы реагентов и методики определения отличаются как по схемам формирования иммунных комплексов и способам их регистрации, так и по используемым препаратам антител, которые могут связывать целевые соединения с разной аффинностью и специфичностью [3]. В этой связи востребовано сравнение доступных пользователю вариантов, при выборе из которых крайне важную роль играет предел обнаружения – минимальная выявляемая концентрация целевого соединения. Для обоснованного сравнения данная величина должна быть корректно установлена; особенности решения этой задачи неоднократно обсуждались применительно к биоаналитическим системам [4–6].

Чтобы аналитическая методика имела практическую ценность, предел обнаружения должен быть ниже или равен концентрации, являющейся пороговой для принятия решения на основании результатов анализа пробы (например, предельно допустимой концентрации в пище опасного для здоровья вещества или концентрации биомаркера в крови, разграничивающей здоровых и больных пациентов). Это требование необходимо, но не достаточно. На сегодняшний день для большинства значимых биологически активных веществ уже предложены аналитические методики с пределами обнаружения, достигшими эти пороговые уровни. Однако поиск методик с еще меньшими пределами обнаружения продолжается [7–11]. В чем состоят преимущества таких разработок? Во-первых, информация о присутствии контролируемого соединения даже в концентрации ниже пороговой также позволяет сделать значимые выводы. Например, концентрация биомаркера некоторой патологии еще недостаточно высока, чтобы говорить о заболевании, но свидетельствует о возможных угрозах для здоровья в будущем и целесообразности профилактических мер. Во-вторых, снижение предела обнаружения, как правило, сопровождается ростом точности определения концентраций аналита,

близких к пороговым. В-третьих, низкий предел обнаружения обеспечивает запас при работе с многокомпонентными пробами биологического происхождения, матрица которых может влиять на формирование специфических комплексов и генерацию регистрируемого сигнала. В таких ситуациях простое разбавление пробы значительно снижает влияние матрицы на получаемые результаты.

Существуют и исключения, когда для аналитической методики оптимален строго определенный предел обнаружения. Как правило, это присуще унифицированным методикам с фиксированным разведением пробы (автоматические анализаторы) или без разведения (полевые обследования), когда информация о достижении пороговой концентрации достаточна для дальнейших действий, например, для отбраковки коммерческих продуктов с превышением нормативных требований по уровню контаминант. Однако в большинстве случаев предельно низкий уровень выявляемых концентраций все же востребован.

Стремление ко все более низким пределам обнаружения влияет и на научные разработки. В ведущих журналах, специализирующихся в области биоаналитических методов, доминируют статьи, описывающие установление рекордно низких пределов обнаружения применительно к тому или иному практически востребованному аналиту. Такая гонка иногда негативно сказывается на качестве и значимости результатов разработок. Встречаются статьи, в которых предложенные изменения аналитической методики не сопровождаются значительными изменениями регистрируемого параметра и не должны были бы вызвать столь существенный сдвиг предела обнаружения, который, тем не менее, декларируется авторами без объяснения причин и не подтверждается в последующих публикациях.

В этой ситуации важно понимать, какие пределы обнаружения в принципе могут быть достигнуты при известных характеристиках компонентов иммуноаналитической системы – константах взаимодействия реагентов, соотношении между концентрацией образующегося иммунного комплекса и величиной генерируемого им сигнала. Эта информация позволяет научно обоснованно относиться к достигаемым пределам обнаружения, подразделяя их на потенциально возможные и нереалистичные. Более того, знания о том, какие факторы лимитируют снижение предела обнаружения, служат основой при выборе наиболее перспективных подходов к дальнейшему совершенствованию аналитических систем и корректного планирования их разработок.

Данный мини-обзор посвящен рассмотрению факторов, лимитирующих пределы обнаружения иммуноаналитических систем, и путей преодоления существующих ограничений.

ОСОБЕННОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАТОВ ИММУНОАНАЛИЗА

Иммуноаналитические методы основаны на применении антител или их производных в качестве рецепторных молекул. Способность антител связываться с высокой аффинностью с самыми различными соединениями (антигенами) обеспечивается генетической вариабельностью определенных участков этих молекул и осуществляемом в организмах животных отборе клонов продуцирующих антитела клеток при контакте с соответствующим антигеном (клонально-селекционная теория) [12], а также дополнительными процессами диверсификации антител в организме [13]. Разработан ряд протоколов, позволяющих получать *in vivo* или *in vitro* высокоспецифичные антитела [14–16]. Количество вариантов антител разной специфичности, которые могут быть наработаны этими методами, оценивается в десятки миллионов, а последующая генно-инженерная модификация антигенсвязывающих сайтов антител еще больше увеличивает их разнообразие. При этом, если ранние методики позволяли получать антитела лишь к биополимерам, то на сегодняшний день имеется множество антител, связывающихся с различными низкомолекулярными соединениями и даже с ионами металлов [17, 18], селективно распознающих близкие по структуре молекулы. В каталогах ведущих фирм представлены десятки тысяч препаратов антител к различным соединениям.

Иммуноаналитические разработки начинались с методик, в которых комплексообразование антиген–антитело регистрировалось без дополнительных реагентов, например, по формированию в растворе мутного преципитата или осаждению иммунного комплекса в виде наблюдаемого невооруженным глазом осадка. Однако величины пределов обнаружения для таких методик были весьма высокими, и их применение было оправдано лишь для немногих соединений с высоким содержанием в биопробах [19]. Для преодоления этого ограничения было предложено мечение иммунореагентов соединениями, выявляемыми в низких концентрациях. В качестве таких маркеров в разных разработках применяют изотопы, ферменты, флуорофоры [20]. Чтобы измерить количество образовавшихся иммунных комплексов, успешно используется иммобилизация реагентов на носитель и его отмывка после проведения иммунной реакции, удаляющая несвязавшиеся реагенты и компоненты пробы (гетерогенные схемы анализа). Существуют и безразделительные (гомогенные) схемы анализа, однако они требуют существенных изменений свойств маркера при

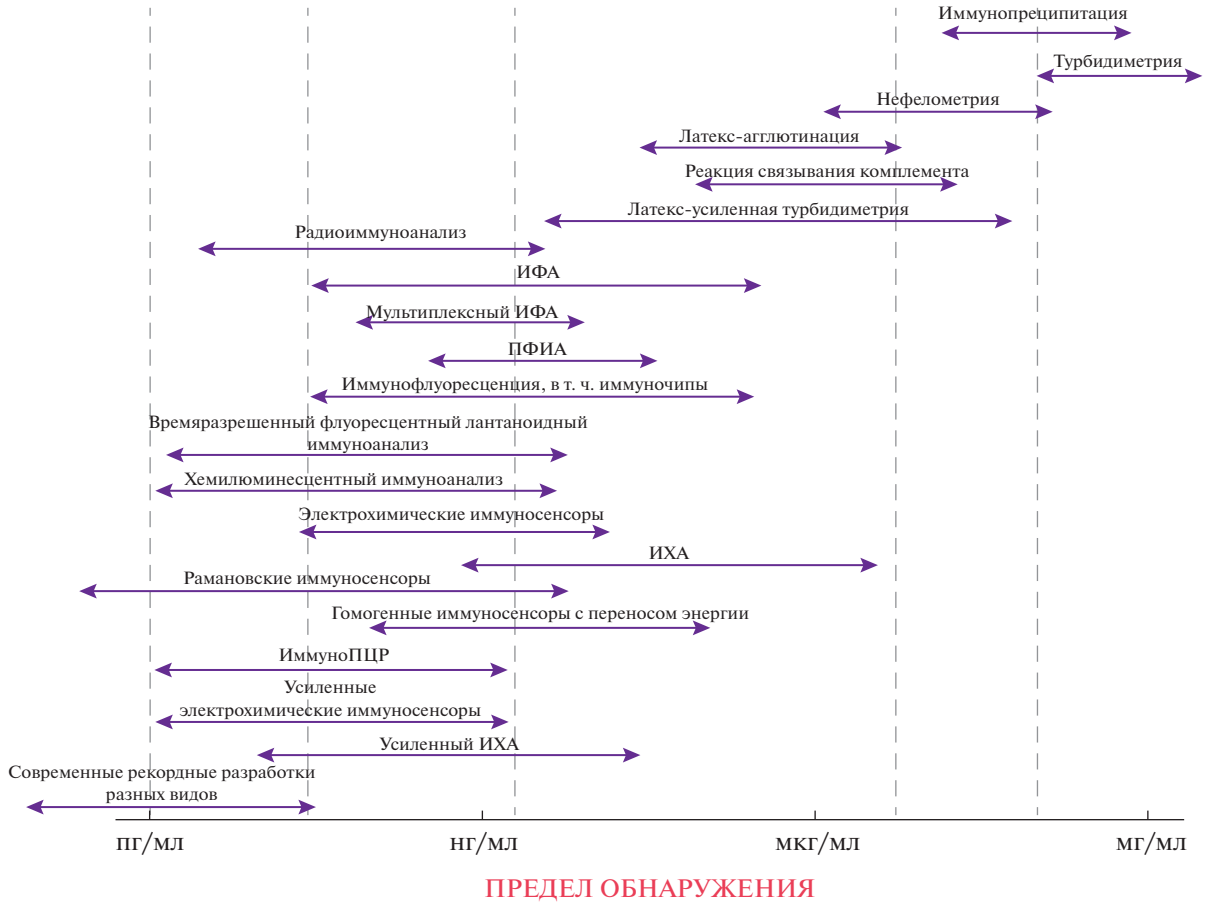

Рис. 1. Концентрации аналитов, определяемые с помощью различных иммуноаналитических методов (на основании данных [26, 27]). Расположение методов сверху вниз соответствует примерному хронологическому порядку их появления.

включении в иммунный комплекс и, как правило, более чувствительны к влиянию матрицы тестируемых проб [21]. При этом, если в начале разработок гомогенных методов иммуноанализа в основном предлагалось использовать модуляцию активности ферментного маркера в комплексе с антителами [22], то разрабатываемые сейчас методические решения преимущественно основаны на процессах переноса энергии между донором и акцептором, объединяемых в результате реакции антиген–антитело [23–25].

Рис. 1 схематично демонстрирует разнообразие иммуноаналитических методов и смещение новых разработок в область более низких определяемых концентраций. Отметим, что на сегодняшний день массовое практическое применение нашли лишь немногие из этих методов – иммуноферментный анализ с колориметрическим и люминесцентным детектированием, иммунохроматография и, для ряда низкомолекулярных аналитов, поляризационный флуоресцентный иммуноанализ. Для соединений, контролируемых в высоких концентрациях, по-прежнему применяют агглютинационные методы из-за их методической простоты. Радиоиммунные методы анализа, пережившие бум во второй половине прошлого века, сейчас используют все реже. Учитывая эту консервативность, следует понимать, что успех какой-то новой разработки по снижению предела обнаружения сам по себе не гарантирует ее последующей популярности как средства массовой диагностики. Для такого перевооружения аналитических лабораторий должно совпасть много факторов как научно-организационного (применимость для многих аналитов, создание приборной базы), так и социального характера.

Предложено большое число классификаций форматов иммунохимического анализа, основанных на отличиях по типу используемых маркеров, составу определяемых иммунных комплексов и последовательности их формирования [28, 29]. При рассмотрении вопросов о пределах обнаружения, достигаемых в разных форматах иммуноанализа, первоочередное значение имеет их разделение на односайтные (конкурентные) форматы, используемые при определении низкомолекулярных ан-

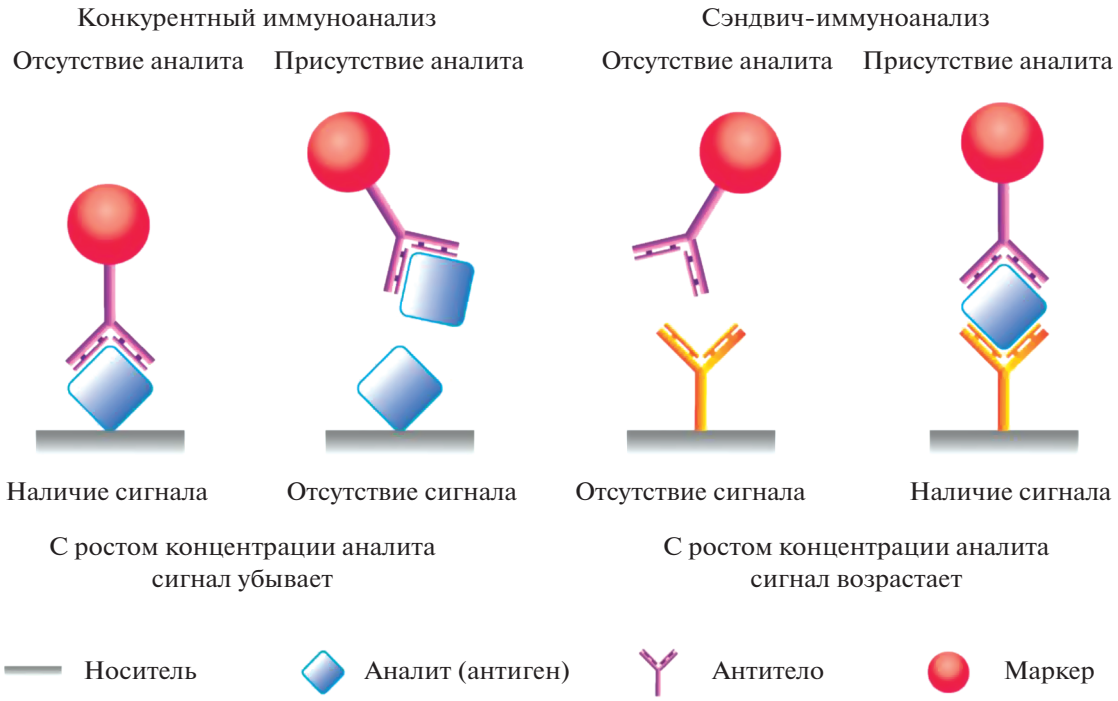

Рис. 2. Принципиальные схемы конкурентного и сэндвич-иммуноанализа.

тигенов с единственной антигенной детерминантой (сайтом связывания антител), и двухсайтные (сэндвич) форматы, применяемые для более крупных антигенов с несколькими детерминантами. Рис. 2 демонстрирует принципиальное отличие этих форматов, приводящее к разному ходу концентрационной зависимости аналитического сигнала (обеспечиваемого связыванием маркера с носителем).

В последние годы активно развиваются неконкурентные форматы иммуноанализа низкомолекулярных соединений. В таких системах преодолевается ряд ограничений конкурентных схем, однако их реализация требует наличия особых реагентов и далеко не для всех аналитов возможна [30, 31].

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОЦЕНКИ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ В ИММУНОАНАЛИЗЕ

В зависимости от способов введения метки и последовательности формирования детектируемых комплексов сэндвич- и конкурентные форматы анализа разделяются на множество подгрупп. Тем не менее можно рассмотреть простейшие взаимодействия, исключив из рассмотрения диффузионные ограничения и различия индивидуальных молекул в препаратах антигенов и антител. Для таких систем возможны общие алгебраические решения, определяющие зависимость регистрируемого сигнала от концентрации выявляемого соединения в пробе. Анализ этих математических описаний, проведенный Джексоном и Экинсом [32], позволил охарактеризовать градуировочные зависимости неконкурентного и конкурентного иммуноанализа, связь их параметров со свойствами антител. Развивая этот подход, Тейлор и соавт. [33] включили в рассмотрение реальные особенности вариации фонового сигнала и показали соответствие теоретических прогнозов экспериментальным данным. В соответствии с проведенными расчетами предел обнаружения иммуноанализа для конкурентных форматов определяется аффинностью антител и воспроизводимостью сигнала в отсутствие аналита (уравнение (1)), а для неконкурентных форматов – этими двумя параметрами, а также аффинностью взаимодействий реагентов и компонентов пробы в аналитической системе, приводящих к неспецифическому связыванию маркера (уравнение (2)):

$$\sigma_{\min,\,0} = \mathrm{CV}_0/K_\mathrm{a}\,, \qquad (1)$$

$$\sigma_{\min,\,0} = K_n\mathrm{CV}_0/K_\mathrm{a}\,, \qquad (2)$$

где $\sigma_{\min,\,0}$ – минимальная теоретически возможная концентрация, отклик для которой соответствует стандартному отклонению при нулевой концентрации аналита; CV_0 – коэффициент вариации отклика системы при нулевой концентрации аналита; K_a – равновесная константа связывания при образовании иммунного комплекса; K_n – средняя константа связывания при неспецифическом взаимодействии.

Учитывая, что хорошие для аналитического применения антитела характеризуются константами связывания с антигеном порядка 10^8–10^{10} $М^{-1}$, а рекордные антитела – до 10^{12} $М^{-1}$, предел обнаружения в конкурентном анализе низкомолекулярных (до 1 кДа) соединений может достигать пикомолярных концентраций, а фемтомолярные уровни должны подтверждаться крайне высокой аффинностью антител.

В случае сэндвич-анализа теоретические расчеты не устанавливают категорических запретов для чрезвычайно низких пределов обнаружения, однако неспецифические взаимодействия и чувствительность детектирования маркера лимитируют это снижение [34].

На сегодняшний день разработан теоретический аппарат, описывающий особенности взаимодействий реагентов в разных более сложных иммуноаналитических системах со своими особенностями локализации реагентов в пространстве, порядка их добавления и перемещения. Такие модели предложены, в частности, для радиоиммунного [35, 36], иммуноферментного [37–39] и иммунохроматографического [40–44] анализа, а также для других иммуноаналитических систем [45–53]. Недавние обзоры [29, 54] суммируют разнообразие используемых в этих моделях подходов. Хотя в ряде систем возникают дополнительные средства усиления сигнала, общие закономерности, сформулированные Джексоном и Экинсом, продолжают для них выполняться, но могут сопровождаться более сложными математическими описаниями требований к минимально возможным пределам обнаружения. Именно эти особенности и имеются в виду, когда в некоторых работах декларируется преодоление порога Джексона–Экинса [55, 56]. Радикальное изменение критериев для предела обнаружения становится возможным лишь при переходе от обычных концентрационных зависимостей аналитического сигнала к регистрации единичных иммунных взаимодействий (см. ниже).

ВОЗМОЖНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ФАКТОРЫ, ЛИМИТИРУЮЩИЕ ВЕЛИЧИНЫ ПРЕДЕЛОВ ОБНАРУЖЕНИЯ

С учетом изложенных выше общих закономерностей рассмотрим инструментарий, который может быть использован при разработке высокочувствительных иммуноаналитических систем. Детальное обсуждение крайне разнообразных конкретных работ значительно увеличило бы объем текста, нарушив концепцию мини-обзора. Мы ограничимся перечислением принципиальных методических решений, адресуя читателей к их детализации в указываемых публикациях, преимущественно обзорных.

Прежде всего, предлагаемая методика должна быть оптимизирована: определено сочетание ее параметров – концентраций реагентов, продолжительностей стадий, характеристик реакционной среды и др., которое обеспечивает минимальный предел обнаружения аналита при сохранении приемлемой точности количественного определения его концентрации [57, 58]. Большая часть публикуемых разработок по иммуноанализу включает такую оптимизацию как серию последовательных экспериментов с варьированием каждого из параметров. Однако влияние этих параметров на предел обнаружения может быть зависимым друг от друга, и корректный выбор оптимума требует более детальной многофакторной оптимизации. Соответствующий инструментарий аналитической химии успешно адаптирован и апробирован для иммуноанализа [59–61] и несомненно эффективен, несмотря на некоторую трудоемкость и сложность обработки данных. Отметим, что часть параметров (например, pH, ионная сила реакционной среды, концентрации детергентов) может быть выбрана в монопараметрических экспериментах, так как их оптимальные значения не зависят от других параметров. С учетом этого выбора многофакторную оптимизацию можно ограничить влияющими друг на друга концентрационными и временными параметрами.

Качество используемых в иммуноанализе антител, несомненно, имеет важное значение. Помимо скрининга коммерчески доступных и получаемых в лаборатории препаратов антител, изменение их связывающих свойств может быть достигнуто генетическим дизайном антиген-связывающих сайтов [62–64], а также методами клик-химии [65], с помощью которых можно ковалентно связывать молекулы в комплексах иммунореагентов [66]. Однако, как следует из рассмотренных выше закономерностей, далеко не всегда аффинность иммунного взаимодействия является фактором, лимитирующим снижение предела обнаружения. К тому же кинетическая константа ассоциации у разных антител к одному и тому же соединению близка, будучи обусловленной диффузионной подвижностью в растворе и площадями участков связывания на поверхностях реагирующих молекул. Отличия разных производных антител (Fab-фрагментов, наноантител) в этом отношении невелики, хотя такие производные востребованы в новых разработках благодаря другим своим преимуществам – меньшему размеру, стабильности, простоте модификации и пр. [67, 68]. Рост аффинности в таких ситуациях определяется, прежде всего, кинетическими константами диссоциации, а их вклад в количество иммунных комплексов проявляется лишь при продолжительных инкубациях. Большое значение имеет также соотношение аффинностей у нативных и модифицированных моле-

кул. В частности, в конкурентном формате иммуноанализа с мечением антигена более низкая аффинность меченого препарата по сравнению с нативным сдвигает рабочий диапазон и предел обнаружения в сторону более низких концентраций [69]. Еще один значимый фактор – би- и поливалентность молекул иммуноглобулинов, которая обеспечивает возможность образования множественных связей с поливалентным антигеном, но становится негативным фактором, когда моновалентный аналит конкурирует с поливалентным антигенным препаратом за связывание с антителами [70]. В таких ситуациях может быть оправдана замена полномерных молекул антител на их моновалентные фрагменты.

Критичным для обеспечения низкого предела обнаружения является достижение реакцией антиген–антитело химического равновесия, особенно в ситуациях, когда из-за тех или иных практических потребностей тестирование должно быть проведено за несколько минут. Диффузионно-обусловленные ограничения взаимодействий между иммобилизованным и находящимся в растворе иммунореагентом могут быть преодолены с использованием так называемых гомогенно-гетерогенных форматов анализа, в которых носитель с антителами вначале диспергирован в объеме, а после быстрой гомогенной реакции с антигеном осаждается и таким образом отделяется от непрореагировавших компонентов реакционной смеси. В качестве таких носителей могут использоваться водорастворимые полиэлектролиты (отделяемые добавлением противоионов), другие полимеры, а также магнитные частицы [71–73]. Дополнительный выигрыш при этом можно получить, если осажденные иммунные комплексы ресуспендируются в меньшем объеме по сравнению с исходным объемом тестируемой пробы. Помимо этого, для ускорения иммунной реакции предложено использовать ультразвук [74, 75], повышение мобильности молекул в растворе с помощью наномоторов [76–79]. Ряд перспективных результатов получен для микрофлюидных систем с концентрированием выявляемых иммунных комплексов в микроканалах [80, 81], в том числе в сочетании с центрифугированием [82].

Важно проведение аналитических реакций в условиях, когда используемые антитела сохраняют реакционную способность. Их химическая модификация и иммобилизация часто приводят к инактивации, что снижает степень связывания маркера и препятствует высокочувствительному определению образующихся иммунных комплексов. Для преодоления этого ограничения используют различные способы ориентированной иммобилизации, в том числе посредством взаимодействия антител с реагентами, распознающими удаленные от антиген-связывающих сайтов участки молекулы и тем самым максимально сохраняющие доступность этих сайтов для иммунного взаимодействия [83–85].

Еще один важный ресурс – использование в иммуноанализе маркеров, достоверно выявляемых в низких концентрациях. Разные варианты маркеров рассматривались на ранних этапах развития иммуноферментного анализа, но сейчас существующие разработки ограничены небольшим числом ферментов, наиболее широко используемыми из которых являются пероксидаза и щелочная фосфатаза. Однако продолжаются активные исследования по поиску наиболее эффективных субстратных растворов, прежде всего, для систем с люминесцентной регистрацией продукта, показавших существенные выигрыши в пределах обнаружения по сравнению с колориметрическими системами [86, 87]. В иммуноаналитических системах с электрохимической регистрацией сигнала активно применяются и другие ферменты – глюкозооксидаза, ацетилхолинэстераза и др.

Активно рассматриваются новые наночастицы – маркеры для различных иммуноаналитических систем (рис. 3). Варьирование химического состава (и соответственно спектральных характеристик), размеров, формы наночастиц позволяет значительно изменить величину сигнала, регистрируемого от единичного иммунного комплекса. Разнообразие разработок в этом направлении представлено в ряде обзоров [88–93]. Отметим, что возможности новой кандидатной наночастицы могут быть оценены ее простой и быстрой “паспортизацией” по физико-химическим параметрам, т.е. не требуют полного цикла экспериментов по разработке и характеристике иммуноаналитической системы [94].

Эффекты гигантского комбинационного рассеяния на поверхности наночастиц также обладают значительным потенциалом для снижения предела обнаружения [95–97]. Хотя реализованные на практике разработки часто уступают теоретическим ожиданиям, на сегодняшний день большая часть рекордных по пределам обнаружения иммуноаналитических систем с использованием наночастиц относится именно к таким маркерам. При снижении стоимости приборного обеспечения можно ожидать дальнейшего роста их конкурентного потенциала [98, 99].

Особый интерес представляют неоптические варианты регистрации наномаркеров – термометрия, магнитометрия и др. [100–103]. В таких системах можно обеспечить крайне низкий фоновый сигнал и, в полном соответствии с теоретическими предсказаниями, достоверно определять низкие концентрации аналитов. Отдельно отметим методики иммуноанализа с масс-спектрометрической регистрацией маркера, характеризующиеся весьма низкими пределами обнару-

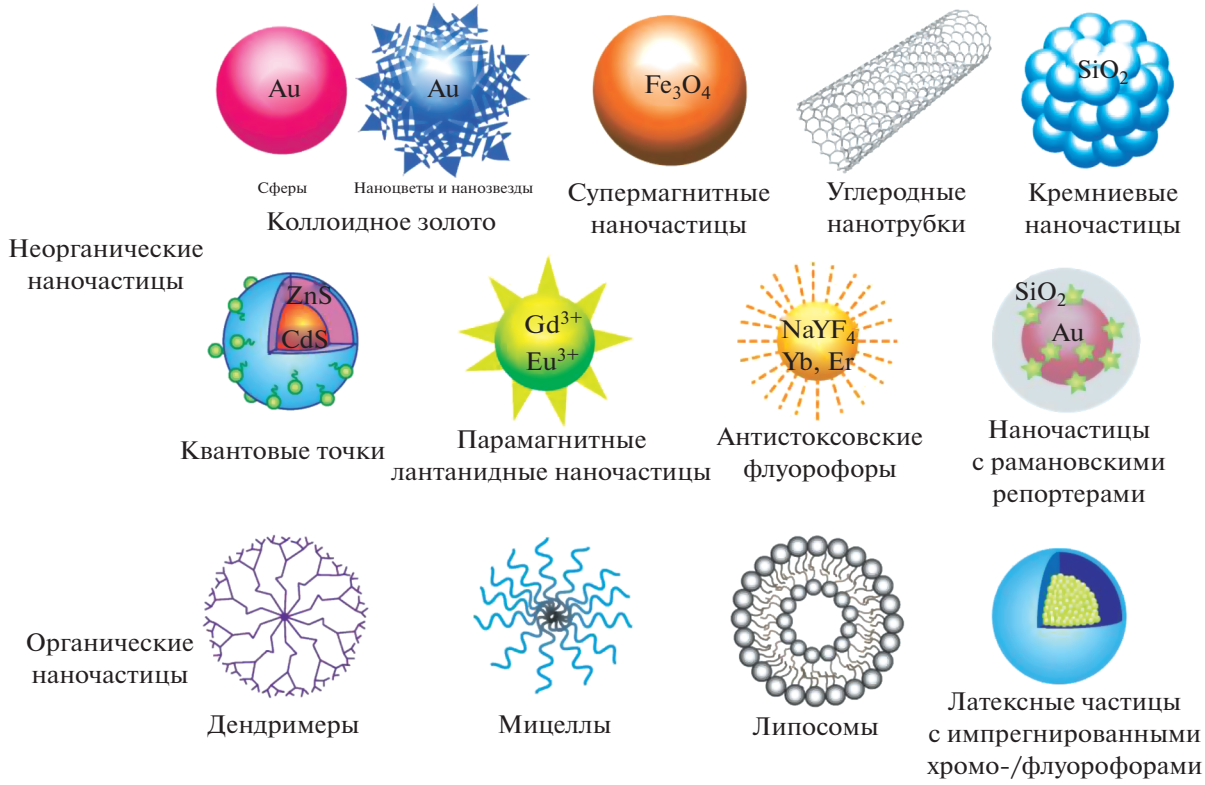

Рис. 3. Основные наночастицы, используемые в иммуноанализе.

жения, но требующие сложного и дорогостоящего приборного обеспечения [104].

Достоинством флуоресцентных маркеров – как органических, так и нанодисперсных – также является возможность выбора препаратов с длинами волн возбуждения и эмиссии, исключающими влияние компонентов пробы на регистрируемый сигнал. Низкий фон позволяет, увеличивая интенсивность возбуждающего света, наращивать отклик аналитической системы и достоверно определять низкие концентрации аналитов. Возможности флуоресцентных маркеров в иммуноанализе представлены в недавних обзорах [105–108].

Следующий класс перспективных направлений для снижения предела обнаружения в иммуноанализе – амплификационные методы, когда исходно связавшийся с иммунным комплексом единичный маркер генерирует или связывает значительное число регистрируемых молекул или частиц. Описан ряд вариантов такой амплификации [109–116]:

• высвобождение молекул маркера из общего носителя (например, липосомы);

• высвобождение с поверхности частицы многих независимо регистрируемых молекул-зондов;

• образование на основании одной связанной наночастицы агрегатов из десятков и сотен взаимодействующих с ней функционализированных наночастиц;

• наращивание наночастиц-маркеров восстановлением солей металлов на их поверхности;

• использование наночастиц-нанозимов, катализирующих трансформацию субстратов в определяемые продукты, и др.

Применение в качестве маркеров нанозимов – наночастиц металлов, обладающих каталитическими свойствами, – позволяет использовать их высокую толерантность к условиям среды, инактивируя каталитическую активность компонентов пробы и после этого регистрируя активность нанозима с крайне низким фоновым сигналом [117, 118].

В ряде разработок иммунохимические взаимодействия интегрируются с широко известными методами амплификации, используемыми в молекулярно-генетических разработках. Так, принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющей многократно удваивать выявляемую олигонуклеотидную цепочку посредством циклов ферментативного синтеза комплементарных последовательностей и их высвобождения при высокотемпературной обработке, может служить заключительным этапом иммунохимического анализа с включением в иммунный комплекс олигонуклеотидного маркера [119–122].

Таблица 1. Критерии оценки описаний иммуноаналитических систем

Разработка иммуноаналитической системы с низким пределом обнаружения имеет следующие шансы воспроизведения и дальнейшего применения:	
высокие, если:	низкие, если:
Ее преимущества подтверждены сравнением с серийным иммуноанализом, реализованным с использованием тех же иммунореагентов	Сравнение ограничивается ссылкой на публикацию предшественников
Количественные отличия нового подхода к генерации аналитического сигнала сопоставимы с отличиями физических свойств компонентов, используемых для этой генерации	Преимущества нового подхода обосновываются только качественным комментарием об отличии свойств используемых компонентов
Ожидаемые концентрации иммунореагентов в реакционной среде и константы их взаимодействия (ограниченные свойствами антител) позволяют ожидать формирование иммунных комплексов в количествах, достаточных для воспроизводимого отклика системы	При заявленном пределе обнаружения на объем проведения реакции приходятся единичные иммунные комплексы
Представлены экспериментальные данные по определению аналитов в концентрациях, близких к пределу обнаружения	Достижение предела обнаружения обосновывается исключительно расчетом по 3σ-критерию
Относительные стандартные отклонения на градуировочной кривой сопоставимы с погрешностями пипетирования (инжектирования) реагентов и резко не различаются для высоких и низких концентраций аналита	Заявленный предел обнаружения достигается благодаря резкому снижению относительных стандартных отклонений сигнала в области низких концентраций
Показано отсутствие влияния на специфическое взаимодействие основных компонентов проб для их реальных концентраций в биоматрицах	Изучение селективности взаимодействий сводится к тестированию чистых растворов аналита и других веществ в сопоставимых концентрациях
Подтверждена возможность тестирования неразбавленных или разбавленных в несколько раз биопроб	Апробация в биоматрицах ограничивается определением аналита при добавлении к пробе, разбавленной в десятки-сотни раз (что означает пропорционально худший предел обнаружения в расчете на исходный объем биопробы)
Для биопроб, используемых в качестве отрицательного контроля, отсутствие аналита в концентрациях вплоть до предела обнаружения разрабатываемого метода подтверждено альтернативным высокочувствительным методом	Отсутствие аналита в отрицательном контроле постулируется без данных об использованном для проверки методе и его пределе обнаружения

К сожалению, разработки, непосредственно направленные на минимизацию фонового связывания маркера в иммуноанализе, крайне разрознены и решения, предлагаемые для одних систем, часто оказываются непригодными для других. Поэтому универсальный используемый разработчиками методический аппарат сводится к немногим давно известным подходам, таким как применение детергентов. Учитывая критерий Джексона–Экинса, новые общие решения по снижению неспецифического сигнала могут внести существенный вклад в борьбу за низкие пределы обнаружения иммуноаналитических систем.

Как уже отмечалось, в последние годы наблюдается рост количества публикаций, описывающих новые методические решения в иммуноанализе и достигаемые с их помощью рекордно низкие пределы обнаружения. Полезно, по мнению авторов, сформулировать критерии, позволяющие оценить перспективы предлагаемого подхода, шансы получить сходные выигрыши при работе с другими аналитами и иммунореагентами. Соответствующие признаки суммированы в табл. 1. Надеемся, что эти критерии могут быть полезными и при планировании собственных экспериментов, способствовать усилению доказательной базы при представлении результатов исследований.

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ РЕШЕНИЯ В ИММУНОАНАЛИЗЕ, ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ

Детектирование единичных молекул можно рассматривать как крайний вариант амплификации сигнала, когда результатом одного взаимодействия становится существенное изменение свойств в макрообъеме. В принципе, решение таких задач хорошо известно физикам, на протяжении десятилетий успешно регистрирующим единичные заряженные частицы в камере Вильсона или пузырьковой камере – детекторе, заполненном переохлажденным перенасыщенным паром, в котором заряженная частица инициирует конденсацию водяных капель и треков из этих капель вдоль своего движения.

Данное сравнение наглядно демонстрирует два основных требования к детектору единичных молекул – трансформация единичного события на наноразмерном уровне в детектируемый сигнал и крайне низкая вероятность инициации такого же сигнала любыми другими компонентами пробы или реакционной среды. В биохимическом анализе нельзя достоверно говорить о выявлении единственной молекулы, так как наблюдаемый сигнал может быть вызван не ее связыванием, а каким-то из многих возможных неспецифических взаимодействий. Однако статистически достоверное отличие между интенсивностью сигнала при тестировании пробы и при эксперименте с объектом, в котором гарантировано отсутствие целевого аналита, дает основу для вывода об обнаружении целевого соединения (реально речь может идти как минимум о нескольких десятках молекул в охарактеризованном объеме пробы).

Существующее разнообразие разработок по детектированию методами иммуноанализа единичных молекул охарактеризовано в недавних обзорах [9, 123–130]. Отметим следующие основные направления таких разработок:

• генерация сигнала на сенсорной поверхности с множеством микроячеек, при котором связывания единичного маркера в ячейке достаточно для генерации в ней сигнала, регистрируемого обычно методом флуоресцентной микроскопии;

• изменение проницаемости мембраны с микропорами, которые блокируются рецепторными молекулами и открываются при их связывании с молекулами аналита;

• комплексообразование флуоресцентных наночастиц за счет иммунных взаимодействий, регистрируемое в капиллярных ячейках;

• изменение проводимости полевых транзисторов, вызываемое связыванием с единичными чувствительными участками нанометровых размеров;

• атомно-силовая регистрация единичных иммунных комплексов на поверхности, сканируемой с помощью микрощупов-кантеливеров, выявляющих перепады уровня на наноразмерном уровне, которые трансформируются в сдвиг луча в детекторе и таким образом регистрируются;

• фишинг единичных молекул антигенов на поверхности посредством ее сканирования кантеливерами с иммобилизованными рецепторными молекулами.

Некоторые методические решения для регистрации единичных молекул уже реализованы в серийно производимых приборах и их реагентном обеспечении – Single Molecule Array (Simoa™) фирмы “Quanterix”, Single Molecule Counting (SMC™) Erenna® фирмы “Millipore Merck”, Ion Torrent™ от “Thermo Fisher” и др.

ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВ РАЗВИТИЯ ИММУНОАНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Поскольку приведенное выше изложение было ориентировано в основном на демонстрацию разнообразия подходов к снижению пределов обнаружения в иммуноанализе, имеет смысл в заключение выделить наиболее активно развивающиеся разработки и практические задачи, для решения которых наиболее востребовано их применение.

Наибольшее число публикаций в ведущих журналах, рассматривающих иммуноаналитические разработки, посвящено: 1) новым маркерам, 2) новым схемам усиления сигнала с участием нескольких реагентов, 3) новым вариантам геометрии тест-систем и расположения последовательно взаимодействующих реагентов. Все эти направления предоставляют много возможностей предложить новую аналитическую систему и, при убедительной демонстрации ее преимуществ, расширить арсенал биометодов.

Какая практически значимая информация может быть получена с помощью новых высокочувствительных разработок в области иммуноанализа? Не претендуя на полноту перечня, отметим несколько таких задач в разных областях применения:

– совершенствование клинических методов диагностики заболеваний, требующих выявления маркеров в ультранизких концентрациях;

– простой внелабораторный контроль состояния здоровья с неинвазивным отбором биопроб. Тут наиболее востребованы быстрые тест-методы иммуноанализа;

– мониторинг воздуха и воды для оперативного выявления опасных соединений;

– быстрое одновременное определение многих аналитов в одной пробе малого объема.

Эффективное решение этих задач возможно лишь в сочетания с форматами иммунодиагностики, позволяющими определять низкие концентрации аналитов, поэтому рассмотренные в обзоре разработки представляются крайне востребованными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00370).

Авторы благодарят Н.А. Таранову за подготовку иллюстративного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wild D.* The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4th Ed. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Science, 2013. 1036 p.
2. *O'Kennedy R., Murphy C.* Immunoassays: Development, Applications and Future Trends. Singapore, Singapore: Jenny Stanford Publishing, 2017. 470 p.
3. *Vashist S.K., Luong J.H.T.* Handbook of Immunoassay Technologies: Approaches, Performances, and Applications. Amsterdam, the Netherlands: Academic Press, 2018. 478 p.
4. *Loock H.P., Wentzell P.D.* Detection limits of chemical sensors: Applications and misapplications // Sens. Actuators B: Chem. 2012. V. 173. P. 157.
5. *Masson J.F.* Consideration of sample matrix effects and "biological" noise in optimizing the limit of detection of biosensors // ACS Sensors. 2020. V. 5. № 11. P. 3290.
6. *Molina-Fernandez I., Leuermann J., Ortega-Monux A., Wanguemert-Perez J.G., Halir R.* Fundamental limit of detection of photonic biosensors with coherent phase read-out // Optics Express. 2019. V. 27. № 9. P. 12616.
7. *Ju H.* Signal amplification for highly sensitive immunosensing // J. Anal. Test. 2017. V. 1. № 1. P. 7.
8. *Wu Y.F., Tilley R.D., Gooding J.J.* Challenges and solutions in developing ultrasensitive biosensors // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. № 3. P. 1162.
9. *Momenbeitollahi N., Cloet T., Li H.Y.* Pushing the detection limits: strategies towards highly sensitive optical-based protein detection // Anal. Bioanal. Chem. 2021. V. 413. № 24. P. 5995.
10. *Shirshahi V., Liu G.* Enhancing the analytical performance of paper lateral flow assays: From chemistry to engineering // Trends Anal. Chem. 2021. V. 136. Article 116200.
11. *Van-Thuan N., Song S., Park S., Joo C.* Recent advances in high-sensitivity detection methods for paper-based lateral-flow assay // Biosens. Bioelectron. 2020. V. 152. Article 112015.
12. *Ribatti D.* Sir Frank Macfarlane Burnet and the clonal selection theory of antibody formation // Clin. Exper. Med. 2009. V. 9. № 4. P. 253.
13. *Kanyavuz A., Marey-Jarossay A., Lacroix-Desmazes S., Dimitrov J.D.* Breaking the law: Unconventional strategies for antibody diversification // Nature Rev. Immunol. 2019. V. 19. № 6. P. 355.
14. *Leenaars M., Hendriksen C.F.M.* Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies evaluation and recommendations // ILAR J. 2005. V. 46. № 3. P. 269.
15. *Howard G.C., Kaser M.R.* Making and Using Antibodies: A Practical Handbook. 2nd Ed. Boca Raton, USA: Press-Taylor & Francis Group, 2014. 427 p.
16. *Lee Y.J., Jeong K.J.* Challenges to production of antibodies in bacteria and yeast // J. Biosci. Bioeng. 2015. V. 120. № 5. P. 483.
17. *Li P.W., Zhang W., Zhang Z.W., Zhang Q., Chen Z.Y.* Fundamentals of hapten-protein conjugate synthesis to obtain high-quality antibodies for analysis of food and environmental contaminants // Curr. Org. Chem. 2017. V. 21. № 26. P. 2606.
18. *Wang Y., Zhang C., Liu F.* Antibody developments for metal ions and their applications // Food Agric. Immunol. 2020. V. 31. № 1. P. 1079.
19. *Firestone G.L., Winguth S.D.* Immunoprecipitation of proteins // Methods Enzymol. 1990. V. 182. P. 688.
20. *Дзантиев Б.Б., Жердев А.В.* Иммуноаналитические методы / Биохимические методы анализа / Под ред. Дзантиева Б.Б. М.: Наука, 2010. С. 303.
21. *Dinis-Oliveira R.J.* Heterogeneous and homogeneous immunoassays for drug analysis // Bioanalysis. 2014. V. 6. № 21. P. 2877.
22. *Wu A.H.B.* A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 369. № 2. P. 119.
23. *Takkinen K., Zvirbliene A.* Recent advances in homogenous immunoassays based on resonance energy transfer // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 55. P. 16.
24. *Dong J., Ueda H.* Recent advances in Quenchbody, a fluorescent immunosensor // Sensors. 2021. V. 21. № 4. Article 1223.
25. *Eangoor P., Das S., Pucc V.* Evaluation of homogeneous proximity immunoassays for preclinical bioanalysis // Bioanalysis. 2020. V. 12. № 14. P. 1757.
26. Immunoassays ELISA & CLIA. Antrim, UK: Fortress Diagnostics. 2020. https://www.fortressdiagnostics.com/news/2020/march/extensive-range-of-high-quality-immunoassays (21.11.2021).
27. *Dzantiev B.B., Urusov A.E., Zherdev A.V.* Modern techniques of immunochemical analysis: Integration of sensitivity and rapidity // Biotechnol. Acta. 2013. V. 6. № 4. P. 94.
28. *Miyai K.* Classification of immunoassay / Principles and Practice of Immunoassay / Eds. Price C.P., Newman D.J. London: Palgrave Macmillan, 1991. P. 246.
29. *Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* Математическое моделирование биоаналитических систем // Успехи биол. химии. 2017. Т. 57. С. 385. (*Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Mathematical modeling of bioassays // Biochemistry (Moscow). 2017. V. 82. № 13. P. 1744.)
30. *Liu A.P., Anfossi L., Shen L. Li C, Wang X.H.* Noncompetitive immunoassay for low-molecular-weight contaminant detection in food, feed and agricultural products: A mini-review // Trends Food Sci. Technol. 2018. V. 71. P. 181.
31. *Li Y., Zhang G., Mao X., Yang S.P., De Ruyck K., Wu Y.N.* High sensitivity immunoassays for small molecule compounds detection – Novel noncompetitive

immunoassay designs // Trends Anal. Chem. 2018. V. 103. P. 198.

32. *Jackson T.M., Ekins R.P.* Theoretical limitations on immunoassay sensitivity: Current practice and potential advantages of fluorescent Eu^{3+} chelates as non-r dioisotopic tracers // J. Immunol. Methods. 1986. V. 87. P. 13.
33. *Taylor J., Picelli G., Harrison D.J.* An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays // Electrophoresis. 2001. V. 22. P. 3699.
34. *Woolley C.F., Hayes M.A., Mahanti P., Gilman S.D., Taylor T.* Theoretical limitations of quantification for noncompetitive sandwich immunoassays // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 28. P. 8605.
35. *Rodbard D., Feldman Y.* Kinetics of 2-site immunoradiometric (sandwich) assays. 1. Mathematical models for simulation, optimization, and curve fitting // Immunochemistry. 1978. V. 15. № 2. P. 71.
36. *Rodbard D., Feldman Y., Jaffe M.L., Miles L.E.* Kinetics of two-site immunoradiometric ("sandwich") assays. II. Studies on the nature of the "high-dose hook effect" // Immunochemistry. 1978. V. 15. № 2. P. 77.
37. *Merrill S.J.* Computational models in immunological methods: An historical review // J. Immunol. Methods. 1998. V. 216. № 1–2. P. 69.
38. *Hayashi Y., Matsuda R., Maitani T., Imai, K., Nishimura W., Ito K., Maeda M.* Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA // Anal. Chem. 2004. V. 76. № 5. P. 1295.
39. *Choi D. H., Katakura Y., Matsuda R., Hayashi Y., Hirobe M., Goda Y., Ninomiya K., Shioya S.* Validation of a method for predicting the precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA // Anal. Sci. 2007. V. 23. № 2. P. 215.
40. *Qian S.Z., Bau H.H.* A mathematical model of lateral flow bioreactions applied to sandwich assays // Anal. Biochem. 2003. V. 322. № 1. P. 89.
41. *Qian S.Z, Bau H.H.* Analysis of lateral flow biodetectors: Competitive format // Anal. Biochem. 2004. V. 326. № 2. P. 211.
42. *Liu Z., He X., Li A., Qu Z., 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. № 18. P. 5394.
43. *Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Byzova N.A., Zvereva E.A., Bartosh A.V., Dzantiev B.B.* Mathematical modeling of immunochromatographic test systems in a competitive format: Analytical and numerical approaches // Biochem. Eng. J. 2020. V. 164. Article 107763.
44. *Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Mathematical model of serodiagnostic immunochromatographic assay // Anal. Chem. 2017. V. 89. № 8. P. 4419.
45. *Worsfold P.J., Hughes A.* A model immunoassay using automated flow-injection analysis // Analyst. 1984. V. 109. P. 339.
46. *Pribyl M., Snita D., Hasal P., Marek M.* Modeling of electric-field driven transport processes in microdevices for immunoassay // Chem. Eng. J. 2004. V. 101. № 1–3. P. 303.
47. *Zuber E., Rosso L., Darbouret B., Socquet F., Mathis G., Flandrois J.P.* A descriptive model for the kinetics of a homogeneous fluorometric immunoassay // J. Immunoassay. 1997. V. 18. № 1. P. 21.
48. *Naruse M., Morishita M., Onodera T., Toko K., Hayashi Y.* Modeling of detection limit for competitive immunoassay using surface plasmon resonance sensor // Sensors Materials. 2016. V. 28. № 3. P. 219.
49. *Taylor J., Picelli G., Harrison D.J.* An evaluation of the detection limits possible for competitive capillary electrophoretic immunoassays // Electrophoresis. 2001. V. 22. № 17. P. 3699.
50. *Roy P., Cherng-Wen D.* Microfluidic competition assay via equilibrium binding // Sens. Actuators B: Chem. 2009. V. 139. № 2. P. 682.
51. *Wu D., Voldman J.* An integrated model for bead-based immunoassays // Biosens. Bioelectron. 2020. V. 154. Article 112070.
52. *Yanagisawa N., Dutta D.* Microfluidic enzyme-linked immunosorbent assay in a region of finite length // Anal. Chim. Acta. 2014. V. 817. P. 28.
53. *Rafat N., Satoh P., Barton S.C., Worden R.M.* Integrated experimental and theoretical studies on an electrochemical immunosensor // Biosensors. 2020. V. 10. № 10. Article 144.
54. *Gasperino D., Baughman T., Hsieh H.V., Bell D., Weigl B.H.* Improving lateral flow assay performance using computational modeling // Ann. Rev. Anal. Chem. 2018. V. 11. № 11. P. 219.
55. *Brown E.N., McDermott T.J., Bloch K.J., McCollom A.D.* Defining the smallest analyte concentration an immunoassay can measure // Clin. Chem. 1996. V. 42. P. 893.
56. *Ekins R., Kelso D.* Single- molecule ELISA // Clin. Chem. 2011. V. 57. № 3. P. 372.
57. *Hsieh H.V., Dantzler J.L., Weigl B.H.* / Analytical tools to improve optimization procedures for lateral flow assays // Diagnostics. 2017. V. 7. № 2. Article 29.
58. *Bishop J.D., Hsieh H.V., Gasperino D.J., Weigl B.H.* Sensitivity enhancement in lateral flow assays: A systems perspective // Lab Chip. 2019. V. 19. № 15. P. 2486.
59. *Jeney C., Dobay O., Lengyel A., Adam E., Nasz I.* Taguchi optimisation of ELISA procedures // J. Immunol. Methods. 1999. V. 223. № 2. P. 137.
60. *Luo W., Pla-Roca M., Juncker D.* Taguchi design-based optimization of sandwich immunoassay microarrays for detecting breast cancer biomarkers // Anal. Chem. 2011. V. 83. № 14. P. 5767.
61. *Joelsson D., Moravec P., Troutman M., Pigeon J., DePhillips P.* Optimizing ELISAs for precision and robustness using laboratory automation and statistical design of experiments // J. Immunol. Methods. 2018. V. 337. P. 35.
62. *Zhao J., Nussinov R., Wu W.-J., Ma B.Y.* In silico methods in antibody design // Antibodies. 2018. V. 7. № 3. Article 22.
63. *Peltomaa R., Barderas R., Benito-Pena E., Moreno-Bondi M.C.* Recombinant antibodies and their use for food immunoanalysis // Anal. Bioanal. Chem. 2021 (online publication). https://doi.org/10.1007/s00216-021-03619-7

64. *Tiller K.E., Tessier P.M.* Advances in antibody design // Ann. Rev. Biomed. Eng. 2015. V. 17. P. 191.

65. *Wang P., Xue T.X., Sheng A.Z., Cheng L.F., Zhang J.* Application of chemoselective ligation in biosensing // Crit. Rev. Anal. Chem. (online publication). https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1791044

66. *Sadiki A., Kercher E.M., Lu H., Lang R.T., Spring B.Q., Zhou Z.S.* Site-specific bioconjugation and convergent click chemistry enhances antibody-chromophore conjugate binding efficiency(dagger) // Photochem. Photobiol. 2020. V. 96. № 3. P. 596.

67. *Bastos-Soares E.A., Sousa R.M.O., Gomez A.F., Alfonso J., Kayano A.M., Zanchi F.B., Funes-Huacca M.E., Stabeli R.G., Soares A.M., Pereira S.S., Fernandes C.F.C.* Single domain antibodies in the development of immunosensors for diagnostics // Int. J. Biol. Macromol. 2020. V. 165. P. 2244.

68. *Bever C.S., Dong J.-X., Vasylieva N., Barnych B., Cui Y.L., Xu Z.L., Hammock B.D., Gee S.J.* VHH antibodies: Emerging reagents for the analysis of environmental chemicals // Anal. Bioanal. Chem. 2016. V. 408. № 22. P. 5985.

69. *Xu Z.L., Shen Y.D., Beier R.C., Yang J.Y., Lei H.T., Wang H., Sun Y.M.* Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants // Anal. Chim. Acta. 2009. V. 647. P. 125.

70. *Winzor D.J.* Allowance for antibody bivalence in the characterization of interactions by ELISA // J. Mol. Recogn. 2011. V. 24. № 2. P. 139.

71. *Dzantiev B.B., Zherdev A.V., Yazynina E.V.* Application of water-soluble polymers and their complexes for immunoanalytical purposes / Smart Polymers for Bioseparation and Bioprocessing / Eds. Mattiasson B., Galaev I.Yu. London–N.Y.: Taylor & Francis, 2002. P. 207.

72. *Rocha-Santos T.A.P.* Sensors and biosensors based on magnetic nanoparticles // Trends Anal. Chem. 2014. V. 62. P. 28.

73. *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. (*Urusov A.E., Petrakova A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Application of magnetic nanoparticles in immunoassay // Nanotechnologies in Russia. 2017. V. 12. № 9–10. P. 471.)

74. *Kuznetsova L.A., Coakley W.* Applications of ultrasound streaming and radiation force in biosensors // Biosens. Bioelectron. 2007. V. 22. № 8. P. 1567.

75. *Wiklund M., Hertz H.M.* Ultrasonic enhancement of bead-based bioaffinity assays // Lab. Chip. 2006. V. 6. № 10. P. 1279.

76. *Pacheco M., Angel Lopez M., Jurado-Sanchez B., Escarpa A.* Self-propelled micromachines for analytical sensing: A critical review // Anal. Bioanal. Chem. 2019. V. 411. № 25. P. 6561.

77. *Jurado-Sanchez B.* Nanoscale biosensors based on self-propelled objects // Biosensors. 2018. V. 8. № 3. Article 59.

78. *Wang J.* Self-propelled affinity biosensors: Moving the receptor around the sample // Biosens. Bioelectron. 2016. V. 76. P. 234.

79. *Ye H., Wang Y., Xu D.D., Liu X.J., Liu S.M., Ma X.* Design and fabrication of micro/nano-motors for environmental and sensing applications // Appl. Mater. Today. 2021. V. 23. Article 101007.

80. *Al Mughairy B., Al-Lawati H.A.J.* Recent analytical advancements in microfluidics using chemiluminescence detection systems for food analysis // Trends Anal. Chem. 2020. V. 124. Article 115802.

81. *Shi Y.X., Ye P., Yang K.J., Meng J., Guo J.C., Pan Z.X., Bayin Q.G., Zhao W.H.* Application of microfluidics in immunoassay: Recent advancements // J. Healthc. Eng. 2021. V. 2021. Article 2959843.

82. *Shi Y.X., Ye P., Yang K.J., Meng J., Guo J.C., Pan Z.X., Zhao W.H., Guo J.H.* Application of centrifugal microfluidics in immunoassay, biochemical analysis and molecular diagnosis // Analyst. 2021. V. 146. № 19. P. 5800.

83. *Lu B., Smyth M.R., O'Kennedy R.* Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors // Analyst. 1996. V. 121. № 3. P. R29.

84. *Crivianu-Gaita V., Thompson M.* Immobilization of Fab' fragments onto substrate surfaces: A survey of methods and applications // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 70. P. 167.

85. *Iijima M., Kuroda S.* Scaffolds for oriented and close-packed immobilization of immunoglobulins // Biosens. Bioelectron. 2017. V. 89. № 2. P. 810.

86. *Zhao L., Sun L., Chu X.* Chemiluminescence immunoassay // Trends Anal. Chem. 2009. V. 28. № 4. P. 404.

87. *Xiao Q., Xu C.* Research progress on chemiluminescence immunoassay combined with novel technologies // Trends Anal. Chem. 2020. V. 124. Article 115780.

88. *Gao Y., Zhou Y., Chandrawati R.* Metal and metal oxide nanoparticles to enhance the performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) // ACS Appl. Nano Mater. 2020. V. 3. № 1. P. 1.

89. *Huang Y., Xu T.L., Wang W.O., Wen Y.Q., Li K., Qian L.S., Zhang X.J., Liu G.D.* Lateral flow biosensors based on the use of micro- and nanomaterials: A review on recent developments // Microchim. Acta. 2020. V. 187. № 1. Article 70.

90. *Quesada-Gonzalez D., Merkoci A.* Nanoparticle-based lateral flow biosensors // Biosens. Bioelectron. 2015. V. 73. P. 47.

91. *Mohamad A., Teo H., Keasberry N.A., Ahmed M.U.* Recent developments in colorimetric immunoassays using nanozymes and plasmonic nanoparticles // Crit. Rev. Biotechnol. 2019. V. 39. № 1. P. 50.

92. *Welch E.C., Powell J.M., Clevinger T.B., Fairman A.E., Shukla A.* Advances in biosensors and diagnostic technologies using nanostructures and nanomaterials // Adv. Funct. Mater. 2021. V. 31. № 44. Article 2104126.

93. *Pirsaheb M., Mohammadi S., Salimi A.* Current advances of carbon dots based biosensors for tumor marker detection, cancer cells analysis and bioimaging // Trends Anal. Chem. 2019. V. 115. P. 83.

94. *Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Ways to reach lower detection limits in lateral flow immunoassays. Ch. 2 / Rapid Test – Advances in Design, Format and Diagnostic

Applications / Ed. Anfossi L. London: InTechOpen, 2018. P. 9.

95. *Smolsky J., Kaur S., Hayashi C., Batra S.K., Krasnoslobodtsev A.V.* Surface-enhanced Raman scattering-based immunoassay technologies for detection of disease biomarkers // Biosensors. 2017. V. 7. № 1. Article 7.
96. *Wang Z.Y., Zong S.F., Wu L., Zhu D., Cui Y.P.* SERS-activated platforms for immunoassay: Probes, encoding methods, and applications // Chem. Rev. 2017. V. 117. № 12. P. 7910.
97. *Khlebtsov B., Khlebtsov N.* Surface-enhanced Raman scattering-based lateral-flow immunoassay // Nanomaterials. 2020. V. 10. № 11. Article 2228.
98. *Wang C., Liu M., Wang Z.F., Li S., Deng Y., He N.Y.* Point-of-care diagnostics for infectious diseases: From methods to devices // Nano Today. 2021. V. 37. Article 101092.
99. *Chen H., Das A., Bi L., Choi N., Moon J.I., Wu Y., Park S., Choo J.* Recent advances in surface-enhanced Raman scattering-based microdevices for point-of-care diagnosis of viruses and bacteria // Nanoscale. 2020. V. 12. № 42. P. 21560.
100. *Kavetskyy T., Alipour M., Smutok O., Mushynska O., Kiv A., Fink D., Farshchi F., Ahmadian E., Hasanzadeh M.* Magneto-immunoassay of cancer biomarkers: Recent progress and challenges in biomedical analysis // Microchem. J. 2021. V. 167. Article 106320.
101. *Gloag L., Mehdipour M., Chen D.F., Tilley R.D., Gooding J.J.* Advances in the application of magnetic nanoparticles for sensing // Adv. Mater. 2019. V. 31. № 48. P. 4819.
102. *Qie Z.W., Ning B.A., Liu M., Bai J.L., Peng Y., Song N., Lv Z.Q., Wang Y., Sun S.M., Su X., Zhang Y.H., Gao Z.X.* Fast detection of atrazine in corn using thermometric biosensors // Analyst. 2013. V. 138. № 17. P. 5151.
103. *Zhang Y., Yang H., Zhou Z.G., Huang K., Yang S.P., Han G.* Recent advances on magnetic relaxation switching assay-based nanosensors // Bioconjug. Chem. 2017. V. 28. № 4. P. 869.
104. *Stevens K.G., Pukala T.L.* Conjugating immunoassays to mass spectrometry: Solutions to contemporary challenges in clinical diagnostics // Trends Anal. Chem. 2020. V. 132. Article 116064.
105. *Aranda P.R., Messina G.A., Bertolino F.A., Pereira S.V., Baldo M.A.F., Raba J.* Nanomaterials in fluorescent laser-based immunosensors: Review and applications // Microchem. J. 2018. V. 141. P. 308.
106. *Chang X.-H., Zhang J., Wu L.-H., Peng Y.K., Yang X.Y., Li X.L., Ma A.J., Ma J.C., Chen G.Q.* Research progress of near-infrared fluorescence immunoassay // Micromachines. 2019. V. 10. № 6. Article 422.
107. *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 // J. Mater. Chem. 2017. V. 5. № 26. P. 5079.
108. *Абрамова А.М., Горячева О.А., Дрозд Д.Д., Новикова А.С., Пономарева Т.С., Строкин П.Д., Горячева И.Ю.* Люминесцентные полупроводниковые квантовые точки в химическом анализе // Журн. аналит. хим. 2021. Т. 76. № 3. С. 195. (*Abramova A.M., Goryacheva O.A., Drozd D.D., Novikova A.S., Ponomareva T.S., Strokin P.D., Goryacheva I.Y.* Luminescence semiconductor quantum dots in chemical analysis // J. Anal. Chem. 2021. V. 76. № 3. P. 273.)
109. *Fenzl C., Hirsch T., Baeumner A.J.* Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications // Trends Anal. Chem. 2016. V. 79. P. 306.
110. *Edwards K.A., Bolduc O.R., Baeumner A.J.* Miniaturized bioanalytical systems: Enhanced performance through liposomes // Curr. Opin. Chem. Biol. 2012. V. 16. № 3–4. P. 444.
111. *Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б.* Способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. 2021. Т. 57. № 2. С. 107. (*Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B.* Methods for increasing sensitivity of immunochromatographic test systems with colorimetric detection (review) // Appl. Biochem. Microbiol. 2021. V. 57. № 2. P. 143.)
112. *Wang Y.S., Jin M.J., Chen G., Cui X.Y., Zhang Y.D., Li M.J., Liao Y., Zhang X.Y., Qin G.X., Yan F.Y., Abd El-Aty A.M., Wang J.* Bio-barcode detection technology and its research applications: A review // J. Adv. Res. 2019. V. 20. P. 23.
113. *Di Nardo F., Chiarello M., Cavalera S., Baggiani C., Anfossi L.* Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: Trends, challenges and future perspectives // Sensors. 2021. V. 21. № 15. Article 5185.
114. *Yang H., Xu W., Zhou Y.* Signal amplification in immunoassays by using noble metal nanoparticles: A review // Microchim. Acta. 2019. V. 186. № 12. Article 859.
115. *Xiong Y., Leng Y.K., Li X.M., Huang X.L., Xiong Y.H,* Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples // Trends Anal. Chem. 2020. V. 126. Article 115861.
116. *Calabria D., Calabretta M.M., Zangheri M., Marchegiani E., Trozzi I., Guardigli M., Michelini E., Di Nardo F., Anfossi L., Baggiani C., Mirasoli M.* Recent advancements in enzyme-based lateral flow immunoassays // Sensors. 2021. V. 21. № 10. Article 3358.
117. *Niu X.H., Cheng N., Ruan X.F., Du D., Lin Y.H.* Review-nanozyme-based immunosensors and immunoassays: Recent developments and future trends // J. Electrochem. Soc. 2019. V. 167. № 1. Article 037508.
118. *Wang Q.Q., Wei H., Zhang Z.Q., Wang E.K., Dong S.J.* Nanozyme: An emerging alternative to natural enzyme for biosensing and immunoassay // Trends Anal. Chem. 2018. V. 105. P. 218.
119. *Spengler M., Adler M., Niemeyer C.M.* Highly sensitive ligand-binding assays in pre-clinical and clinical applications: Immuno-PCR and other emerging techniques // Analyst. 2015. V. 140. № 18. P. 6175.
120. *Рязанцев Д.Ю., Воронина Д.В., Завриев С.К.* Иммуно-ПЦР: достижения и перспективы // Успехи биол. химии. 2016. Т. 56. С. 377. (*Ryazantsev D.Y., Voronina D.V., Zavriev S.K.* Immuno-PCR: Achievements and perspectives // Biochemistry (Moscow). 2016. V. 81. № 13. P. 1754.)

121. *Dahiya B., Mehta P.K.* Detection of potential biomarkers associated with outrageous diseases and environmental pollutants by nanoparticle-based immuno-PCR assays // Anal. Biochem. 2019. V. 587. Article 113444.

122. *Sang P.T., Hu Z.G., Cheng Y.L., Yu H., Xie Y.F., Yao W.R., Guo Y.H., Qian H.* Nucleic acid amplification techniques in immunoassay: An integrated approach with hybrid performance // J. Agric. Food Chem. 2021. V. 69. № 21. P. 5783.

123. *Gooding J.J., Gaus K.A.* Single-molecule sensors: Challenges and opportunities for quantitative analysis // Angewandte Chemie – Int. Ed. 2016. V. 55. № 38. P. 11354.

124. *Wang J.J., Yang J., Ying Y.L., Long Y.T.* Nanopore-based confined spaces for single-molecular analysis // Chem. Asian J. 2019. V. 14. № 3. P. 389.

125. *Pleshakova T.O., Bukharina N.S., Archakov A.I., Ivanov Y.D.* Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 4. Article 1142.

126. *Li M., Xi N., Wang Y., Liu L.* Advances in atomic force microscopy for single-cell analysis // Nano Res. 2019. V. 12. № 4. P. 703.

127. *Farka Z., Mickert M.J., Pastucha M., Mikusova Z., Skladal P., Gorris H.H.* Advances in optical single-molecule detection: En route to supersensitive bioaffinity assays // Angewandte Chemie – Int. Ed. 2020. V. 59. № 27. P. 10746.

128. *Armstrong R.E., Horacek M.Z.* Plasmonic assemblies for real-time single-molecule biosensing // Small. 2020. V. 16. № 52. Article 2003934.

129. *Wu Y., Bennett D., Tilley R.D., Gooding J.J.* How nanoparticles transform single molecule measurements into quantitative sensors // Adv. Mater. 2020. V. 32. № 18. Article 1904339.

130. *Macchia E., Manoli K., Di Franco C., Scamarcio G., Torsi L.* New trends in single-molecule bioanalytical detection // Anal. Bioanal. Chem. 2020. V. 412. P. 5005.