

Совершенствование отечественных тест-систем для иммуноферментной диагностики вирусов картофеля

А. И. УСКОВ, Ю. А. ВАРИЦЕВ, П. А. ГАЛУШКА, О. А. ШИШКИНА, Л. Б. УСКОВА, С. В. ЖЕВОРА

Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха, ул. Лорха, 23, пос. Красково, Люберецкий р-н, Московская обл., 140051, Российская Федерация

Резюме. В условиях санкционного давления для обеспечения возрастающих потребностей отрасли семеноводства в лабораторной диагностике фитопатогенов картофеля актуально развитие отечественного производства диагностических наборов для иммуноферментного анализа (ИФА). Цель исследований – разработать новые тест-системы для иммуноферментной диагностики вирусов картофеля. В 2023–2024 гг. были получены новые антисыворотки к М- и Y-вирусам, а также к вирусу скручивания листьев картофеля (PLRV). Для иммунизации использовали выделенные в 2023 г. изоляты PVM-45.82 и PVY-0_1L, а также выделенный ранее PLRV-Osa, обладающий высокой иммуногенной способностью. Новые отечественные антисыворотки AC PVM 4.23, AC PVY 5.23 и AC PLRV 6.23 характеризовались высокой иммунологической активностью и специфичностью. Титры антисывороток, определяемые в непрямом методе ИФА, для AC PVM 4.23 и AC PLRV 6.23 составляли 128000 ед., для AC PVY 5.23 – 256000 ед. Чувствительность тест-систем для определения патогенов, созданных на основе антифитных антител, выделенных из новых антисывороток, для PVM и PVY составляла около 8 нг/мл, для PLRV – 16 нг/мл. Использование при рутинном тестировании листовых проб тетраметилбензидина (ТМБ) в качестве субстрата обеспечило такие же результаты как и в варианте с о-фенилендиамин. При этом величина сигнала оптической плотности в положительных реакциях с использованием в качестве субстрата ТМБ в 73,5 % случаев была на 0,1 ед. и более выше, чем в варианте с о-фенилендиамин, в 22,4 % случаев значения были сопоставимы и только в 4,1 % случаев – на 0,1 ед. ниже. Новые российские тест-системы позволяют модернизировать производство отечественных иммуноферментных диагностикумов для определения вирусов картофеля.

Ключевые слова: вирусы картофеля, ИФА, российские тест-системы.

Сведения об авторах: А. И. Усков, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник (e-mail: korenevo2000@mail.ru); Ю. А. Варицев, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; П. А. Галушка, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник; О. А. Шишкина, старший научный сотрудник; Л. Б. Ускова, кандидат экономических наук, старший научный сотрудник; С. В. Жевора, доктор сельскохозяйственных наук, директор.

Для цитирования: Совершенствование отечественных тест-систем для иммуноферментной диагностики вирусов картофеля / А. И. Усков, Ю. А. Варицев, П. А. Галушка и др. // Достижения науки и техники АПК. 2024. Т. 38. № 9. С. 25–29. doi: 10.53859/02352451_2024_38_9_25

Improving domestic test systems for enzyme immunoassay diagnostics of potato viruses

A. I. Uskov, Yu. A. Varitsev, P. A. Galushka, O. A. Shishkina, L. B. Uskova, S. V. Zhevora

Lorkh Federal Research Center on Potato, ul. Lorkha, 23, pos. Kraskovo, Lyuberskiy r-n, Moskovskaya obl., 140051, Russian Federation

Abstract. In the context of sanctions pressure, to meet the growing needs of the seed industry for laboratory diagnostics of potato phytopathogens, it is important to develop domestic production of diagnostic kits for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The research aimed to develop new test systems for enzyme-linked immunosorbent assay diagnostics of potato viruses. In 2023–2024, new antisera to M- and Y-viruses, as well as to potato leafroll virus (PLRV) were obtained. For immunisation, the isolates PVM-45.82 and PVY-0_1L isolated in 2023, as well as the previously isolated PLRV-Osa, which has a high immunogenic capacity, were used. New domestic antisera AC PVM 4.23, AC PVY 5.23 and AC PLRV 6.23 were characterised by high immunological activity and specificity. The titres of antisera determined by the indirect ELISA method for AC PVM 4.23 and AC PLRV 6.23 were 128,000 units, for AC PVY 5.23 – 256,000 units. The sensitivity of the test systems for determining pathogens based on affinity antibodies isolated from the new antisera was about 8 ng/ml for PVM and PVY, and 16 ng/ml for PLRV. The use of tetramethylbenzidine (TMB) as a substrate in routine testing of leaf samples provided the same results as in the variant with o-phenylenediamine. At the same time, the optical density signal value in positive reactions using TMB as a substrate was 0.1 or more units higher in 73.5% of cases than in the variant with o-phenylenediamine, in 22.4% of cases the values were comparable and only in 4.1% of cases they were 0.1 units lower. New Russian test systems allow modernising the production of domestic enzyme immunoassay diagnostics for the detection of potato viruses.

Keywords: potato viruses; ELISA; Russian test systems.

Author Details: A. I. Uskov, D. Sc. (Agr.), chief research fellow (e-mail: korenevo2000@mail.ru); Yu. A. Varitsev, Cand. Sc. (Biol.), leading research fellow; P. A. Galushka, Cand. Sc. (Agr.), leading research fellow; O. A. Shishkina, senior research fellow; L. B. Uskova, Cand. Sc. (Ec), senior research fellow; S. V. Zhevora, D. Sc. (Agr.), director.

For citation: Uskov AI, Varitsev YuA, Galushka PA, et al. [Improving domestic test systems for enzyme immunoassay diagnostics of potato viruses]. Dostizheniya nauki i tekhniki APK. 2024;38(9):25–9. Russian. doi: 10.53859/02352451_2024_38_9_25

Федеральный закон «О семеноводстве» № 454-ФЗ от 30.12.2021 г. предполагает осуществление оборота семенного материала на территории РФ только при наличии соответствующих документов о качестве семян, определяемом в том числе зараженностью фитопатогенами. В соответствии с ГОСТ 33996-2016 и ГОСТ Р 59551-2021 иммуноферментный анализ (ИФА) служит одним из основных методов лабораторной идентификации фитопатогенов картофеля. В условиях санкционного давления недружественных стран для обеспечения возрастающих потребностей отрасли семеноводства в лабораторной диагностике фитопатогенов картофеля актуально раз-

витие отечественного производства диагностических наборов для ИФА из российских компонентов в целях импортозамещения на основе усовершенствования существующих тест-систем с последующей их валидацией.

Российские тест-системы для иммуноферментного определения вирусов картофеля были разработаны в конце XX века. В процессе разработки были решены методические и технологические аспекты производства специфических компонентов иммунодиагностикумов:

поиск, выделение и поддержание *in vitro* высокоиммуногенных моноизолятов вирусов картофеля

из природных источников на территории Российской Федерации;

подбор накопителей и выделение высокоочищенных вирусных препаратов;

иммунизация и получение специфических антисывороток к вирусам картофеля;

выделение высокоочищенных иммуноглобулинов (антител);

конъюгирование антител с маркерным ферментом пероксидазой из хрена обыкновенного (*A Armoracia rusticana* Lam).

Разработанные тест системы стали основой производимых во Всероссийском научно-исследовательском институте картофельного хозяйства (ВНИИКХ) (ныне Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха (ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха) диагностических иммуноферментных наборов для выявления X-, S-, M-, Y-, A- вирусов и вируса скручивания листьев картофеля [1].

Современные отечественные диагностические наборы для ИФА должны удовлетворять следующим характеристикам [2]:

высокая стабильность реагентов (срок годности не менее 12 месяцев);

возможность как визуальной, так и инструментальной оценки результатов анализа;

высокая специфичность анализа – количество перекрестных реакций с гетерологичными вирусами не более 0,01 %;

чувствительность детекции вирусных антигенов (минимальная концентрация антигена, определяемая с использованием набора) – 10...20 нг/мл;

высокая воспроизводимость анализа (коэффициент вариации результатов определения патогена в одном и том же тестируемом образце не более 10 %);

точность анализа (доля отрицательных результатов определения для проб, отрицательных по определяемому антигену) не менее 95 %;

широкий диапазон измерений (10...1000 нг/мл) без проявления «хук»-эффекта в области высоких концентраций определяемого фитопатогена.

Возможное совершенствование существующих тест-систем связано с использованием ряда технологических решений, затрагивающих их ключевые компоненты [2, 3]:

использование высокоспецифичных аффинных антител;

использование низкомолекулярной фракции конъюгата антител с пероксидазой с мольным соотношением антитело/фермент = 1, сохраняющей 60...70 % ферментной и 90 % иммунологической активности;

применение новой технологии иммобилизации и стабилизации антител на поверхности полистироловых планшетов с высокой сорбционной емкостью;

использование комплекса природных и синтетических детергентов для буферных растворов с целью повышения специфичности иммунохимических взаимодействий в аналитической системе;

использование новых экологически безопасных субстратов для маркерных ферментов;

применение новой технологии хранения готовой для использования двухкомпонентной готовой смеси (субстрат + пероксид водорода) в водном растворе.

Ключевым направлением совершенствования диагностических тест-систем служит использование высокоспецифичных антител [4], выделенных из антисывороток, полученных на основе новых высокоимму-

ногенных изолятов вирусов, выявляемых из природных популяций на территории Российской Федерации.

Важным элементом тест-системы выступает детекция результатов анализа, осуществляемая путем взаимодействия маркерного фермента и его субстрата. Применяемый в последние годы в диагностических наборах производства ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха в качестве субстрата реагент о-фенилендиамин при обращении требует осторожности и использования индивидуальных средств защиты (перчатки). В этой связи актуально использование в качестве субстрата экологически более безопасных реагентов при сохранении диагностических характеристик тест-системы в процессе визуализации результатов анализа.

Цель исследований – разработка новых российских тест-систем для иммуноферментной диагностики наиболее вредоносных и распространенных на территории Российской Федерации вирусов картофеля.

Условия, материалы и методы. Исследования по совершенствованию тест-систем для иммуноферментного определения наиболее распространенных на территории России M- и Y-вирусов [5], а также вируса скручивания листьев картофеля (PLRV), вызывающего тяжелое поражение культуры, проводили в 2023–2024 гг. в ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха в рамках государственной программы «Аграрная наука – шаг в будущее АПК Российской Федерации» (082-3-2023-0009).

Для получения новых антисывороток использовали выделенные в 2023 г. изоляты PVM-45.82 и PVY-0_1L, а также выделенный ранее изолят PLRV-Osa, обладающий высокой иммуногенной способностью. Накопление вирусных антигенов проводили на растениях томатов *Licopersicon esculentum* сорт Колхозный (PVM), табака *Nicotiana tabacum* сорт Самсун (PVY) и дурмана обыкновенного *Datura stramonium* (PLRV).

Для выделения и очистки вирусных препаратов использовали многоэтапные схемы и оригинальные методики, используемые в ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха, включающие для мозаичных вирусов осветление сока растений-накопителей путем низкоскоростного центрифугирования, осаждение вирусов из раствора добавлением полиэтиленгликоля М6000 и их экстрагирование из осадков 0,3М глициновым буфером (pH – 7,5) в несколько этапов высокоскоростного центрифугирования с использованием сахарозной подушки и градиента сахарозы, или нескольких циклов дифференциального центрифугирования. При выделении вирусных частиц сферической формы (PLRV) использовали ферментацию инфицированного материала для повышения концентрации и выхода вируса и осветление растительного сока смесью хлороформа с бутанолом. Полученные вирусные препараты характеризовались оптимальным соотношением оптического поглощения E_{260}/E_{280} : 1,24 для PVM, 1,2 для PVY и 1,44 для PLRV, что свидетельствует о высокой степени очистки препаратов и отсутствии существенных повреждений нативной структуры вирионов.

Иммунизацию кроликов высокоочищенными вирусными препаратами PVM и PVY проводили по схеме, включающей три подкожные инъекции в дозе 100 мг с интервалом 2...3 недели с использованием непатогенного адьюванта Фрейнда. Схема иммунизации животных вирусом скручивания листьев картофеля включала две подкожные инъекции (100 мг) с интервалом 60 дней и одну внутримышечную инъекцию через 2 недели после второй в дозировке 100 мг/кролика.

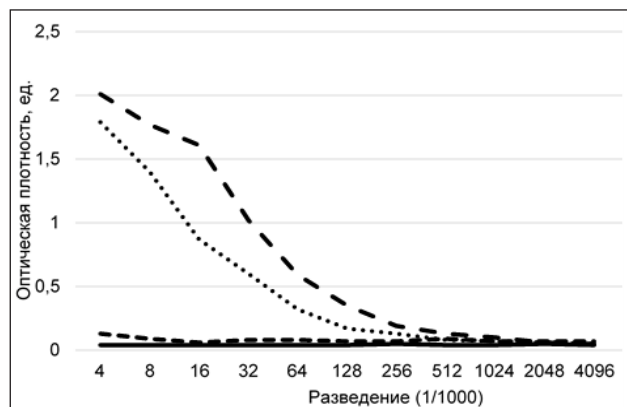


Рис. 1. Сравнительное титрование новой антисыворотки AC PVM 4.23 к М-вирусу картофеля: — — AC PVM 4.23 по AG PVM 4582 (2 мкг/мл); — AC PVM 8056.09 по AG PVM 4582 (2 мкг/мл); — — AC PVM 4.23 по AG PVS (2 мкг/мл); - - - - AC PVM 4.23 по СЗР в разведении 1:40.

Забор крови и выделение специфических антисывороток проводили через 7...10 дней после третьей инъекции. Полученные антисыворотки титровали против гомологичных и гетерологичных вирусов, а также сока

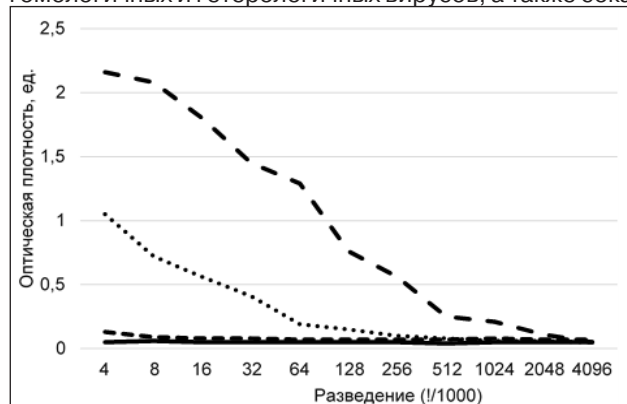


Рис. 2. Сравнительное титрование новой антисыворотки AC PVY 5.23 к Y-вирусу картофеля: — — AC PVY 5.23 по AG PVY 0_1L (2 мкг/мл); — AC PVY 13.2.11 по PVY 0_1L (2 мкг/мл); — — AC PVY 5.23 по AG PVM (2 мкг/мл); - - - - AC PVY 5.23 по СЗР в разведении 1:40.

неинфицированных растений картофеля. Антисыворотки с наиболее высокими титрами использовали для выделения специфических антител и конъюгирования с маркерным ферментом. Чувствительность новых отечественных тест-систем ИФА определяли с использованием калибровочной шкалы.

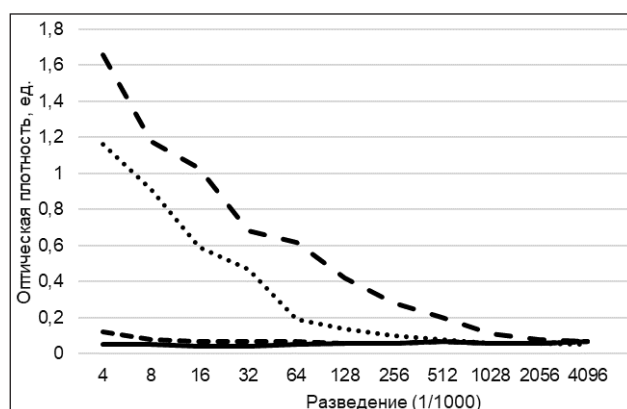


Рис. 3. Сравнительное титрование новой антисыворотки AC PLRV 6.23 к вирус скручивания листьев картофеля: — — AC PLRV 6.23 по AG PLRV-Osa (1 мкг/мл); — AC PLRV 30.1.12 по AG PLRV-Osa (1 мкг/мл); — — AC PLRV 6.23 по AG PVM (1 мкг/мл); - - - - AC PLRV 6.23 по СЗР в разведении 1:40.

Для испытания в качестве альтернативы применяемому в последние годы в диагностических наборах ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха субстрату о-фенилендиамина использовали раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) [6, 7], который по принятой в России классификации относится к малоопасным веществам (4-й класс). Сравнение проводили в процессе рутинного тестирования листовых проб селекционного материала ФИЦ картофеля имени А. Г. Лорха.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований по совершенствованию российских иммуноферментных тест-систем для определения М-, Y-вирусов и вируса скручивания листьев картофеля (PLRV) были получены следующие новые отечественные антисыворотки с высокой иммунологической активностью: AC PVM 4.23, AC PVY 5.23 и AC PLRV 6.23.

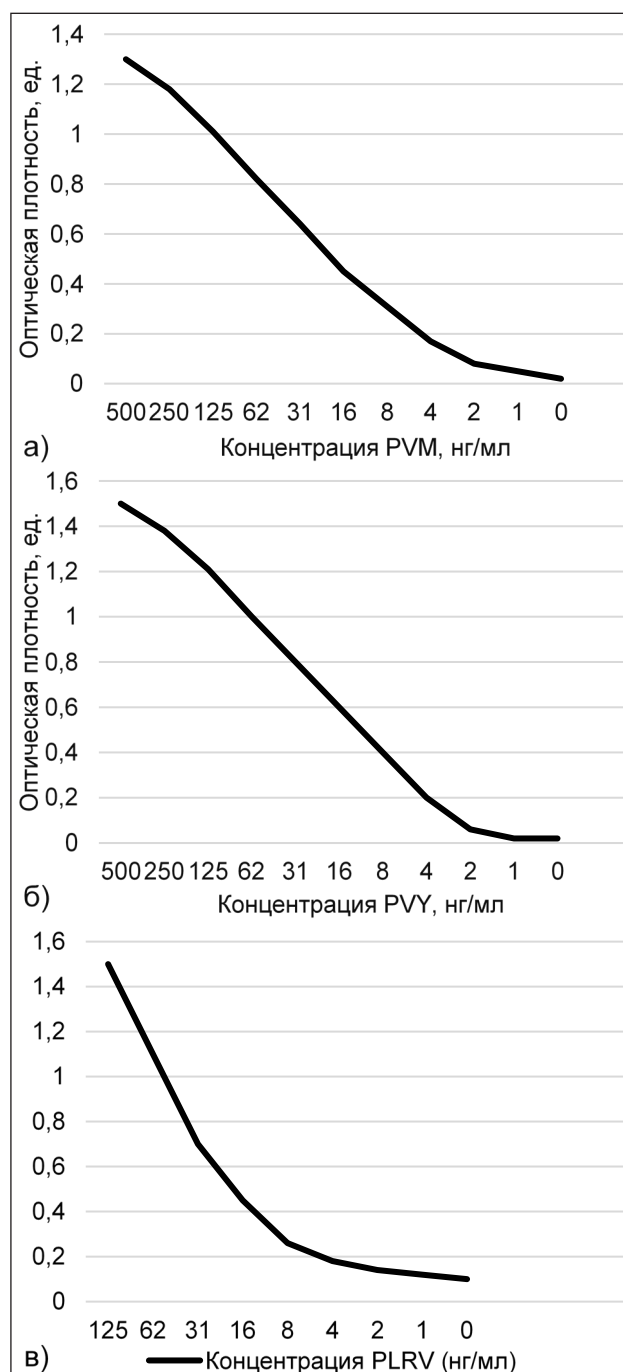


Рис. 4. Определение чувствительности выявления PVM (а), PVY (б) и PLRV (в) с использованием новой тест-системы.

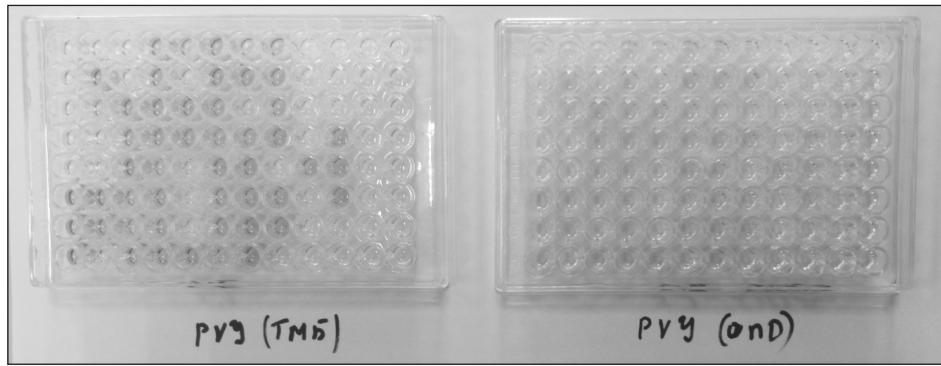


Рис. 5. Тестирование листовых проб с использованием разных субстратов: ТМБ (тетраметилбензидин); ОПД (о-фенилендиамин).

При титровании антисыворотки к М-вирусу картофеля AC PVM 4.23 в непрямой модификации ИФА по использованному для иммунизации антигену PVM-45.82 был получен титр на уровне 128000 ед., что значительно превышает активность антисыворотки AC PVM 8056.09, ранее применяемой для приготовления тест-систем для ИФА (рис. 1). При титровании антисывороток по гетерологичному антигену AG PVS (2 мкг/мл) и соку неинфицированных растений картофеля (СЗР) в разведении 1/40 не выявлено активности, что свидетельствует о высокой специфичности тестируемых антисывороток.

Еще более высокий титр отмечен для новой антисыворотки к Y-вирусу картофеля. При титровании по использованному для иммунизации антигену PVY-0_1L титр антисыворотки AC PVY 5.23 составил 256000 ед., что значительно выше, чем у антисыворотки сравнения AC PVY13.2.11 (рис. 2). Антисыворотка AC PVY 5.23 обладала также высокой специфичностью, не проявляя активность при титровании с гетерологичным антигеном AG PVM (2 мкг/мл) и соком неинфицированных растений картофеля (СЗР).

Титр антисыворотки к вирусу скручивания листьев картофеля AC PLRV6.23 составлял 128000 ед., что также свидетельствует о ее высокой иммунологической активности, по сравнению с ранее полученной антисывороткой AC PLRV 30.1.12. Специфичность антисывороток подтверждается отсутствием реакции в гетерологичном титровании по AG PVM (1 мкг/мл) и соку неинфицированных растений картофеля в разведении 1/40 (рис. 3).

Полученные антисыворотки AC PVM 4.23, AC PVY 5.23 и AC PLRV6.23 с высокой иммунологической активностью и специфичностью были использованы для выделения аффинных антител и их конъюгирования с маркерным ферментом пероксидазой из хрена обыкновенного (*Armoracia rusticana* Lam), которые в совокупности составили новые отечественные иммуноферментные тест-системы для определения М-, Y-вирусов и вируса скручивания листьев картофеля.

При построении калибровочных кривых установлена высокая чувствительность определения PVM, PVY и PLRV с использованием новых тест-систем. Высокая иммунологическая активность и специфичность исходных антисывороток позволили значительно снизить вклад неспецифических взаимодействий в аналитической системе и уменьшить их ограничивающее влияние на нижний предел определения вирусных антигенов в анализируемых экстрактах. В результате чувствительность определения М- и Y-вирусов картофеля составила 8 нг/мл, вируса скручивания листьев картофеля – 16 нг/мл (рис.4).

При испытании раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) в качестве субстрата для маркерного фермента было выявлено полное совпадение результатов анализа как по положительным, так и отрицательным реакциям, полученным при тестировании этого материала с использованием о-фенилендиамина (рис. 5).

При этом величина сигнала оптической плотности

Таблица. Результаты тестирования селекционного материала, инфицированного Y-вирусом картофеля, с использованием разных субстратов для маркерного фермента

Селекционный образец	Оптическая плотность	
	ОПД (450 нм)	ТМБ (620 нм)
3101	0,51	0,39
3102	0,39	0,44
3103	0,50	0,34
3106	0,37	0,60
3109	0,42	0,45
3110	0,36	0,47
1603	0,48	0,66
1604	0,35	0,29
1605	0,27	0,59
1606	0,28	0,33
1607	0,14	0,26
1608	0,39	0,41
1609	0,37	0,53
1610	0,31	0,41
1611	0,34	0,31
1612	0,40	0,32
1613	0,28	0,26
1614	0,30	0,67
1615	0,37	0,52
1616	0,38	0,44
1617	0,18	0,43
1619	0,39	0,58
1620	0,40	0,58
1624	0,38	0,46
1625	0,45	0,66
1626	0,50	0,66
1627	0,33	0,60
1628	0,33	0,49
1629	0,47	0,48
1630	0,39	0,55
1631	0,36	0,59
1632	0,20	0,28
1633	0,45	0,55
1634	0,40	0,56
1636	0,38	0,52
1637	0,45	0,61
1638	0,41	0,64
1639	0,45	0,77
1640	0,45	0,63
1641	0,27	0,58
1642	0,43	0,54
1643	0,13	0,64
1644	0,42	0,70
1646	0,40	0,67
1647	0,45	0,79
1654	0,34	0,58
1584	0,32	0,56
1585	0,35	0,59
1586	0,36	0,72
Межвид. гибрид 12	-	-
Межвид. гибрид 16	-	-

в положительных реакциях при использовании в качестве субстрата ТМБ в 73,5 % случаев была на 0,1 ед. и более, выше, чем в вариантах, с использованием о-фенилендиамина (см. табл.). Причем для образцов 1617 и особенно 1643 величина сигнала с ТМБ на уровне соответственно 0,43 и 0,67 ед. позволяла однозначно констатировать положительные реакции, в сравнении с величинами 0,14 и 0,18 ед., полученными при использовании ОПД. В 22,4 % случаев величина сигнала оптической плотности в положительных реакциях была сопоставима при использовании обоих субстратов (в пределах 0,01...0,1 ед.), и только в 4,1 % случаев величина сигнала была выше более чем на 0,1 ед. в варианте с ОПД.

Выводы. В результате проведенных исследований были созданы новые антисыворотки к наиболее распространенным на территории России М- и Y-вирусам, а также вирусу скручивания листьев картофеля (PLRV), вызывающему тяжелое поражение культуры, AC PVM 4.23, AC PVY 5.23 и AC PLRV6.23, которые характеризовались высокой иммунологической активностью и специфичностью. Титры антисывороток, определяемые непрямой методом ИФА, для AC PVM 4.23 и AC PLRV 6.23 составляли 128000 ед., для AC PVY 5.23 – 256000 ед.

Чувствительность тест систем для определения патогенов, созданных на основе аффинных антител, выделенных из новых антисывороток, для PVM и PVY составила 8 нг/мл, для PLRV – 16 нг/мл.

Испытание раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида в качестве субстрата для

маркерного фермента выявило полное совпадение результатов анализа как по положительным, так и отрицательным реакциям, полученным при тестировании листовых проб с использованием о-фенилендиамина. При этом величина сигнала оптической плотности в положительных реакциях при использовании ТМБ была на 0,1 ед. и более выше, чем в варианте с ОПД, в 22,4 % случаев она была сопоставимой при использовании обоих субстратов (в пределах 0,01...0,1 ед.), и только в 4,1 % случаев величина сигнала была выше более чем на 0,1 ед. в варианте с ОПД.

Новые российские тест-системы позволяют модернизировать производство отечественных иммуноферментных диагностикумов для определения вирусов картофеля.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа финансировалась за счет средств бюджета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр картофеля имени А. Г. Лорха». Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Литература.

1. Усков А. И. Воспроизводство оздоровленного исходного материала для семеноводства картофеля: 6. Методы лабораторного контроля // *Достижения науки и техники АПК*. 2011. № 10. С. 23–25.
2. Новые диагностические тест-системы для иммуноферментного определения возбудителей вирусных и бактериальных болезней картофеля / А. Н. Блинов, Ю. А. Варицев, Г. П. Варицева и др. // *Состояние и перспективы инновационного развития современной индустрии картофеля*. Чебоксары: КУП ЧР «Агро-инновации», 2013. С. 76–81.
3. Разработка иммуноферментного анализа X-картофеля с тираминовой амплификацией / Н. А. Панферова, В. Г. Панферов, И. В. Сафенкова и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55. № 4. С. 410–416.
4. Patris S., Vandeput M., Kauffmann J.-M. Antibodies as target for affinity biosensors // *Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 79. P. 239–246.
5. Изучение серологических и фитопатологических характеристик изолятов Y-вируса картофеля, распространенных на территории различных регионов Российской Федерации / А. И. Усков, Ю. А. Варицев, П. А. Галушка и др. // *Достижения науки и техники АПК*. 2022. Т. 36. № 10. С. 18–22.
6. Rationale of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as the chromogenic substrate in colorimetric analysis / X. Zhang, Q. Yang, Y. Lang, et al. // *Anal Chem*. 2020. Vol. 92. No. 18. P. 12400–12406. doi: 10.1021/acs.analchem.0c02149.
7. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as multicolorimetric indicator chlorine in water in line with health guideline values / P. Palladino, F. Torrini, S. Scarano, et al. // *Anal Bioanal Chem*. 2020. Vol. 412. No. 28. P. 7861–7868. doi: 10.1007/s00216-020-02918-9.

References

1. Uskov AI. [Reproduction of improved source material for potato seed production: 6. Laboratory control methods]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2011;(10):23-5. Russian.
2. Blintsov AN, Varitsev YuA, Varitseva GP, et al. [New diagnostic test systems for enzyme immunoassay of pathogens of viral and bacterial diseases of potatoes]. In: *Sostoyanie i perspektivy innovatsionnogo razvitiya sovremennoi industrii kartofelya* [The state and prospects of innovative development of the modern potato industry]. Cheboksary (Russia): KUP ChR "Agro-innovatsii"; 2013. p. 76-81. Russian.
3. Panferova NA, Panferov VG, Safenkova IV, et al. [Development of an X-potato enzyme immunoassay with tyramine amplification]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2019;55(4):410-6. Russian.
4. Patris S, Vandeput M, Kauffmann J-M. Antibodies as target for affinity biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016;79:239-46.
5. Uskov AI, Varitsev YuA, Galushka PA, et al. [Study of serological and phytopathological characteristics of potato Y-virus isolates widespread in various regions of the Russian Federation]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2022;36(10):18-22. Russian.
6. Zhang X, Yang Q, Lang Y, et al. Rationale of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as the chromogenic substrate in colorimetric analysis. *Anal Chem*. 2020;92(18):12400-6. doi: 10.1021/acs.analchem.0c02149.
7. Palladino P, Torrini F, Scarano S, et al. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as multicolorimetric indicator chlorine in water in line with health guideline values. *Anal Bioanal Chem*. 2020;412(28):7861-8. doi: 10.1007/s00216-020-02918-9.

Поступила в редакцию 05.08.2024 После доработки 21.08.2024 Принята к публикации 11.09.2024