

РАЗРАБОТКА МОДЕЛЬНОГО ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННОГО АНАЛИЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОНЬЮГАТА НА ОСНОВЕ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА

Кропанева М.Д., Храмцов П.В., Бочкова М.С., Раев М.Б.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Резюме. Иммунофильтрационный формат диагностической системы для аналитического тестирования может стать альтернативой иммунохроматографическим аранжировкам тест-систем. Ввиду особенностей процедуры иммунофильтрационного анализа, его преимущества по сравнению с наиболее популярным форматом экспресс-тестов, иммунохроматографией, состоят в большей чувствительности, а также отсутствии хук-эффекта. В работе представлены данные по разработке иммунофильтрационного анализа для определения антител против S-белка коронавируса COVID-19. Целью исследования явилась оптимизация условий для модельного иммуноанализа в формате иммунофильтрации с использованием диагностических реагентов на основе пероксидазы хрена.

В качестве положительных сывороток в работе использовали остаточные образцы сыворотки крови пациентов «красной» зоны, с верифицированным диагнозом новой коронавирусной инфекции, в качестве отрицательных образцов были использованы сыворотки крови, полученные до 2019 года. Процедуру иммунофильтрационного анализа осуществляли с применением пула отрицательных и положительных сывороток крови. Суть метода иммунофильтрации состоит в нанесении небольшого объема образца (например, цельной крови или сыворотки крови пациента) на поверхность пористой мембраны, на которой предварительно сорбированы антигены: S-белок коронавируса. Избыток внесимого образца, равно как и всех участвующих в процедуре анализа растворов, фильтруется через мембрану и поглощается пористым материалом, находящимся под мембраной внутри пластикового корпуса иммунофильтрационной ячейки. При прохождении анализируемого образца сквозь поры мембраны происходит связывание иммуноглобулинов класса G (антител), специфичных к сорбированному антигену. После полного впитывания образца на мембрану наносится раствор диагностического реагента – цветной метки, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека. Это приводит к тому, что с образовавшимся иммунным комплексом при наличии антител в образце связываются цветные метки, конъюгированные с антивидовыми моноклональными антителами. Избыток диагностического реагента фильтруется сквозь мембрану внутрь впитывающего эле-

Адрес для переписки:

Кропанева Мария Дмитриевна
Институт экологии и генетики микроорганизмов
Уральского отделения Российской академии наук
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-77-94, (902) 808-09-29.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: kropanevamasha@gmail.com

Address for correspondence:

Mariya D. Kropaneva
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms,
Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
13 Golev St
Perm
614081 Russian Federation
Phone: +7 (342) 280-77-94, (902) 808-09-29.
Fax: +7 (342) 280-92-11.
E-mail: kropanevamasha@gmail.com

Образец цитирования:

М.Д. Кропанева, П.В. Храмцов, М.С. Бочкова,
М.Б. Раев «Разработка модельного
иммунофильтрационного анализа с использованием
конъюгата на основе пероксидазы хрена» // Российский
иммунологический журнал, 2023. Т. 26, № 3. С. 313-320.
doi: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

© Кропанева М.Д. и соавт., 2023
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

M.D. Kropaneva, P.V. Khramtsov, M.S. Bochkova,
M.B. Rayev "Development of a model immunofiltration assay
using a conjugate based on horseradish peroxidase", Russian
Journal of Immunology/Rossiyskiy Immunologicheskii
Zhurnal, 2023, Vol. 26, no. 3, pp. 313-320.
doi: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

© Kropaneva M.D. et al., 2023
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.46235/1028-7221-8003-DOA

мента ячейки. Описанная процедура приводит к образованию комплекса, включающего в себя метку, а каталитическая реакция с ее участием приводит к окрашиванию участков мембраны, где сорбирован S-белок. Были проведены исследования, оптимизирующие процедуру анализа и повышающие значимые характеристики теста.

Показано, что добавление додецилсульфата натрия до конечной концентрации 50 мкМ в субстратный буфер позволяет достичь более высокого аналитического сигнала и стабильного результата спустя 10 минут после окончания процедуры анализа. Оптимизированы такие условия иммунофилтрационного анализа, как разведения диагностического реагента, объем вносимого образца и количество S-белка коронавируса, наносимого на нитроцеллюлозную мембрану. Определено, что с помощью иммунофилтрационного анализа возможно определение антител против S-белка коронавируса в разведении образца сыворотки более чем 1/1000. Результаты иммунофилтрационного анализа воспроизводят результаты ИФА.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция COVID-19, пероксидаза хрена, иммунофилтрационный анализ, лабораторная диагностика, иммуноферментный анализ, "point-of-care" тест-системы

DEVELOPMENT OF A MODEL IMMUNOFILTRATION ASSAY USING A CONJUGATE BASED ON HORSE RADISH PEROXIDASE

Kropaneva M.D., Khramtsov P.V., Bochkova M.S., Rayev M.B.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. The immunofiltration format of a diagnostic system for analytical testing may become an alternative to immunochromatographic design of test systems. Due to the nature of the immunofiltration assay procedure, its advantages over immunochromatography, the most popular rapid test format, are as follows: higher sensitivity as well as absence of a hook effect. The paper presents data on development of an immunofiltration assay for the detection of antibodies against the S-protein of the SARS-CoV-2 virus. The aim of the present study was to optimize the conditions for a model immunoassay using the immunofiltration format by means of diagnostic reagents based on horseradish peroxidase.

The samples of blood serum taken in the "red" COVID-19 area from patients with a verified diagnosis of a new coronavirus infection were registered as positive samples, and blood sera obtained before 2019 were used as negative samples. The procedure of immunofiltration assay was carried out using a pool of negative and positive blood sera. The essence of the immunofiltration method consists in applying a small volume of a sample (for example, whole blood or patient's blood serum) to the surface of a porous membrane with pre-absorbed antigen, e.g., S-protein of the SARS-CoV-2 virus. The excess of applied sample as well as all solutions used in the assay procedure, are filtered through the membrane and absorbed by the porous material located under the membrane inside plastic housing of the immunofiltration cell. Upon passage of the analyzed sample through the pores of the membrane, the IgG immunoglobulins (antibodies) are binding to the absorbed antigen. After complete impregnation of the sample, a diagnostic reagent solution is applied to the membrane. The colored label is conjugated with monoclonal antibodies against human IgG. Hence, in the presence of antibodies in the sample, the immune complex binds with colored labels conjugated with anti-species monoclonal antibodies. The excess of diagnostic reagent is filtered through the membrane into the absorbent element of the work cell. The described procedure leads to the formation of a complex that includes the label. A following catalytic reaction with its participation leads to the staining of the membrane regions where the S-protein is sorbed. Studies have been carried out to optimize the assay procedure and improve the significant characteristics of the test.

It has been shown that the addition of sodium dodecyl sulfate to its final concentration of 50 μM in the substrate buffer enables a higher analytical signal and a stable result within 10 minutes after the end of the assay procedure. Other factors of immunofiltration assay, e.g., dilution of the diagnostic reagent, volume of the introduced sample and amounts of the coronavirus S-protein applied to the nitrocellulose membrane were optimized. It has been found that the usage of immunofiltration assay allows to detect antibodies against the S-protein of SARS-CoV-2 at more than 1/1000 dilution of a serum sample. The results of immunofiltration assay reproduce appropriate results obtained by ELISA technique.

Keywords: coronavirus infection COVID-19, horseradish peroxidase, immunofiltration assay, laboratory diagnostics, enzyme immunoassay, point-of-care test-system

Работа выполнена в рамках государственного задания, регистрационный номер НИОКТР 122010800029-1.

Введение

На сегодняшний день существуют многочисленные коммерческие тест-системы, предназначенные для серологической диагностики COVID-19 и пригодные для мониторинга эффективности вакцинации [8]. Однако необходимым направлением исследований остается разработка тест-систем для применения в условиях ограниченных ресурсов [15]. К подобным тестам предъявляются такие требования, как простота, стабильность при хранении, доступность для массового производства. В настоящее время наиболее популярным форматом point-of-care тестов является иммунохроматография. Иммунохроматографические тесты демонстрируют высокую эффективность с точки зрения чувствительности и специфичности, которые могут достигать 97-99% [11]. Несмотря на это, иммунохроматографические тесты от ряда производителей не показали достаточной эффективности, и их производство и продажи были приостановлены регулирующими органами [3, 10].

Таким образом, несмотря на высокую эффективность коммерческих иммуноферментных и иммунохроматографических анализов, для детекции антител к антигенам коронавируса необходимы исследования, направленные на поиск новых форматов анализа и их оптимизацию в контексте применения для определения конкретных мишеней.

Альтернативой иммунохроматографическим анализам могут стать тест-системы в формате иммунофльтрации (ИФ). Суть метода иммунофльтрации состоит в нанесении небольшого объема образца (например, цельной крови или сыворотки крови пациента) на поверхность пористой мембраны, на которой предварительно сорбированы антигены: S-белок коронавируса. Избыток вносимого образца, равно как и всех участвующих в процедуре анализа растворов, фильтруется через мембрану и поглощается пористым материалом, находящимся под мембраной внутри пластикового корпуса иммунофльтрационной ячейки. При прохождении анализируемого образца сквозь поры мембраны происходит связывание иммуноглобулинов класса G (антител), специфичных к сорбированным антигенам. После полного впитывания образца на мембрану наносится раствор диагностического реагента — цветной метки, конъюгированной с моноклональными антителами против IgG человека. Это приводит к тому, что с образовавшимся иммун-

ным комплексом при наличии антител в образце связываются цветные метки, конъюгированные с антивидовыми моноклональными антителами. Избыток диагностического реагента фильтруется сквозь мембрану внутрь впитывающего элемента ячейки. Описанная процедура приводит к образованию комплекса, включающего в себя метку, а каталитическая реакция с ее участием приводит к окрашиванию участков мембраны, где сорбирован S-белок.

Ввиду особенностей описываемого формата анализа, преимущества иммунофльтрации (ИФ) по сравнению с наиболее популярным форматом экспресс-тестов, иммунохроматографией [12], состоят в большей чувствительности, а также отсутствии хук-эффекта (отсутствие сигнала при высоких концентрациях анализируемого вещества в образце) [13] ввиду наличия этапов промывки.

Соответственно, целью настоящего исследования явилась оптимизация условий для модельного иммуноанализа в формате иммунофльтрации для определения антител к Spike-белку коронавируса с использованием диагностических реагентов на основе пероксидазы хрена.

Материалы и методы

Сбор, аликвотирование и хранение сывороток крови

В работе использовали остаточные образцы сыворотки крови пациентов «красной» зоны, с верифицированным диагнозом новой коронавирусной инфекции (COVID-19), находившиеся на лечении в КМСЧ № 1 г. Перми и давшие письменное согласие на использование обезличенных остаточных образцов биоматериалов, а также остаточные образцы сыворотки крови пациентов, сдававших анализы на наличие антител в клинико-диагностической лаборатории ООО «Медлаб-экспресс», г. Перми и давшие письменное согласие на использование обезличенных остаточных образцов биоматериалов (разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН 04.04.2022). Количество IgG против SARS-CoV-2 было проанализировано методом иммуноферментного анализа (ИФА). В связи с широким распространением новой коронавирусной инфекции и мероприятиями по вакцинации населения получение образцов отрицательных сывороток являлось проблематичным. Поэтому в качестве отрицательных образцов были использованы сыворотки крови, полученные до 2019 года. Сыворотки крови были получены от здоровых доноров в возрасте от 23 до 43 лет, давших письменное согласие (получено разрешение этического комитета ИЭГМ УрО РАН 09.06.2017). Отсутствие в них антител

к SARS-CoV-2 было подтверждено результатами ИФА.

Иммунофильтрационный анализ для определения IgG против COVID-19

При разработке иммунофильтрационного анализа ориентировались на протоколы, описанные в работах [1, 2, 4]. Использовали нитроцеллюлозную (н/ц) мембрану с диаметром пор 0,3 мкм. Подготавливали н/ц мембрану нужного размера. На область мембраны с размерами 10 × 10 мм точками по 2 мкл наносили антиген Spike-protein, RBD (S-белок), разведенный до необходимой концентрации в ЗФР. Далее иммуносорбент высушивали 30 минут при комнатной температуре и 1 час 30 минут при 37 °С перемещали в планшет и промывали 35 мл ЗФРТ, процедуру повторяли 3 раза. После этого нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными антигенами блокировали ЗФР + 0,2% твин-20 в течение 60 минут, 37 °С, вновь промывали и высушивали. После этого полученный иммуносорбент разрезали на куски меньшего размера (15 × 15 мм), собирали иммунофильтрационную ячейку и проводили анализ. В «окна» для внесения образца добавляли 150 мкл ЗФРТ. После полного впитывания вносили 100 мкл анализируемого образца в блокирующем буфере, через минуту иммунофильтрационную ячейку промывали 150 мкл ЗФРТ. Далее вносили 80 мкл конъюгата НР/Mab vs hum IgG в блокирующем буфере. После 1 минуты ячейки вновь промывали и вносили 80 мкл ТМБ в субстратном буфере (9 мл 5 мМ цитрат-фосфатный буфер, рН 5 + 1 мл 1 мг/мл ТМБ в ДМСО + 2 мкл 30% H₂O₂) с добавлением 50 мМ додецилсульфата натрия. После 10 минут оценивали результаты анализа: иммунофильтрационную ячейку разбирали, а нитроцеллюлозную мембрану с образовавшимися иммунными комплексами помещали на прозрачную пленку и сканировали. Полученное изображение обрабатывали в программе ImageJ, согласно методу, описанному в статье [5].

Дот-иммуноанализ на нитроцеллюлозной мембране

Подготавливали тест-полоски из нитроцеллюлозной мембраны (с диаметром пор 0,45 мкм), трехкратно промывали ЗФРТ. Далее тест-полоски обрабатывали блокирующим раствором в течение 60 минут при 37 °С, трехкратно промывали и инкубировали с сывороткой крови человека, разведенной в исследуемых блокирующих растворах в 10 раз, вновь промывали и проводили инкубацию с конъюгатом пероксидазы хрена, растворенной в исследуемых блокирующих растворах в 100 раз, в течение 60 минут при 37 °С. После процедуры

промывки тест-полоски высушивали, фиксировали на белом листе бумаги и сканировали. В качестве контрольного образца была использована тест-полоска, не подвергавшаяся процедуре анализа. Результат получали путем вычитания показателя интенсивности окрашивания фонового сигнала исследуемых образцов из показателя интенсивности окрашивания фонового сигнала контрольного образца.

Синтез конъюгата пероксидазы хрена с моноклональными антителами против IgG человека проводили согласно методике [14].

Результаты и обсуждение

Применение ферментной метки в составе диагностического реагента предполагает добавление субстрата тетраметилбензидина-3,3',5,5' (ТМБ). Традиционно, в качестве буфера для разведения ТМБ используют цитрат-фосфатный буфер, рН 5 с добавлением 0,02% H₂O₂. В результате предварительных экспериментов было показано, что использование данного буфера в иммунофильтрационном анализе не позволяет получить стабильный аналитический сигнал. Реакция окисления субстрата пероксидазой хрена идет с высокой скоростью, что приводит к обесцвечиванию аналитической зоны. Это снижает качество оценки результатов анализа. В работе [7] продемонстрировано, что добавление додецилсульфата натрия (ДСН) позволяет достигать стабильного сигнала в анализах с использованием пероксидазы хрена и ТМБ. В связи с этим нами была протестирована эффективность использования ДСН в качестве стабилизатора сигнала в иммунофильтрационном анализе для определения антител против антигена SARS-CoV-2. В качестве анализируемых образцов использовали пул из трех положительных сывороток крови с высоким уровнем антител и пул из трех отрицательных сывороток крови в разведении 1/10 в блокирующем буфере. Было протестировано три различных концентрации ДСН: 50, 100 и 250 мкМ. Анализ проводили согласно протоколу, описанному в разделе «Материалы и методы». Регистрацию аналитического сигнала проводили через 5, 10, 20 минут. Было показано, что добавление ДСН до конечной концентрации 50 мкМ в субстратный буфер позволяет достичь более высокого аналитического сигнала и стабильного результата спустя 10 минут после окончания процедуры анализа (рис. 1).

На следующем этапе был проведен скрининг оптимального блокирующего раствора. Было протестировано 12 блокаторов в трех различных концентрациях. В данном случае было важным уменьшение фонового сигнала на ни-

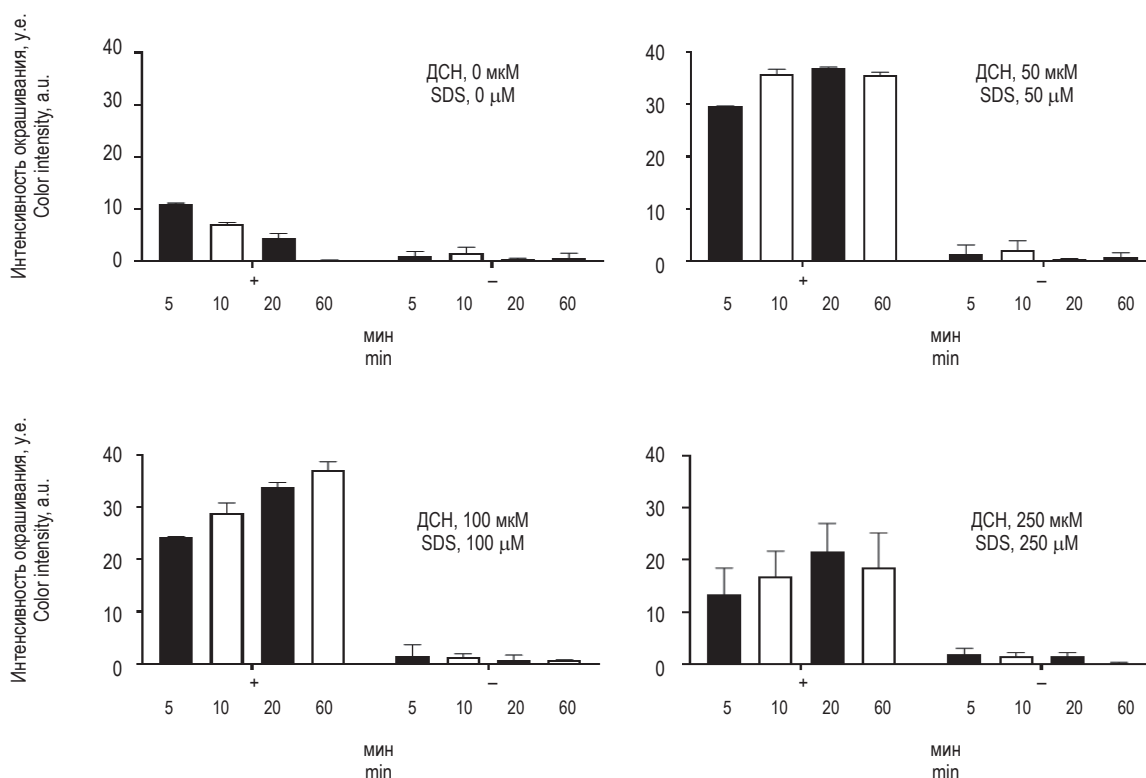


Рисунок 1. Оценка влияния концентрации додецила сульфата натрия на аналитический сигнал иммунофльтрационного анализа для определения антител к SARS-CoV-2

Примечание. «+» – положительный образец, «—» – отрицательный образец; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение.

Figure 1. Evaluation of the effect of the concentration of sodium dodecyl sulfate on the analytical signal of the immunofiltration assay for the detection of antibodies to SARS-CoV-2

Note. “+”, positive sample; “—”, negative sample; n = 2, mean ± standard deviation.

троцеллюлозной мемbrane. Поэтому скрининг блокаторов проводили при помощи метода дот-иммуноанализа без стадии сорбции антигена коронавируса S-белка. В результате было показано, что при использовании в качестве блокатора детергента твина-20 в концентрации 0,2% наблюдается наименьший фоновый сигнал (рис. 2А).

Далее исследовали влияние блокирующего эффекта наиболее распространенных детергентов на фоновый сигнал в дот-иммуноанализе. Использовали твин-20, твин-80 и тритон X-100 в различных концентрациях. Анализ также проводили без стадии сорбции S-белка. После завершения процедуры анализа тест-полоски сканировали и оценивали интенсивность окрашивания фона. Определено, что для анализа, проводимого на нитроцеллюлозной мемbrane, с использованием детектирующего реагента на основе пероксидазы хрена оптимальный блокирующий эффект достигается путем добавления в блокирующий буфер детергента твина-20 до конечной концентрации 0,2% (рис. 2Б).

Дальнейшие исследования были направлены на оптимизацию процедуры иммунофльтрационного анализа. В качестве аналитических образцов использовали образцы пултированных отрицательных и положительных сывороток. Были оптимизированы следующие параметры:

- 1) Оптимальным разведением конъюгата пероксидазы хрена с моноклональными антителами против IgG человека является разведение 1/200 (рис. 3А);
- 2) Оптимальным количеством антигена S-белка коронавируса, сорбируемого на поверхности нитроцеллюлозной мемbrane, является 0,25 мг/мл (рис. 3Б);
- 3) Оптимальный объем исследуемого образца сыворотки крови – 100 мкл (рис. 3В).

В оптимизированных условиях был проведен иммунофльтрационный анализ количества антител против S-белка коронавируса в сыворотке крови. Для построения калибровочной кривой использовали 10-кратные разведения пула положительных сывороток крови с высоким титром

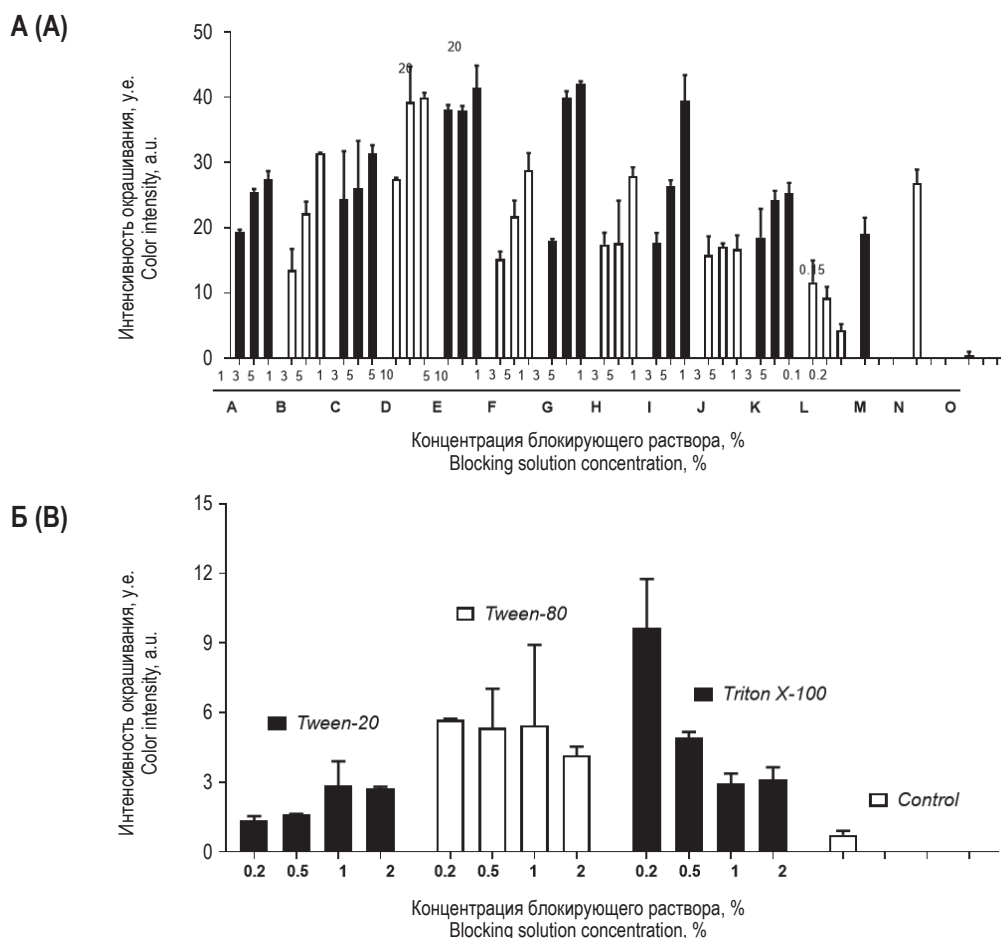


Рисунок 2. Оптимизация состава блокирующего буфера для иммунофилтративного анализа с использованием пероксидазы хрена

Примечание. А – скрининг блокирующих растворов методом дот-иммуноанализа. Б – оптимизация состава блокирующего раствора на основе детергентов. Обозначение блокирующих растворов: А – бычий сывороточный альбумин (БСА); В – казеин (каз); С – желатин из кожи холодноводных рыб; D – сыворотка крови кролика; E – сыворотка крови лошади; F – поливинилпирролидон; G-полиэтиленгликоль 30000; H – Поли(2-этил-2-оксазолин); I – декстран70; J – трегалоза; K – фикокол 400; L – твин20; M – каз 1%+БСА 1%; N – каз 3% + БСА 1%; O – контроль; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение.

Figure 2. Optimization of the composition of the blocking buffer for immunofiltration assay using horseradish peroxidase

Note. (A) Screening of blocking solutions by dot-immunoassay. (B) Optimization of the composition of the blocking solution based on detergents.

Designation of blocking solutions: A, bovine serum albumin (BSA); B, casein (kaz); C, gelatin from the skin of cold water fish; D, rabbit blood serum; E, horse blood serum; F, polyvinylpyrrolidone; G, polyethylene glycol 30000; H, Poly(2-ethyl-2-oxazoline); I, dextran70; J, trehalose; K, ficoll 400; L, twin20; M, kaz 1%+BSA 1%; N, kaz 3% + BSA 1%; O, control; n = 2, mean ± standard deviation.

антител против S-белка коронавируса (от 1/10 до 1/10000) и пул отрицательных сывороток крови (разведение 1/10) (рис. 3Г). Определено, что с помощью иммунофилтративного анализа возможно определение антител против S-белка коронавируса в разведении образца сыворотки более чем 1/1000. Дополнительно была построена калибровочная кривая для определения антител против S-белка в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Из графика на рисунке 3Г видно, что результаты иммунофилтративного анализа соответствуют результатам ИФА.

Заключение

Таким образом, была оптимизирована модель тест-системы в формате иммунофилтративного анализа для определения антител к SARS-CoV-2 с использованием ферментной метки – пероксидазы хрена. Альтернативой традиционным диагностическим реагентам на основе ферментной метки пероксидазы хрена могут стать биоконъюгаты на основе нанозимов берлинской лазури [6, 9]. Однако в таких исследованиях неизбежностью является сравнение

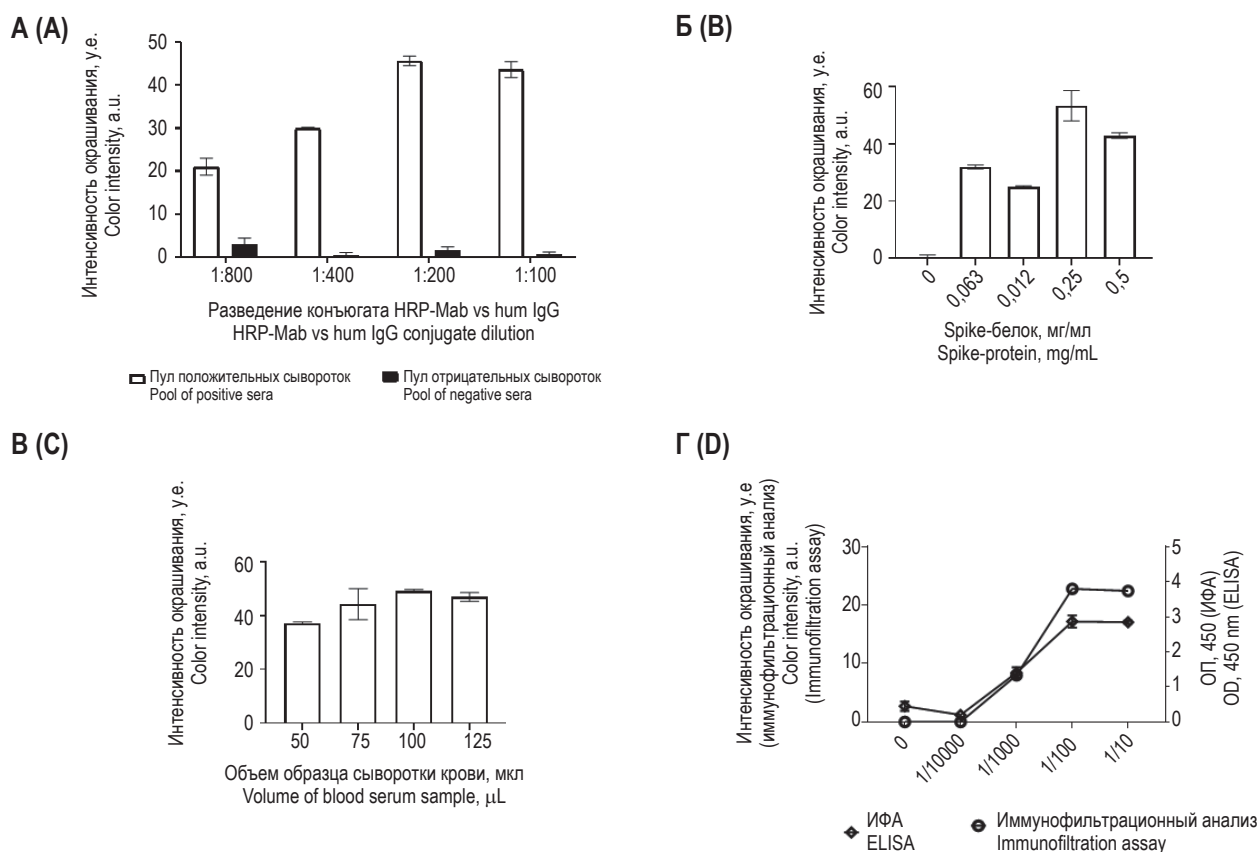


Рисунок 3. Оптимизация иммунофильтрационного анализа для определения антител против S-белка коронавируса

Примечание. А – влияние разведения конъюгата пероксидазы хрена на результат иммунофильтрационного анализа. Б – влияние количества сорбированного S-белка на нитроцеллюлозной мембране на результат иммунофильтрационного анализа. В – влияние вносимого объема образца сыворотки крови на результат иммунофильтрационного анализа. Г – сравнение калибровочных кривых антител против S-белка в сыворотке крови, полученных методами иммунофильтрационного и иммуноферментного анализов; n = 2, среднее значение ± стандартное отклонение

Figure 3. Optimization of the immunofiltration assay for the detection of antibodies against the coronavirus S-protein

Note. (A) Influence of horseradish peroxidase conjugate dilution on the result of immunofiltration assay. (B) Influence of the amount of adsorbed S-protein on the nitrocellulose membrane on the result of immunofiltration assay. (C) Influence of the introduced volume of the blood serum sample on the result of immunofiltration assay. (D) Comparison of calibration curves of anti-S-protein antibodies in blood serum obtained by immunofiltration and enzyme immunoassay methods; n = 2, mean ± standard deviation.

диагностикумов на основе экспериментальных меток с традиционными. Соответственно, полученные данные также можно использовать в исследованиях по конструированию иммунофильтрационных анализов с использованием синтетических аналогов пероксидазы хрена –

наноматериалов с пероксидазоподобной активностью. Результаты данной научной работы также могут служить основой для разработки колориметрических тест-систем в формате иммунофильтрации для оценки уровня антител к разнообразным мишеням.

Список литературы / References

- Adil B., Shankar K.M., Naveen Kumar B.T., Patil R., Ballyaya A., Ramesh K.S., Poojary S.R., Byadgi O.V., Siriappagounder P. Development and standardization of a monoclonal antibody-based rapid flow-through immunoassay for the detection of *Aphanomyces invadans* in the field. *J. Vet. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 4. pp. 413-419.
- Castro A.R., Mody H.C., Parab S.Y., Patel M.T., Kikkert S.E., Park M.M., Ballard R.C. An immunofiltration device for the simultaneous detection of non-treponemal and treponemal antibodies in patients with syphilis. *STI*, 2010, Vol. 86, no. 7, pp. 532-536.
- Ernst E., Wolfe P., Stahura C., Edwards K.A. Technical considerations to development of serological tests for SARS-CoV-2. *Talanta*, 2021, Vol. 224, 121883. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121883.

4. Kalita P., Chaturvedula L.M., Sritharan V., Gupta S. *In vitro* flow-through assay for rapid detection of endotoxin in human sera: A proof-of-concept. *Nanomedicine*, 2017. Vol. 13, no. 4. pp. 1483-1490.
5. Khrantsov P., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Dot immunoassay for the simultaneous determination of postvaccination immunity against pertussis, diphtheria, and tetanus. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, Vol. 409, pp. 3831-3842.
6. Komkova M.A., Vetoshev K.R., Andreev E.A., Karyakin A.A. Flow-electrochemical synthesis of Prussian Blue based nanozyme 'artificial peroxidase'. *Dalton Transact.*, 2021, Vol. 50, no. 133, pp. 11385-11389.
7. Li M., He Yif., Meng H., Dong Y., Shang Y., Liu H., Qu Z., Liu Y. Multiple effects of sodium dodecyl sulfate on chromogenic catalysis of tetramethyl benzidine with horseradish peroxidase. *J. Dispers. Sci.*, 2019, Vol. 45, no. 3. pp. 1409-1416.
8. Oishee M.J., Ali T., Jahan N., Khandker S.S., Haq M.A., Khondoker M.U., Sil B.K., Lugova H., Krishnapillai A., Abubakar A.R., Kumar S., Haque, M. Jamiruddin, M.R. Adnan, N. Covid-19 pandemic: Review of contemporary and forthcoming detection tools. *Infect. Drug Resist.*, 2021, Vol. 14, pp. 1049-1082.
9. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. The steadfast Au@Pt soldier: Peroxide-tolerant nanozyme for signal enhancement in lateral flow immunoassay of peroxidase-containing samples. *Talanta*, 2021, Vol. 225, 121961. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121961.
10. Pérez-López B., Mir M. Commercialized diagnostic technologies to combat SARS-CoV2: Advantages and disadvantages. *Talanta*, 2021, Vol. 225, 121898. doi:10.1016/j.talanta.2020.121898.
11. Robertson L.J., Moore J.S., Blighe K., Ng K.Y., Quinn N., Jennings F., Warnock G., Sharpe P., Clark M., Maguire K., Rainey S., Price R.K., Burns W.P., Kowalczyk A.M., Awuah A., McNamee S.E., Wallace G.E., Hunter D., Sager S., Chao Shern C., Nesbit M.A., McLaughlin J.A.D., Moore T. Evaluation of the IgG antibody response to SARS CoV-2 infection and performance of a lateral flow immunoassay: cross-sectional and longitudinal analysis over 11 months. *BMJ Open*, 2021, Vol. 11, no. 6, 048142. doi: 10.1136/bmjopen-2020-048142.
12. Ross G.M.S., Filippini D., Nielen M.W.F., Salentijn G.I.J. Unraveling the Hook Effect: A Comprehensive Study of High Antigen Concentration Effects in Sandwich Lateral Flow Immunoassays. *Anal. Chem.*, 2020, Vol. 92, no. 23, pp. 15587-15595.
13. Ross G.M.S., Salentijn G.I., Nielen M.W.F. A critical comparison between flow-through and lateral flow immunoassay formats for visual and smartphone-based multiplex allergen detection. *Biosensors (Basel)*, 2019, Vol. 9, no. 4, 143. doi:10.3390/bios9040143.
14. Tsang V., Greene R.M., Pilcher J.B. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO₄) of horseradish peroxidase to antibodies for use in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunoass.*, 1995, Vol. 16, no. 4. pp. 395-418.
15. Vandenberg O., Martiny D., Rochas O., van Belkum A., Kozlakidis Z. Considerations for diagnostic COVID-19 tests. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2021, Vol. 19, no. 3, pp. 171-183.

Авторы:

Кропанева М.Д. — к.б.н., младший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Храмцов П.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Бочкова М.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Раев М.Б. — д.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», г. Пермь, Россия

Authors:

Kropaneva M.D., PhD (Biology), Junior Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Khrantsov P.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Bochkova M.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Rayev M.B., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Immunology and Biotechnology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, a branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation