

*На правах рукописи*

**РАЗО ШИАТЕСА**

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ СИСТЕМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ  
ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ  
ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ АНТИТЕЛ И НАНОЧАСТИЦ**

Специальности

4.1.3 Агрохимия, агропочвоведение, защита и карантин растений

1.5.6 Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в агробиотехнологическом департаменте Аграрно-технологического института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (АТИ РУДН) и лаборатории иммунобиохимии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН).

**Научные руководители:**

доктор сельскохозяйственных наук, доцент  
директор агробиотехнологического департамента  
АТИ РУДН

**Пакина Елена Николаевна**

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник,  
лаборатории иммунобиохимии  
ФИЦ Биотехнологии РАН

**Сафенкова Ирина Викторовна**

**Официальные оппоненты:**

доктор сельскохозяйственных наук  
член-корреспондент РАН  
ФГБНУ «Федеральный научный  
селекционно-технологический  
центр садоводства и питомниководства»

**Упадышев Михаил Тарьевич**

доктор биологических наук,  
руководитель лаборатории нанобиотехнологии  
ФБУН Государственный научный центр  
прикладной микробиологии и биотехнологии

**Игнатов Сергей Георгиевич**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «30» ноября 2022 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 2021.002 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8., 423 аудитория

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке в УНИБЦ (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6 и на сайте <https://www.rudn.ru/science/dissovet>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета ПДС 2021.002  
кандидат сельскохозяйственных наук

**Введенский Валентин Валентинович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Выращивание сельскохозяйственных растений сопряжено с высокими рисками бактериального и вирусного инфицирования. Пораженность патогенами, начиная с семенного материала, значительно снижает качество возделываемой продукции. Возбудители накапливаются в латентной форме в течение нескольких поколений, что вызывает серьезные потери урожая. Так, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединённых Наций, болезни картофеля уносят от 10 до 25%, а в годы эпифитотий – до 80% урожая [<http://faostat.fao.org>]. Одним из основных направлений защиты растений является постоянный контроль и диагностика инфекций на разных стадиях выращивания культур. В соответствии с этим приоритетная задача борьбы с экономически значимыми фитопатогенами состоит в массовой диагностике с использованием инструментов, обладающих высокой специфичностью и чувствительностью и пригодных к применению как в лабораториях, так и во внелабораторных условиях. Иммунохроматографические тест-системы в полной мере удовлетворяют перечисленным выше требованиям. Однако чувствительность иммунохроматографического анализа (ИХА) часто недостаточна для выявления инфекций на ранних этапах заражения. В связи с этим востребовано повышение чувствительности иммунохроматографического определения фитопатогенов.

Объектами исследования выбраны экономически значимые фитопатогены вирусной (Х-вирус картофеля (ХВК), Y-вирус картофеля (YВК)) и бактериальной (возбудители черной ножки картофеля (*Dickeya* spp.), бактериального ожога (*Erwinia amylovora*) и бурой гнили картофеля (*Ralstonia solanacearum*) природы – приоритетные возбудители болезней растений семейства Solanaceae и Rosaceae. Высокочувствительные системы для определения перечисленных выше фитопатогенов позволят эффективно контролировать качество посадочного материала, а также своевременно выявлять возникновение инфекционных очагов.

**Степень разработанности темы.** Востребованность иммунохроматографических тест-систем как средств диагностики болезней растений вирусной и бактериальной этиологии определяется их методической простотой, экспрессностью, специфичностью, отсутствием необходимости в оборудовании и высококвалифицированных специалистах для проведения анализа. Для большинства фитопатогенов разработаны и доступны коммерческие тест-полоски. Однако важной задачей остается разработка новых тест-систем для повышения чувствительности анализа и выявления латентных инфекций.

**Цель и задачи работы.** Цель работы – разработка новых иммунохроматографических систем для детекции фитопатогенов в низких концентрациях.

Достижение поставленной цели включало решение нескольких задач:

1. Получение поликлональных антител, специфичных к выбранным фитопатогенам;
2. Характеристика специфичных антител;
3. Синтез и характеристика наночастиц;
4. Изучение формирования комплексов наночастиц с антителами и синтез конъюгатов антител, специфичных к фитопатогенам;
5. Разработка иммунохроматографических тест-систем для детекции фитопатогенов вирусной и бактериальной природы;
6. Апробация разработанных тест-систем.

**Научная новизна.** В рамках диссертационной работы впервые:

Показано, что предварительное формирование комплексов вирусов с конъюгатом (антитела – наночастица золота) приводит к снижению предела обнаружения иммунохроматографической тест-системы в сэндвич формате.

Определены условия (схема введения и соотношения конъюгатов), при которых формирование комплексов конъюгатов наночастиц золота и магнитных наночастиц вызывает снижение предела обнаружения иммунохроматографического анализа.

Разработана иммунохроматографическая система для детекции *Ralstonia solanacearum*, высокая чувствительность которой обеспечивается благодаря увеличению размера маркера после формирования иммунных комплексов на тест-полоске.

Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая система для детекции *Erwinia amylovora* с использованием в качестве метки биметаллических наночастиц (Au-Pt), обладающих каталитическими пероксидазо-подобными свойствами.

Показано, что использование нескольких проб от одного растения значительно увеличивает достоверность иммунохроматографического анализа.

**Теоретическая и практическая значимость.** Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для детекции трех бактериальных фитопатогенов – возбудителей экономически значимых заболеваний: черной ножки картофеля, бурой гнили картофеля и бактериального ожога плодовых культур. Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для высокочувствительной детекции X- и Y- вирусов картофеля. Подходы, предложенные для разработки высокочувствительных тест-систем, могут быть использованы для других фитопатогенов. Проведенная апробация тест-систем свидетельствует об их эффективности для внелабораторного скрининга и выявления латентных инфекций.

### **Основные положения, выносимые на защиту.**

- 1) Условия получения поликлональных антител, специфичных к фитопатогенам.
- 2) Закономерности формирования иммунных комплексов с участием конъюгатов магнитных и золотых наночастиц в условиях иммунохроматографии.
- 3) Способы снижения пределов обнаружения иммунохроматографических тест-систем для детекции вирусных и бактериальных фитопатогенов.
- 4) Условия пробоотбора для иммунохроматографического анализа, повышающие достоверность выявления фитопатогенов.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на следующих мероприятиях: международная конференция «Biocatalysis: Fundamentals and Applications» (25-30 июня 2017 г, Московская обл.); Третий съезд аналитиков России (8-13 октября 2017 г., Москва); научно-практическая конференция «Инновационные процессы в сельском хозяйстве» (25-27 апреля 2019 г., Москва); международная конференция «16<sup>th</sup> International Symposium on Soil and Plant Analysis» (17-20 июня 2019 г., Вагенинген, Нидерланды); международная конференция «44th FEBS Congress» (6-11 июля 2019, Краков, Польша); IV Всероссийский Съезд по защите растений «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России» (9-11 сентября 2019 г., Санкт-Петербург); международная конференция «Mendeleev 2019 – XI International Conference on Chemistry for Young Scientists» (9-13 сентября 2019 г., Санкт-Петербург); международная конференция IUBMB «International Union of Biochemistry and Molecular Biology» Education Conference 2019 and 46th PSBMB «Philippine Society of Biochemistry and Molecular Biology» Annual Convention (13-15 ноября 2019 г., Манила, Филиппины); Первая Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений» (27-31 октября 2020 г., Ялта); IV Международная научно-практическая конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2020) (16-20 ноября 2020 г., Екатеринбург); XVI Международная научно-практическая конференция «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (9-10 февраля 2021 г., Барнаул).

**Публикация результатов исследования.** По результатам диссертационного исследования опубликовано 17 работ, из них 4 статьи в научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, 2 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, и 11 тезисов конференций.

**Личный вклад автора** заключается в проведении экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке материалов научных публикаций и написании диссертационной работы.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 154 страницах; состоит из введения, основной части, содержащей 42 рисунков, 9 таблиц, заключения, списка литературы, включающего 195 источников, и 2 приложения.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Введение.** Обоснована актуальность и научная новизна исследования, сформулированы цель и задачи, а также положения, выносимые на защиту.

**Глава 1. Обзор литературы.** В этой главе рассматриваются вопросы биологии бактериальных и вирусных фитопатогенов, их характеристики и морфология. Представлена информация о существующих методах детекции фитопатогенов, подробно рассмотрены устройство и применение иммунохроматографических тест-систем, а также основные системы амплификации, применимые для иммунохроматографического анализа.

### **Глава 2. Материалы и методы.**

**Антитела и антигены.** Все использованные антигены (бактерии и вирусы) были любезно предоставлены Н.В. Дреновой (ФГБУ Всероссийский центр карантина растений, Московская обл., п. Быково) и к.б.н. Ю.А. Варицевым (Федеральный исследовательский центр картофеля имени А.Г. Лорха, Московская обл., п. Красково).

Моноклональные антитела (мАт; клон 3G4), специфичные к ХВК, получены в ФИЦ биотехнологии РАН. Поликлональные антитела получены в результате работ по иммунизации кроликов и очистке иммуноглобулинов класса G (**IgG**) в ФИЦ Биотехнологии РАН совместно с Ю.А. Варицевым. Для этого кроликов породы шиншилла иммунизировали путем подкожной или внутримышечной инъекции иммуногена с добавлением полного адъюванта Фрейнда, а через 3-6 недель проводили внутримышечные инъекции с двухнедельными интервалами. Доза вирусов для всех инъекций составляла 50 мкг на животное, доза бактерий –  $5 \times 10^9$  КОЕ. Кровь собирали на 7–14 сутки после последней инъекции. IgG выделяли из сывороток с помощью осаждения сульфатом аммония с последующей очисткой на аффинной колонке с наполнителем белок А-сефароза. Метод иммуноферментного анализа (**ИФА**) использовали для характеристики сывороток и антител, выделенных из них.

**Синтезы и характеристики наночастиц и их конъюгатов.** Карбоксилированные магнитные наночастицы (**МНЧ**) приобретены у «Magsphere» (США). Наночастицы золота (**НЧЗ**) синтезированы методом цитратного восстановления золотохлористоводородной

кислоты, а наночастицы Au-Pt синтезированы восстановлением ионов Pt на поверхности полученных НЧЗ. Для синтеза конъюгатов МНЧ с антителами использовали метод ковалентной иммобилизации, а для конъюгаты биомолекул с НЧЗ и Au-Pt с антителами получали методом физической адсорбции.

Для характеристики (форма и размер) наночастиц и их конъюгатов применяли просвечивающую электронную микроскопию (ПЭМ) с использованием микроскопа JSM 6510LV (JEOL, Япония) и динамическое лазерное светорассеяние (ДЛСР) с использованием Zetasizer Nano (Malvern Panalytical, Великобритания).

**Изготовление иммунохроматографических тест-систем.** Тест-полоски представляли собой композиты из впитывающей мембраны для пробы, стекловолоконной мембраны для конъюгата наночастиц с антителами, нитроцеллюлозной рабочей мембраны и конечной адсорбирующей мембраны.

На нитроцеллюлозной мембране в тестовой зоне адсорбировали специфичные антитела к антигену (1 мг/мл), а в контрольной зоне – антивидовые антитела или белок А (0,5 мг/мл). Реагенты наносили с использованием диспенсера IsoFlow (Image Technology, США) из расчета 0,15 мкл на 1 мм ширины мембраны. Мембраны сушили при 37°C в течение 8 часов.

**Подготовка проб для тестирования.** Для приготовления экстрактов 1 г листа или клубня добавляли к 10 мл 50 мМ фосфатный буфер солевой, содержащий 0,05% Тритона X-100 (ФБС-Т) и тщательно гомогенизировали. После этого экстракты центрифугировали (5000 g, 5 мин). При работах в полевых условиях 1-2 см<sup>2</sup> листа отрезали, помещали в пластиковый пакет с проволочной сеткой и 1 мл ФБС-Т и растирали внешним давящим предметом до полной гомогенизации.

**Проведение ИХА.** При стандартном ИХА тест-полоску погружали в пробу (буфер или растительный экстракт) объемом не менее 70 мкл. Через 10-15 мин результат оценивали визуально – одна или две окрашенные полосы свидетельствовали об отрицательном или положительном результате, соответственно.

*ИХА с предварительным смешиванием* отличался тем, что пробу (64 мкл) смешивали с конъюгатом НЧЗ с антителами (6 мкл), после чего погружали в полученную смесь тест-полоску без стекловолоконной мембраны.

*ИХА с использованием МНЧ.* Конъюгат МНЧ с антителами (20 мкл) инкубировали с пробой (80 мкл) в течение 10 мин. Затем в полученную смесь погружали тест-полоску без стекловолоконной мембраны.

**ИХА с двойным усилением.** Пробу (1000 мкл) смешивали с конъюгатом МНЧ с антителами (20 мкл), инкубировали в течение 25 мин при комнатной температуре и

постоянном перемешивании. Затем с помощью магнита концентрировали смеси. Несвязавшиеся компоненты (надосадки) удаляли, агрегаты МНЧ ресуспендировали в 100 мкл буфера и добавляли конъюгат НЧЗ со стрептавидином. В полученную смесь погружали тест-полоску без стекловолоконной мембраны.

*ИХА с золотым усилением.* Тест-полоску, полученную по обычной методике, погружали в пробу, через 10 мин наносили 20 мкл усиливающего раствора, содержащего равные объемы 2 мМ гидроксилamina и 1% золотохлористоводородной кислоты, выдерживали 3 мин, промывали водой, оценивали результат.

*ИХА с Au-Pt-нанозимным усилением.* Тест-полоску погружали в пробу и через 10 мин оценивали результат. После этого на рабочую мембрану наносили 20 мкл хромогенного субстрата на основе 3,3'-диаминобензидина. Через 5 мин снова проводили оценку результата.

**Обработка данных ИХА.** Тест-полоски сканировали и использовали программу TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics, Великобритания) для измерения интенсивности окрашивания тестовых зон. Полученные значения преобразовывали в зависимости сигнала от концентрации с использованием программы OriginPro 9.0 (OriginLab, США).

### Глава 3. Результаты и обсуждение

**Получение и характеристика сывороток.** Для получения поликлональных антител проводили иммунизацию кроликов очищенными препаратами YBK, *D. solani*, *E. amylovora* (штамм CFBP 1430) и *R. solanacearum* (штамм RS 0249).

В результате иммунизации получили по 4 сыворотки к *D. solani* и *E. amylovora* и по 2 сыворотки к *R. solanacearum* и YBK. Все сыворотки проверяли методом ИФА. На рис. 1 представлены результаты ИФА, проведенного при сорбции бактерий ( $10^8$  КОЕ/мл) и вирусов (1 мкг/мл) в лунках микропланшетов. Титром сыворотки считали значение разбавления, соответствующее сумме среднего значения оптической плотности при длине волны 450 нм ( $OP_{450}$ ) и трех стандартных отклонений для отклика сыворотки, служившей отрицательным контролем. Все полученные сыворотки показали высокие титры – от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ .



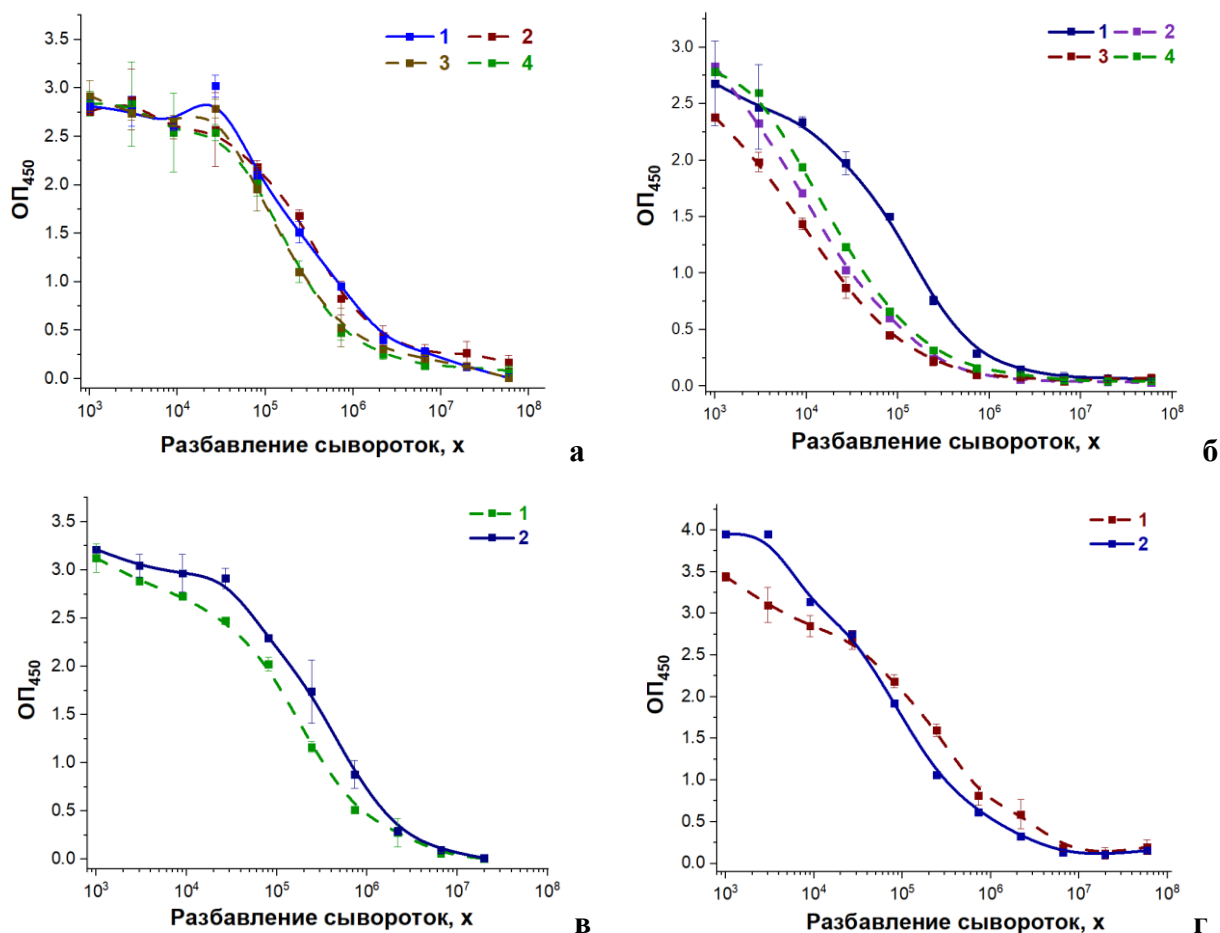


Рисунок 1 – Иммуноферментное тестирование сывороток, специфичных к *Dickeya* spp. (а), *E. amylovora* (б), *R. solanacearum* (в) и УВК (г). 1-4 – номера сывороток для каждого фитопатогена

**Выделение и характеристика антител к изучаемым фитопатогенам.** IgG были выделены из полученных сывороток. Антиген-связывающую активность антител определяли методом «сэндвич» ИФА, формируя в лунках микропланшета комплекс состава [сорбированные специфические антитела – антиген – специфические антитела с биотиновой меткой – конъюгат стрептавидин-пероксидаза].

Минимальная концентрация *E. amylovora*, детектируемая в ИФА, составила  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл (рис. 2-а); *Dickeya* spp. –  $8 \times 10^4$  КОЕ/мл; *R. solanacearum* –  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл. Для УВК эта величина равнялась 4 нг/мл в буфере (рис. 2-б, кривая 1) и в растительном экстракте (рис. 2-б, кривая 2).

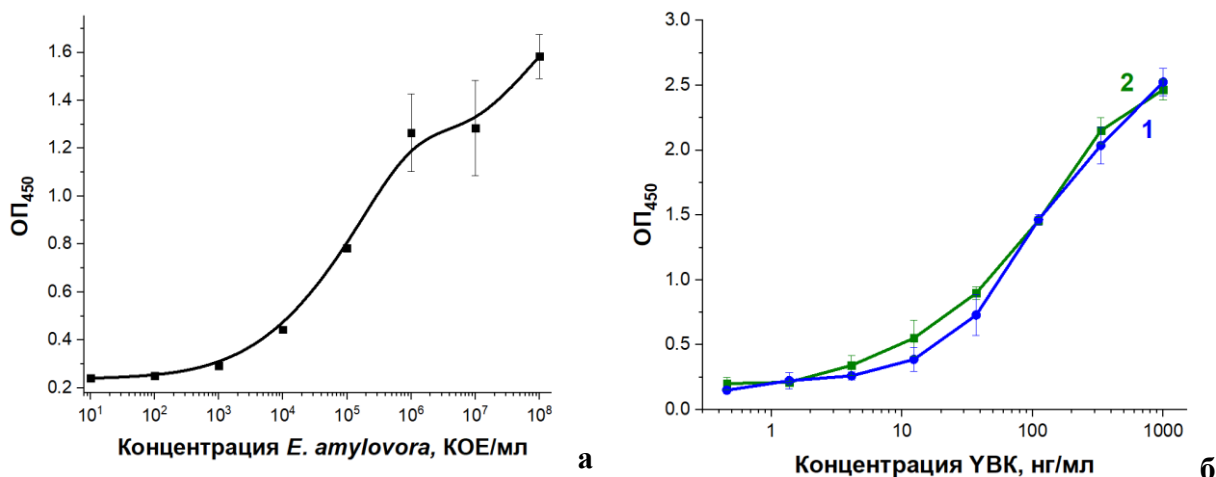
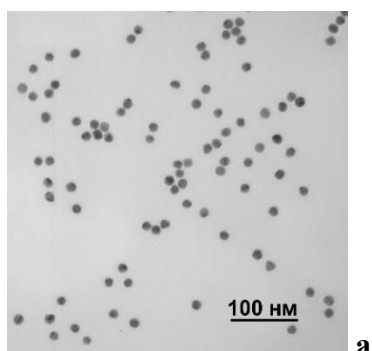
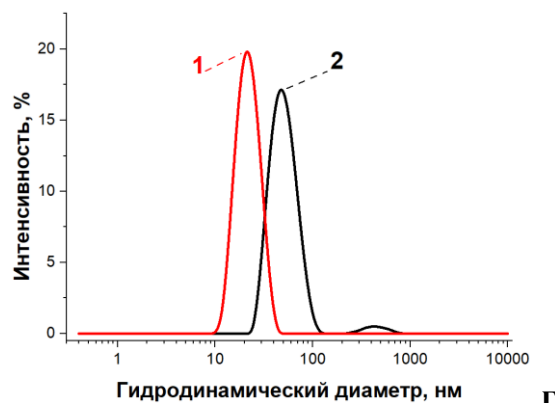


Рисунок 2 – Концентрационные зависимости связывания антигенов со специфическими антителами в «сэндвич»-формате ИФА. ПАТ-1, специфичные к *E. amylovora* (а); ПАТ-2, специфичные к YVK (б). 1 – буфер, 2 – растительный экстракт

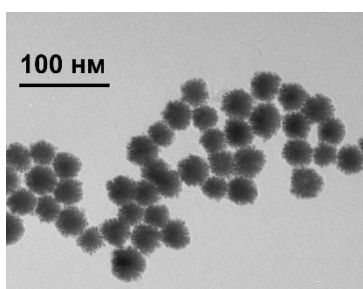
**Синтез и характеристика наночастиц.** В работе использовали наночастицы разной природы: НЧЗ, Au-Pt и МНЧ. Средний диаметр синтезированных НЧЗ согласно данным ПЭМ, составил  $17,4 \pm 1,0$  нм (рис. 3-а), средний диаметр Au-Pt –  $34,3 \pm 2,8$  нм (рис. 3-б). Спектрофотометрическая характеристика препаратов НЧЗ показала наличие одного пика поглощения с максимумом при длине волны 520 нм, характерным для НЧЗ данного размера. Диаметр МНЧ, установленный методом ПЭМ, составил 150-500 нм (рис. 3-в). Гомогенность НЧЗ, Au-Pt и МНЧ, а также отсутствие агрегатов в растворе проверены методом ДЛСР (рис. 3-г, 3-д, 3-е), которым также охарактеризовали размеры наночастиц. Средний гидродинамический диаметр составил 19,5 нм для НЧЗ, 48 нм для Au-Pt и 712 нм для МНЧ. Приведенные результаты свидетельствуют о монодисперсности всех препаратов наночастиц, что важно для эффективного синтеза их конъюгатов.



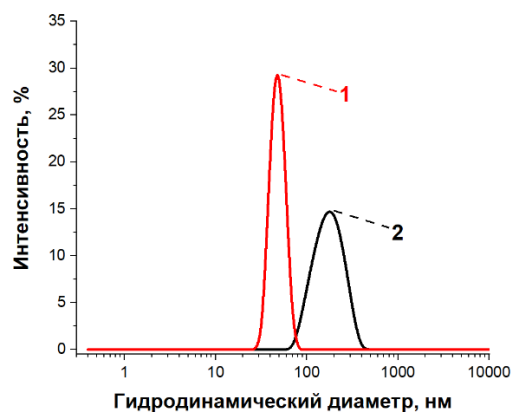
а



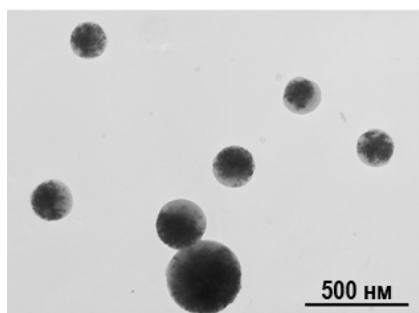
г



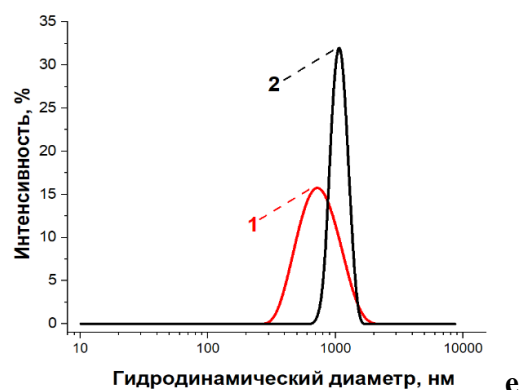
б



д



в



е

Рисунок 3 – Характеристика наночастиц и их конъюгатов с антителами. Фотографии НЧЗ (а), Au-Pt (б) и МНЧ (в), полученные методом ПЭМ. Распределения гидродинамических диаметров, полученные методом ДЛСР для наночастиц (1) и их конъюгатов (2): НЧЗ (г), Au-Pt (д) и МНЧ (е)

**Синтез конъюгатов наночастиц с биомолекулами (антитела, стрептавидин).**

Для синтеза конъюгатов использовали методы физической адсорбции, ковалентной иммобилизации и иммобилизации с помощью высокоаффинных молекулярных модулей (биотин – стрептавидин, антитело – антивидовое антитело). В результате было получено 7 типов конъюгатов, перечень и структурные характеристики которых даны в таблице 1. Сдвиг распределений гидродинамических диаметров при сравнении исходных наночастиц и их конъюгатов с антителами, специфичными к *E. amylovora* (см. рис. 3), свидетельствует об успешной модификации наночастиц. Функциональную активность конъюгатов

подтверждали методом ИФА – формированием в лунках микропланшетов комплексов [сорбированный патоген – конъюгат наночастиц с антителами – антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой] при разных концентрациях конъюгатов. Показано, что все конъюгаты антител распознают соответствующие антигены.

Таблица 1. Конъюгаты наночастиц с биомолекулами и их характеристики

Наночастицы (маркеры)			Конъюгаты	
Тип	ПЭМ, средний диаметр, нм	ДЛСР, средний диаметр, нм	Конъюгированные биомолекулы	ДЛСР, средний диаметр, нм
МНЧ	440	712	Биотинилированные мАт, специфичные к ХВК	1110 нм
НЧЗ	17,4	19,5	Стрептавидин, пАт, специфичные к ХВК, УВК, <i>D. solani</i> , <i>E. amylovora</i> и <i>R. solanacearum</i>	47,2 – 91,3 нм
Au-Pt	34,3	48,4	пАт, специфичные к <i>E. amylovora</i>	164,2 нм

Охарактеризовано также взаимодействие конъюгатов НЧЗ – стрептавидин и МНЧ – биотинилированные антитела. Электронные микрофотографии (рис. 4) отражают присутствие НЧЗ на поверхности МНЧ и агрегацию МНЧ, индуцируемую НЧЗ (рис. 4), что подтверждает биотин-связывающие свойства конъюгата НЧЗ – стрептавидин.

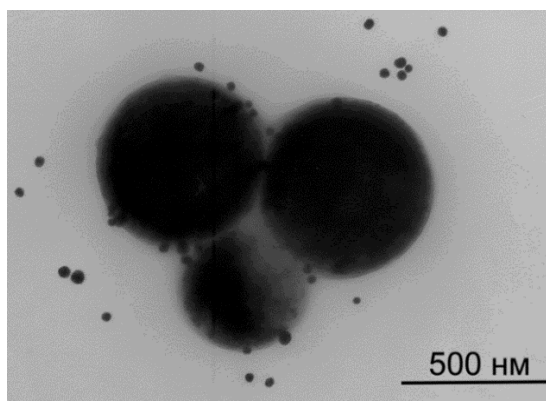


Рисунок 4 – Изображение ПЭМ – агрегат конъюгатов МНЧ и НЧЗ

**Разработка иммунохроматографических тест-систем для детекции фитопатогенов.** Бактериальные и вирусные фитопатогены являются корпускулярными поливалентными объектами, несущими на своей поверхности множество антигенных детерминант. Поэтому в разработанных иммунохроматографических тест-системах для их детекции мы использовали сэндвич-анализ, основанный на формировании тройных детектируемых комплексов [антитело, иммобилизованное в тестовой зоне тест-полоски, – фитопатоген – антитело с нанодисперсной меткой] (рис. 5).

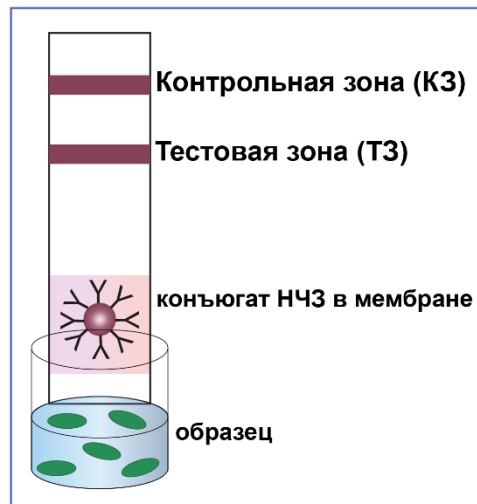


Рисунок 5 – Схема сэндвич формата ИХА

**ИХА для детекции *Dickeya* spp.** В тест-системе использовали поликлональные антитела, конъюгированные с НЧЗ. Разработанная тест-система не только эффективно выявляла клетки *D. solani*, использованные при иммунизации, но и другие фитопатогенные бактерии рода *Dickeya*: *D. dianthicola*, *D. chrysanthemi*, *D. dadantii* subsp. *dadantii*, *D. dadantii* subsp. *dieffenbachiae*, *D. paradisiaca*. В случае *D. zeaе* также регистрировалось связывание, но сигнал был в 7 раз слабее, чем для *D. solani*. Для 15 фитопатогенных бактерий родов *Ralstonia*, *Clavibacter*, *Pectobacterium* и *Pseudomonas* показано отсутствие перекрестных реакций. Предел обнаружения составил  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл для *D. solani* (рис. 6), что соответствует требованиям ГОСТ к иммуноаналитическим методам. Время анализа — 15 мин.

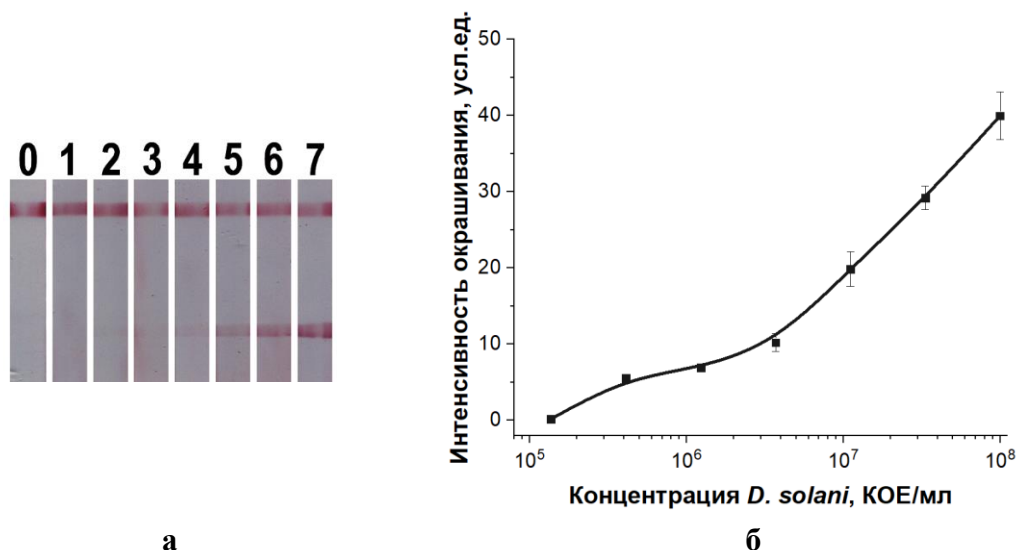


Рисунок 6 – Тест-полоски после анализа проб, содержащих разное количество клеток *D. solani*: 0 — отрицательный контроль; 1 —  $1,4 \times 10^5$ ; 2 —  $4,1 \times 10^5$ ; 3 —  $1,2 \times 10^6$ ; 4 —  $3,7 \times 10^6$ ; 5 —  $1,1 \times 10^7$ ; 6 —  $3,3 \times 10^7$ ; 7 —  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл (а), и соответствующая зависимость интенсивности окрашивания тестовых зон от концентрации *D. solani* (б)

Для апробации разработанной тест-системы использовали партии семенного картофеля, собранные из разных регионов (Московская, Орловская, Брянская области и Киргизия). При тестировании 43 проб иммунохроматография подтвердила положительные результаты иммуноферментного тестирования в 75%, а отрицательные — в 100% случаев.

**ИХА для детекции *E. amylovora*.** В тест-системе использовали поликлональные антитела, конъюгированные с НЧЗ. Специфичность антител проверяли методом ИХА, используя в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл несколько штаммов *E. amylovora*: CFBP 1430, ВНИИКР РСЕ1, ВНИИКР РСЕ6, и ВНИИКР VRE33, а также близкородственные виды рода *Erwinia* (*E. tasmaniensis*, *E. piriflorinigrans*, *E. billingiae*). Все штаммы *E. amylovora* показали сильное окрашивание в тестовой зоне тест-полоски. *E. tasmaniensis* и *E. billingiae* дали слабый положительный сигнал, что объясняется похожей структурой генома, тогда как для *E. piriflorinigrans* результат ИХА был отрицательным. Также были протестированы препараты неблизкородственных бактерий: *Rahnella aquatilis*, *Dickeya solani*, *Dickeya dianthicola*, *Pectobacterium atrosepticum*, *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* в концентрации  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл. Все результаты были отрицательными, что свидетельствовало о высокоспецифичном выявлении *E. amylovora* разработанным методом ИХА.

При апробации тест-системы сравнивали результаты, полученные для чистого антигена и экстрактов искусственно зараженных листьев яблони (рис. 7). Для обоих вариантов предел обнаружения составил  $4 \times 10^5$  КОЕ/мл.

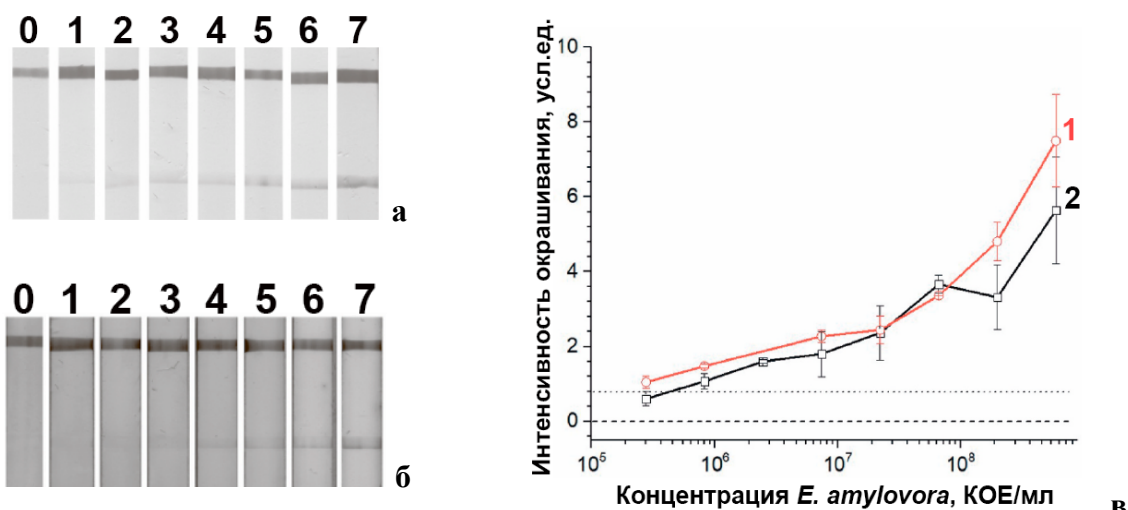


Рисунок 7 – ИХА *E. amylovora*. Внешний вид тест-полосок после проведения анализа в буфере (а) и в растительном экстракте (б). Тест-полоска 0 – отрицательный контроль, 1 –  $8 \times 10^5$ ; 2 –  $2 \times 10^6$ ; 3 –  $7 \times 10^6$ ; 4 –  $2 \times 10^7$ ; 5 –  $6 \times 10^7$ ; 6 –  $2 \times 10^8$ ; 7 –  $6 \times 10^8$  КОЕ/мл.

Концентрационные зависимости интенсивности окрашивания в тестовой зоне для *E. amylovora* в буфере (в-1) и в растительном экстракте (в-2)

Кроме того, было протестировано 31 растение – яблоко, груша, терновник, айва, боярышник и вишня. Для каждого растения брали от 2 до 9 проб, относящихся к разным органам – листья, веточка, кора, плоды, цветы и экссудат, всего – 121 проба. На рис. 8 представлены типичные изображения всех тестируемых частей растений и тест-полоски после анализа. Методом ИХА выявлено присутствие *E. amylovora* у 28 растений, методом ПЦР – у 30 растений. Использование нескольких проб от одного растения (кластер) значительно повысило точность обнаружения зараженных растений, совпадение результатов ИХА и ПЦР для отдельных проб составило 70,2%, а для кластеров – 93,5%. Также в результате тестирования разных частей растений установлено, что вероятность обнаружения инфекции при тестировании сосудистых частей растений на 20% выше, чем при тестировании листьев.

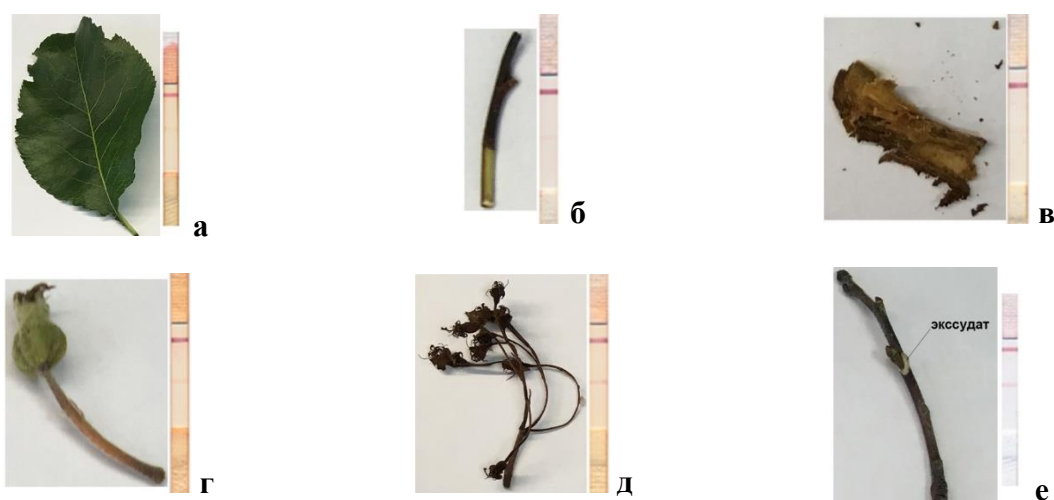


Рисунок 8 – Пробы из разных частей растений и изображения тест-полосок по результатам ИХА. Лист (а); веточка (б); кора (в); плоды (г), цветы (д); экссудат (е)

Достигнутые чувствительности тест-систем соответствуют требованиям, предъявляемым фитосанитарными нормативами к ИХА, однако не позволяют рассчитывать на выявление инфекции у бессимптомных растений. Для снижения предела обнаружения мы использовали несколько амплифицирующих подходов, далее рассмотренных для выбранных примеров патогенов.

**ИХА с предварительным смешиванием для детекции УВК.** Стандартный ИХА УВК характеризовался пределом обнаружения 333 нг/мл (рис. 9-а, -г, кривая 1), что может объясняться низкой аффинностью антител. Поэтому востребовано было снижение предела обнаружения, для которого использовали предварительное смешивание иммунореагентов (см. рис. 10). Эта стадия позволяет агрегировать поливалентные структуры (вирусы и конъюгат НЧЗ-антитело), что приводит к увеличению сигнала. Варьирование времени инкубации от 30 сек до 15 мин не вызывало значимых отличий, но во всех случаях связывание метки в тестовой зоне значительно возрастало. Для выбранного минимального

времени инкубации – 30 сек – предел обнаружения УВК составил 12 нг/мл (рис. 9-б, -г, кривая 2, а при апробации в растительном экстракте снизился до 5,4 нг/мл (рис. 9-в, -г, кривая 3). Как видим, предварительное образование комплексов конъюгатов НЧЗ с вирусами способствовало лучшему последующему накоплению конъюгата в тестовой зоне в составе тройных комплексов. Возможной причиной этого эффекта была агрегация (образование разветвленных комплексов вирусных частиц и конъюгатов антител с НЧЗ), характерная для поливалентных взаимодействий. Образующиеся в результате предварительного смешивания конъюгата с пробой крупные агрегаты обеспечивали более высокие концентрации НЧЗ в тестовой зоне, большую интенсивность окрашивания и благодаря этому снижали предел обнаружения.

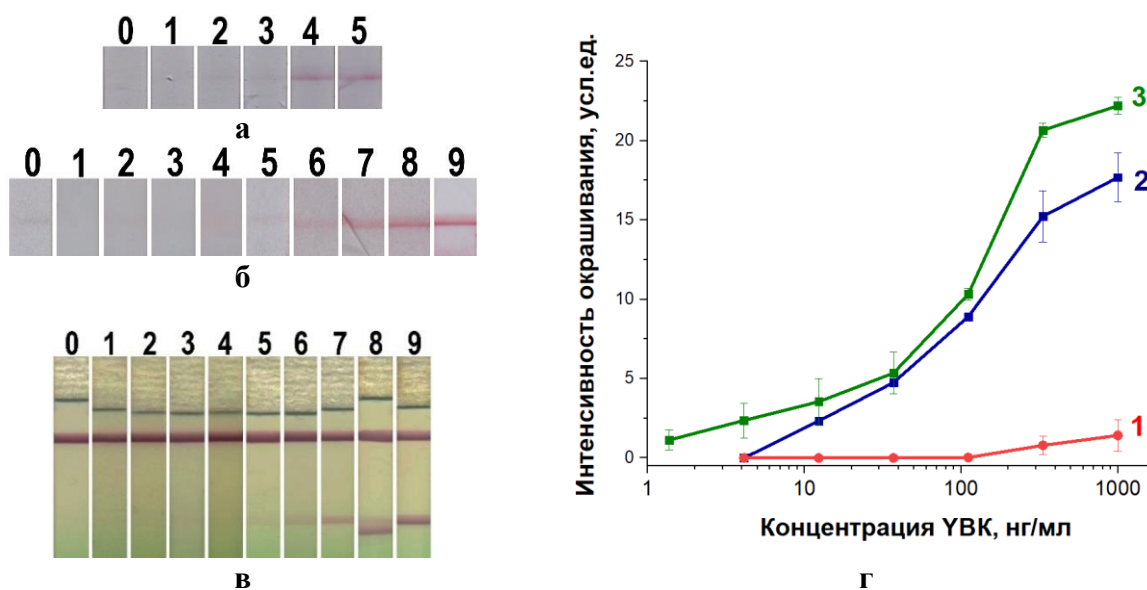


Рисунок 9 – ИХА УВК. Внешний вид тест-полосок после стандартного ИХА (а), тест-полоска 0 – отрицательный контроль; 1 – 12, 2 – 37; 3 – 111; 4 – 333; 5 – 1000 нг/мл. ИХА с предварительным смешиванием в буфере (б) и растительном экстракте (в). Тест-полоска 0 – отрицательный контроль, 1 – 0,2; 2 – 0,5; 3 – 1,4; 4 – 4; 5 – 12; 6 – 37; 7 – 111; 8 – 333; 9 – 1000 нг/мл. Концентрационные зависимости (г) для стандартного ИХА (г-1) и ИХА с предварительным смешиванием в буфере (г-2) и растительном экстракте (г-3)

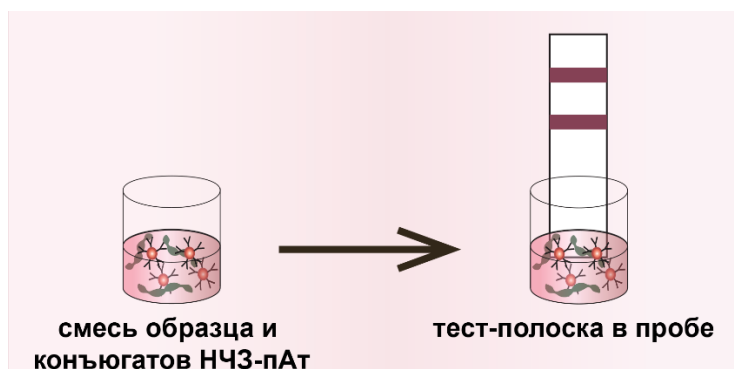


Рисунок 10 –. Схема ИХА с предварительным смешиванием



При тестировании экстрактов инфицированных листьев картофеля (21 проба) с использованием ИХА с предварительным смешиванием и коммерческого ИФА вирус был выявлен во всех пробах обоими методами, количественные результаты имели высокий уровень корреляции ( $R^2 = 0,891$ ) (рис. 11).

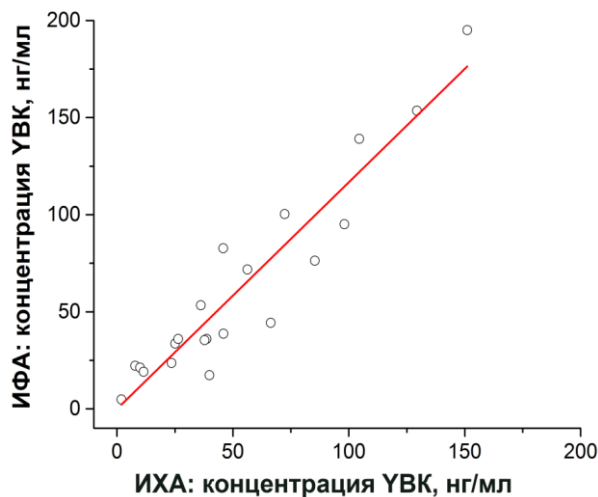


Рисунок 11 – Корреляция концентраций УВК в экстрактах листьев картофеля, определенных методами ИХА и ИФА. Кружки – экспериментальные данные; сплошная линия – линейная аппроксимация

**ИХА с двойным усилением для детекции ХВК.** Разработанный стандартный ИХА позволял выявлять до 8 нг/мл ХВК (рис. 12-а, -г). Для снижения предела обнаружения было предложено концентрирование МНЧ в магнитном поле, агрегация МНЧ с НЧЗ и сочетание этих подходов – двойное усиление (табл. 3, строки 2-4, соответственно). Схема двойного усиления показана на рис. 13. В результате оптимизации определены соотношения конъюгатов МНЧ-биотинилированные антитела и НЧЗ-стрептавидин, приводящие к снижению пределов обнаружения. Реализованные тест-системы сравнили на серии разведений ХВК (от 0 до 125 нг/мл) в буфере. Как видно из таблицы 3, использование двух предложенных подходов по отдельности снижало предел обнаружения ХВК в 2 раза, а их сочетание – в 32 раза, до 0,25 нг/мл.

Таблица 3. Сравнение способов амплификации при проведении ИХА ХВК

№	Вариант ИХА	Предел обнаружения	
		в буфере	в экстракте
1	Стандартный ИХА	8 нг/мл	-
2	Концентрирование МНЧ в магнитном поле – <b>да</b> Агрегация МНЧ с НЧЗ – <b>нет</b>	4 нг/мл	-
3	Концентрирование МНЧ в магнитном поле – <b>нет</b> Агрегация МНЧ с НЧЗ – <b>да</b>	4 нг/мл	4 нг/мл

4	Концентрирование МНЧ в магнитном поле – да Агрегация МНЧ с НЧЗ – да	0,25 нг/мл	0,25 нг/мл
---	--	------------	------------

Апробация двух наиболее перспективных вариантов амплификации – агрегация МНЧ с НЧЗ (рис. 12-б, -в, -д) и двойное усиление – показала сохранение при тестировании экстрактов пределов обнаружения, достигнутых для проб вируса в буфере.

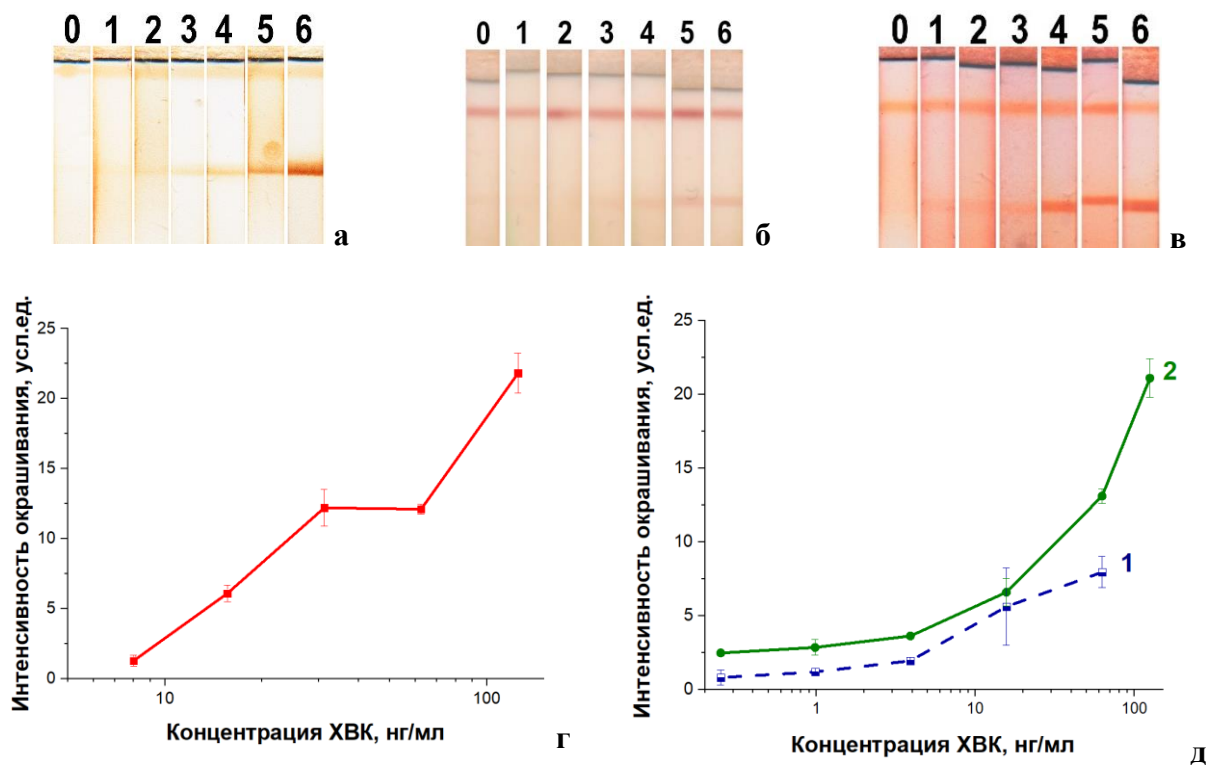


Рисунок 12 – ИХА ХВК. Внешний вид тест-полосок после проведения анализа: без усиления в буфере (а), и с амплификацией в растительном экстракте – агрегация МНЧ и НЧЗ (б), без концентраций МНЧ в магнитном поле, и двойное усиление (в). Тест полоска 0 – отрицательный контроль; 1 – 0,25; 2 – 1; 3 – 4; 4 – 16; 5 – 63; 6 – 125 нг/мл ХВК.

Зависимости интенсивности окрашивания в тестовой зоне от концентрации ХВК (от 0 до 125 нг/мл): ИХА без усиления в буфере (г); в растительном экстракте (д-1) – с агрегацией МНЧ с НЧЗ и без концентрирования МНЧ в магнитном поле, и – с двойным усилением (д-2)

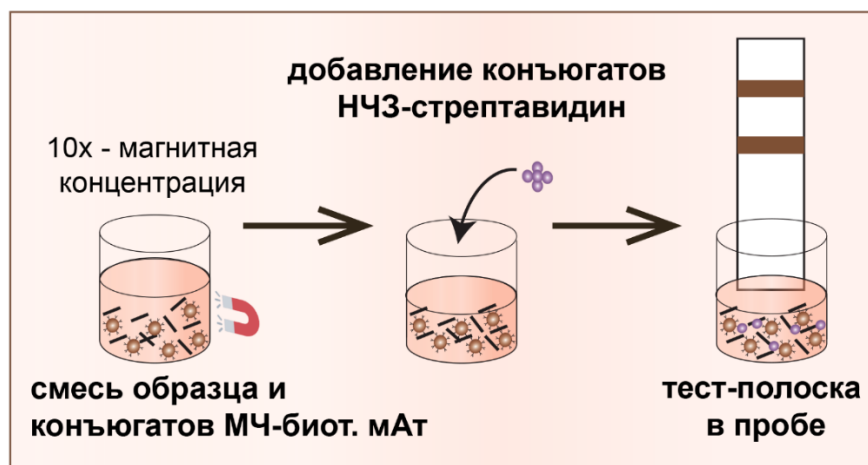


Рисунок 13 – Схема ИХА с двойным усилением.

При тестировании экстрактов инфицированных листьев картофеля (40 проб) с использованием ИХА с двойным усилением и коммерческого ИФА вирус был выявлен во всех пробах обоими методами; количественные результаты имели высокий уровень корреляции ( $R^2 = 0,935$ ) (рис. 14).

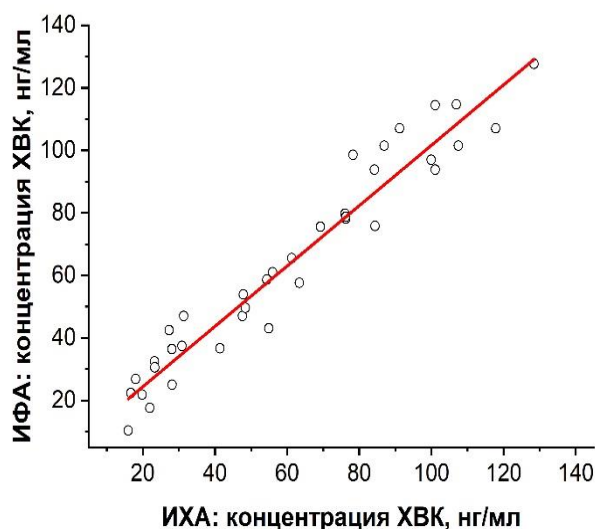


Рисунок 14 – Корреляция концентраций ХВК в экстрактах листьев картофеля, определенных методами ИХА и ИФА. Кружки – экспериментальные данные; сплошная линия – линейная аппроксимация

**ИХА с увеличением размеров НЧЗ после анализа для детекции *R. solanacearum*.**

Предел обнаружения *R. solanacearum* в стандартном ИХА составил  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл (рис. 15-а, -в, кривая 1). Для его снижения использовали амплификацию, основанную на увеличении размеров НЧЗ после анализа («золотое усиление»). После проведения стандартного ИХА в тестовую зону добавляли раствор, содержащий гидросиламин и  $\text{HAuCl}_4$ . На поверхности НЧЗ ионы тетрахлоаурата (III) восстанавливались гидросиламином. В результате на конъюгате НЧЗ, связанном в тестовой зоне,

формировалось дополнительное золотое покрытие. Схема ИХА с усилением показана на рис. 16. Увеличение размера маркера обеспечивало его лучшую детекцию и 50-кратное снижение предела обнаружения *R. solanacearum* в буфере – до  $2 \times 10^4$  КОЕ/мл. Для апробации разработанного подхода был использован экстракт клубней картофеля. Предел обнаружения в системе с амплификацией снижался в 33 раза – до  $3 \times 10^4$  КОЕ/мл (рис. 15-б, -в, кривая 2).

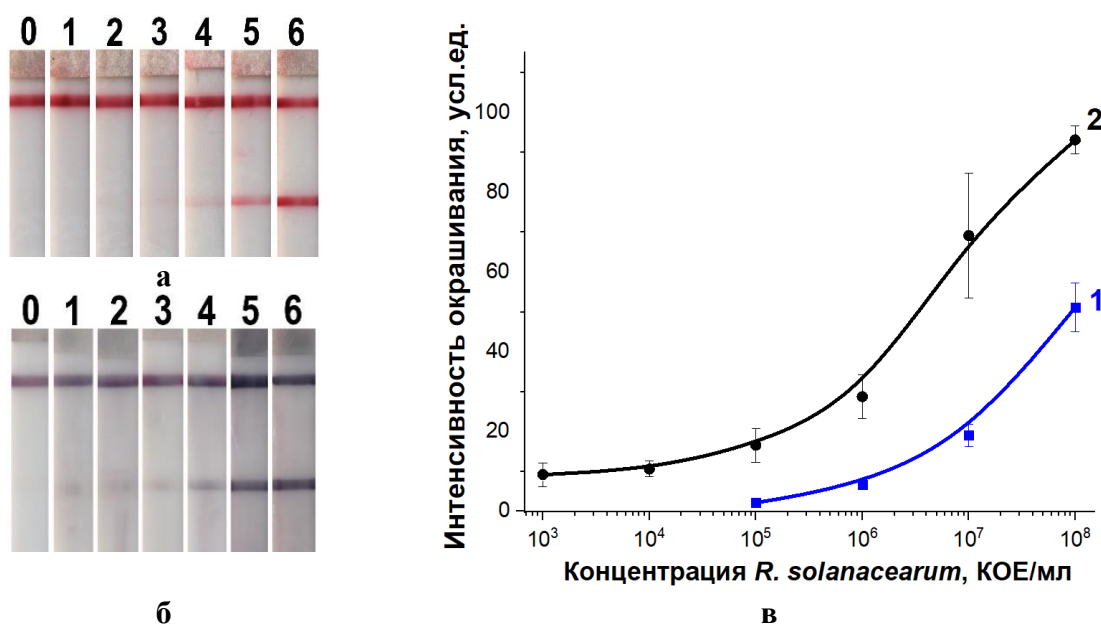


Рисунок 15 – ИХА *R. solanacearum* в растительном экстракте. Внешний вид тест-полосок после проведения анализа: ИХА без амплификации (а), и ИХА с амплификацией (б). Тест-полоска 0 – отрицательный контроль; 1 –  $1 \times 10^3$ ; 2 –  $1 \times 10^4$ ; 3 –  $1 \times 10^5$ ; 4 –  $1 \times 10^6$ ; 5 –  $1 \times 10^7$ ; 6 –  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. Зависимость интенсивности окрашивания в тестовой зоне от концентрации бактерий – без амплификации (в-1), – с амплификацией (в-2)

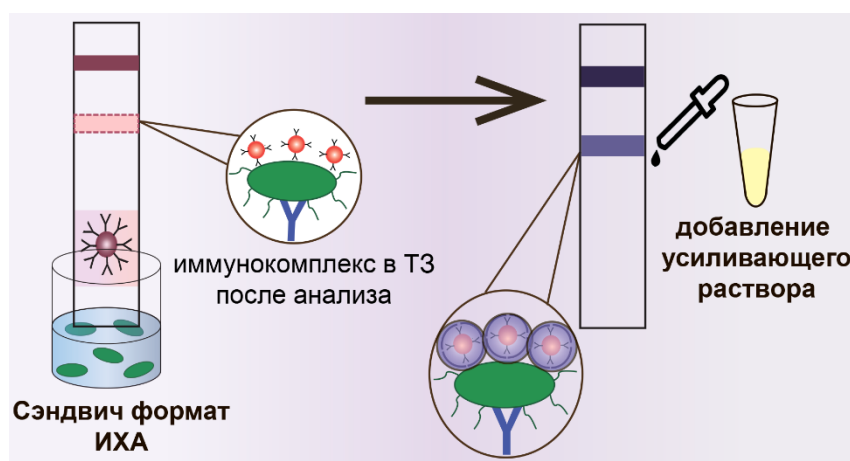


Рисунок 16 –. Схема ИХА с золотым усилением

Стандартный и амплифицированный ИХА использовали для детекции *R. solanacearum* в экстрактах искусственно инфицированных клубней картофеля ( $n = 18$ ). Для

обоих методов показана хорошая корреляция известных добавленных и выявленных концентраций бактериальных клеток ( $R^2 = 0,99834$  и  $0,93943$ , соответственно) – см. рис. 17.

### Денги

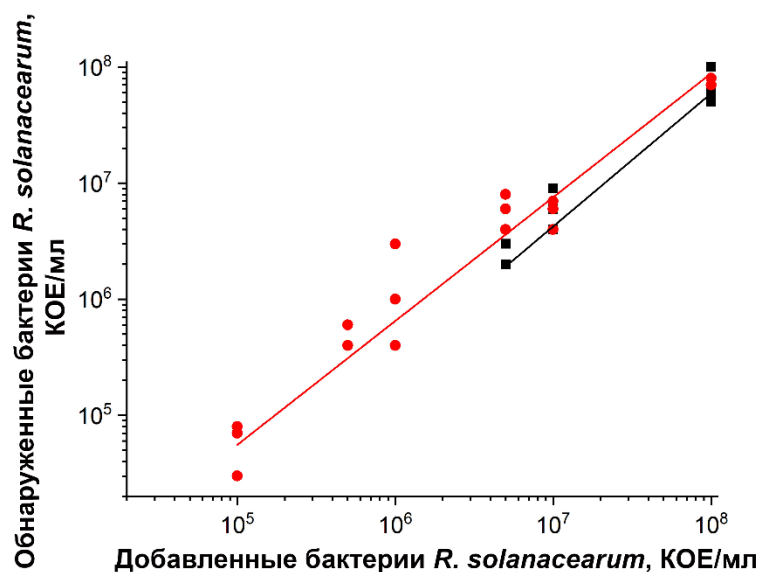


Рисунок 17 – Корреляция между добавленными и выявленными концентрациями *R. solanacearum* для ИХА до (черная линия) и после (красная линия) увеличения размеров маркера НЧЗ

**ИХА с Au-Pt-нанозимным усилением для детекции *E. amylovora*.** Для снижения предела обнаружения ИХА *E. amylovora* использовали в качестве метки Au-Pt нанозим, обладающий каталитической (пероксидазо-подобной) активностью. После стандартного ИХА в тестовую зону добавляли субстратную смесь на основе диаминобеззидина, который трансформировался нанозимом в окрашенный продукт, усиливая оптический сигнал. Схема ИХА с усилением представлена на рис. 18. Анализ проводили в экстракте листьев яблони, к которому добавляли клетки *E. amylovora*. Предел обнаружения после первого этапа составил  $5 \times 10^4$  КОЕ/мл, что в 8 раз ниже по сравнению с ИХА с теми же ПАТ и НЧЗ в качестве метки. При добавлении субстрата в тестовую зону каталитическая активность нанозима привела к образованию нерастворимого темно-коричневого продукта окисления и значительному росту интенсивности окрашивания. Предел обнаружения *E. amylovora* снизился в 10 раз, до  $5 \times 10^3$  КОЕ/мл (рис. 19).

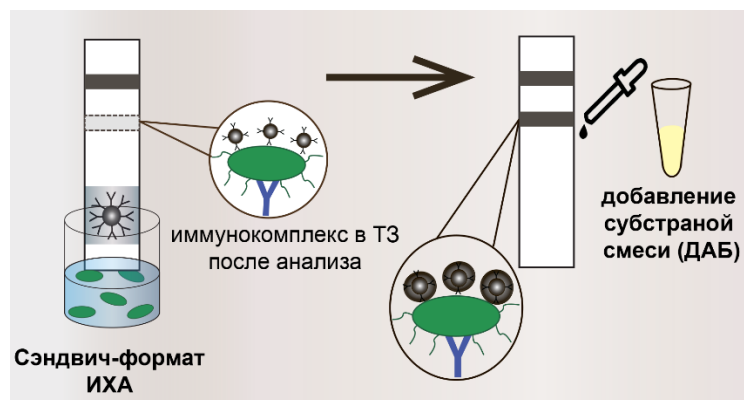


Рисунок 18 – Схема ИХА с Au-Pt-нанозимным усилением

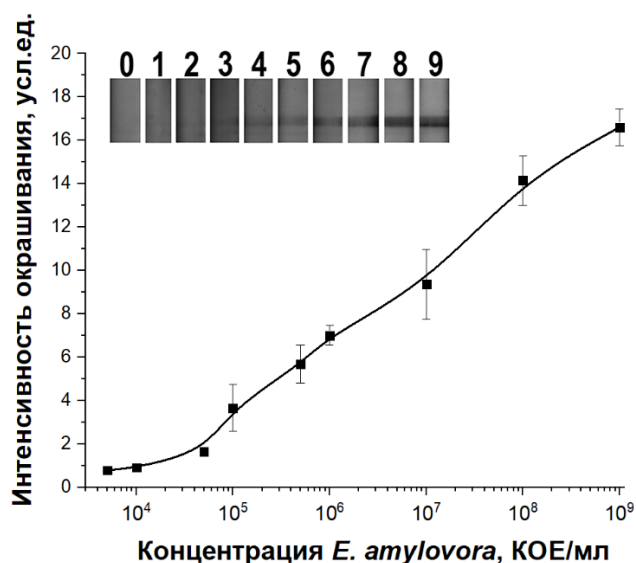


Рисунок 19 – Внешний вид тест-полосок после усиления ИХА для разных концентраций *E. amylovora* (0 – отрицательный контроль; 1 –  $5 \times 10^3$ , 2 –  $1 \times 10^4$ , 3 –  $5 \times 10^4$ , 4 –  $1 \times 10^5$ , 5 –  $5 \times 10^5$ , 6 –  $1 \times 10^6$ , 7 –  $1 \times 10^7$ , 8 –  $1 \times 10^8$ , 9 –  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл) и соответствующая зависимость интенсивности окрасивания тестовых зон от концентрации бактерий

### Заключение

На основании проведенного исследования можно сделать следующие выводы:

- 1) Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции *Dickeya* spp. с пределом обнаружения от  $2 \times 10^5$  КОЕ/мл (*D. solani*) и временем анализа 15 мин.
- 2) Разработана иммунохроматографическая тест-система для детекции *E. amylovora* с пределом обнаружения  $4 \times 10^5$  КОЕ/мл и продолжительностью 10 мин. Предложены правила проведения пробоотбора для детекции *E. amylovora* методом ИХА (анализ проб, объединённых в кластеры; анализ сосудистых тканей), повышающие достоверность ИХА на 20%.
- 3) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции *E. amylovora*, в которой амплификационный подход, основанный на каталитической активности Au-Pt-нанозима и требующий 5 мин, снижает предел

обнаружения *E. amylovora* в 10 раз относительно тест-системы с Au-Pt-меткой без амплификации и в 80 раз относительно тест-системы с НЧЗ меткой – до  $5 \times 10^3$  КОЕ/мл.

- 4) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции YBK, в которой амплификационный подход, основанный на предварительном смешивании пробы и конъюгата НЧЗ с антителами, снижает предел обнаружения YBK в 60 раз – до 5,4 нг/мл.
- 5) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции ХВК, в которой амплификационный подход, основанный на концентрировании МНЧ в магнитном поле и агрегации МНЧ и НЧЗ, снижает предел обнаружения ХВК в 32 раза – до 0,25 нг/мл.
- 6) Разработана высокочувствительная иммунохроматографическая тест-система для детекции *R. solanacearum*, в которой амплификационный подход, основанный на увеличении размера НЧЗ после анализа в течение 3 минут, снижает предел обнаружения *R. solanacearum* в 33 раза – до  $3 \times 10^4$  КОЕ/мл.

#### Список опубликованных работ по теме диссертации

*Статьи в изданиях, индексируемых Scopus и Web of Science*

1. **Razo S.C.** Double-enhanced lateral flow immunoassay for potato virus X based on a combination of magnetic and gold nanoparticles / **S.C. Razo**, V.G. Panferov, I.V. Safenkova, Y.A. Varitsev, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Analytica Chimica Acta*. – **2018**. – Vol. 1007. – P. 50-60.
2. **Razo S.C.** How to improve sensitivity of sandwich lateral flow immunoassay for corpuscular antigens on the example of potato virus Y? / **S.C. Razo**, V.G. Panferov, I.V. Safenkova, Y.A. Varitsev, A.V. Zherdev, E.N. Pakina, B.B. Dzantiev // *Sensors*. – **2018**. – Vol. 18(11). – Article 3975.
3. **Razo S.C.** Enlargement of gold nanoparticles for sensitive immunochromatographic diagnostics of potato brown rot. / **S.C. Razo**, N.A. Panferova, V.G. Panferov, I.V. Safenkova, N.V. Drenova, Y.A. Varitsev, A.V. Zherdev, E.N. Pakina, B.B. Dzantiev // *Sensors*. – **2019**. Vol. 19(1). – P. 153.
4. **Razo S.C.** New lateral flow immunoassay for on-site detection of *Erwinia amylovora* and its application on various organs of infected plants. / **S.C. Razo**, I.V. Safenkova, N.V. Drenova, A.A. Kharchenko, Y.S. Tsymbal, Y.A. Varitsev, A.V. Zherdev, E.N. Pakina, B.B. Dzantiev // *Physiological and Molecular Plant Pathology*. – **2021**. Vol. 114. – P. 101637.

*Статьи в изданиях из списка ВАК*

1. **Разо Ш.**, Галушка П.А., Варицев Ю.А., и др. Разработка новых иммуноаналитических тестсистем для диагностики черной ножки картофеля, вызываемой бактериями *Dickeya* spp // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. - 2021. Т. 16. № 3. – С. 198-214.
2. **Разо Ш.**, Панфёров В.Г., Сафенкова И.В. и др. Разработка иммунохроматографической тест-системы с нанозимным усилением для выявления

фитопатогена *Erwinia amylovora* // Достижения науки и техники АПК. - 2022. Т. 36. №. 1. – С. 34-39. doi: 10.53859/02352451\_2022\_36\_1\_34.

*Материалы научных конференций*

1. **Razo S.C.**, Panferov V.G., Safenkova I.V., Varitsev Y.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Double enhancement based lateral flow immunoassay for potato virus X detection. Abstracts of the 11<sup>th</sup> International Conference “Biocatalysis: Fundamentals and Applications”. June 25-30, 2017, Moscow region, Russian Federation Moscow: Innovations and High Technologies MSU Ltd, 2017. P. 190-191.
2. Панферов В.Г., Сафенкова И.В., **Разо Ш.**, Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Применение магнитных частиц для иммунохроматографического анализа X вируса картофеля. Тезисы докладов Третьего съезда аналитиков России. 8-13 октября 2017 г., Москва. М.: ГЕОХИ РАН. 2017. Рег. № 533. С. 124.
3. **Razo S.C.**, Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of lateral flow immunoassay with double enhancement for plant virus detection: A case study with potato virus X. Сборник статей XI Международной научно-практической конференции «Инновационные процессы в сельском хозяйстве». 25-27 апреля 2019, М.: РУДН, 2019. С. 89-93.
4. Safenkova I.V., **Razo S.C.**, Ivanov A.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Improvement of lateral flow assays for potato pathogens detection through DNA amplification. Abstracts of the 16<sup>th</sup> International Symposium on Soil and Plant Analysis. June 17-20, 2019, Wageningen, the Netherlands. P. 82.
5. Ivanov A.V., Safenkova I.V., **Razo S.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of enhanced lateral flow assay for potato virus X based on recombinase polymerase amplification. Abstracts of The 44th FEBS Congress. July 6-11, 2019, Krakow, Poland. P. 384-385.
6. Сафенкова И.В., Панфёров В.Г., **Разо Ш.**, Иванов А.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Тест-системы для экспрессного выявления вирусных и бактериальных патогенов картофеля: Возможности высокочувствительного анализа. – IV Всероссийский Съезд по защите растений «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. Санкт-Петербург, 9-11 сентября 2019 г. С. 186.
7. Safenkova I.V., Panferov V.G., **Razo S.C.**, Zherdev A.V., Dzantiev B.B. New high-sensitive lateral flow immunosensoric systems for control of plant pathogens. Book of Abstracts of Mendeleev 2019 – XI International Conference on Chemistry for Young Scientists. September 9-13, 2019, St. Petersburg, Russian Federation. P. 484.
8. **Razo S.C.**, Safenkova I.V., Ivanov A.V., Zherdev A.V., Pakina, E.N., Dzantiev B.B. Development of enhanced lateral flow assay based on bio-barcode amplification: A case study for potato virus X. – Materials of IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) Education Conference 2019 and 46th PSBMB (Philippine Society of Biochemistry and Molecular Biology) Annual Convention. November 13-15, 2019. Manila City, Philippines. Abstract AF22.



9. **Разо Ш.**, Панферов В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Пакина Е.Н., Дзантиев Б.Б. Усиленный мультиплексный иммунохроматографический анализ с использованием наночастиц Au@Pt для детекции приоритетных патогенов картофеля. Тезисы докладов Первой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Геномика и современные биотехнологии в размножении, селекции и сохранении растений». 27-31 октября 2020 г., Ялта, Россия. С. 161-162.
10. Панфёров В.Г., **Разо Ш.**, Сафенкова И.В., Варицев Ю.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Мультиплексный иммунохроматографический анализ фитопатогенов с использованием наночастиц с пероксидаза-подобной активностью. – Сборник тезисов IV Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (MOSM 2020), 16-20 ноября 2020 г., Екатеринбург. С. DR34.
11. **Разо Ш.**, Сафенкова И.В., Дренова Н.В., Варицев Ю.А., Жердев А.В., Пакина Е.Н., Дзантиев Б.Б. Разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления бактериального ожога плодовых культур. Тезисы докладов XVI Международной научно-практической конференции «Аграрная наука – сельскому хозяйству». 9-10 февраля 2021 г., Барнаул, Россия. С. 287-289.

## АННОТАЦИЯ

### РАЗРАБОТКА НОВЫХ СИСТЕМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ФИТОПАТОГЕНОВ НА ОСНОВЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФОРМИРОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ АНТИТЕЛ И НАНОЧАСТИЦ

Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для детекции трех бактериальных фитопатогенов – возбудителей экономически значимых заболеваний: черной ножки картофеля, бурой гнили картофеля и бактериального ожога плодовых культур. Разработаны и апробированы иммунохроматографические тест-системы для высокочувствительной детекции X- и Y- вирусов картофеля.

Предложена схема иммунизации, в результате которой получены препараты поликлональных антител, обладающих высокой специфичностью к вирусному (Y-вирус картофеля) и бактериальным (*Dickeya* spp., *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*) фитопатогенам и отсутствием кросс-реактивности к близкородственным патогенам.

#### SUMMARY

#### DEVELOPMENT OF NEW SYSTEMS FOR IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DIAGNOSIS OF PHYTOPATHOGENES BASED ON REGULARITIES OF FORMATION OF COMPLEXES OF ANTIBODIES AND NANOPARTICLES

Developed and tested immunochromatographic test systems for the detection of three bacterial phytopathogens - pathogens of economically significant diseases: black rot of potatoes, brown rot of potatoes and bacterial burn of fruit crops. Developed and tested immunochromatographic test systems for highly sensitive detection of X- and Y-potato viruses.

An immunization scheme was proposed, which resulted in the preparation of polyclonal antibodies with high specificity for viral (Potato Y-virus) and bacterial (*Dickeya* spp., *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*) phytopathogens and the absence of cross-reactivity to closely related pathogens.