

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.94:582.281.21

doi: 10.26907/2542-064X.2022.1.22-35

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЕ СЕНСОРЫ В ОПРЕДЕЛЕНИИ АНТИГЕНОВ *Fusarium oxysporum*

Р.М. Бейлинсон¹, Э.П. Медянцева¹, Е.А. Кириллова¹,
Е.В. Халдеева², Г.К. Будников¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

²Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора,
г. Казань, 420015, Россия

Аннотация

Предложены иммуноферментные сенсоры (ИФС) с L-цистеиндисульфидгидразой (ЦДГ) в качестве метки на основе планарных графитовых электродов для определения антигена (Аг) *Fusarium oxysporum*. Действие ИФС основано на сочетании иммунологической, ферментативной и электрохимической реакций. Разработанные иммуносенсоры позволяют определять Аг *Fusarium oxysporum* в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл с нижней границей определяемых содержаний $1 \cdot 10^{-10}$ мг/мл. Оценена константа связывания иммунных комплексов Аг-Аг, значение которой составило $K_a = (6.2 \pm 0.2) \cdot 10^9$ (мг/мл)⁻¹. Подтверждено отсутствие перекрестного реагирования с Аг патогенных грибов *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*. Методика определения Аг *Fusarium oxysporum* с помощью предлагаемого ЦДГ-иммуносенсора апробирована на примере оценки качества пшеничной крупы.

Ключевые слова: *Fusarium oxysporum*, иммуноферментный сенсор, L-цистеиндисульфидгидраза, грибковые патогены

Введение

Грибковые заболевания растений имеют большое экономическое значение, вызывая 70–80% потерь урожая, связанных с микробными патогенами растений. Грибы рода *Fusarium* являются широко распространенными фитопатогенами, источниками опасных токсинов, наносящими существенный ущерб сельскому хозяйству и производству продуктов питания.

Известно, что *Fusarium oxysporum* является важным почвенным фитопатогеном. Он отвечает по меньшей мере за 20 различных заболеваний, встречающихся более чем у 120 видов растений. Кукуруза, пшеница, соя и ячмень наиболее часто поражены этим грибковым патогеном. Он проникает в проводящие воду капилляры растений и способствует увяданию, что приводит к преждевременной гибели растения [1].

Традиционные методы определения патогенных грибов основаны на культивировании и морфологических исследованиях, анализе ДНК. Главным образом используют различные варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2–6], среди которых самый распространенный – ПЦР в режиме реального времени [7–11],

и методы петлевой изотермической амплификации [12–15]. Хотя традиционные методы обладают необходимой специфичностью и чувствительностью, они требуют относительно сложной последовательности стадий, длительны и трудоемки, что не позволяет широко использовать их в целях решения проблем сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Спектральные методы оказались альтернативными методам мокрой химии для эффективного и неразрушающего определения грибкового загрязнения в пищевых продуктах [16–22], однако остаются проблемы анализа, связанные с неоднородным распределением токсинов, фоновыми составляющими интерференции, робастностью, разработкой аппаратуры [23]. Хроматографические методы позволяют определять характерные маркерные соединения, включая микотоксины и другие грибковые метаболиты, и таким образом идентифицировать некоторые виды грибов [1, 24–26], однако они ограничены в своем применении. Имеются данные о разработке оптических и электрохимических ДНК-сенсоров с использованием различных подходов для определения некоторых патогенных грибов [27–29]. Кроме того, разработаны тест-системы для быстрого обнаружения грибковых инфекций, основанные на иммунохимических и гибридных взаимодействиях ДНК [30–32].

Нами ранее был разработан амперометрический иммуноферментный сенсор (ИФС) с иммобилизованной холинэстеразой (ХЭ) и антителами для определения антигена (Аг) патогенных грибов *Trichophyton rubrum*. Иммуносенсор основан на специфической иммунореакции Аг с антителами, которые были иммобилизованы вместе с ферментом ХЭ на нитроцеллюлозной мембране. Разработанный иммуносенсор позволяет определять до $1 \cdot 10^{-15}$ мг/мл *Trichophyton rubrum*. Общее время иммуноанализа менее 20 мин. Метод был применен для определения Аг *Trichophyton rubrum* в сыворотке крови человека [33].

Для растений характерно бессимптомное протекание ранних стадий болезней, вызванных инфицированием грибковыми патогенами. Раннее обнаружение патогенов растений играет важную роль в мониторинге их здоровья. Это позволяет управлять болезнетворными инфекциями на различных этапах их развития, а также минимизировать риск распространения инфекций, что особенно важно при контроле семенного фонда. Поэтому имеет особое значение разработка экспрессных методов анализа для контроля поступающей сельскохозяйственной продукции и анализа на всех этапах производства продуктов питания. Разработка селективных и высокочувствительных иммуносенсоров является перспективным решением подобного рода задач.

В связи с этим цель настоящей работы – оценить возможность использования ЦДГ в качестве метки при создании иммуносенсоров на основе планарных электродов, модифицированных наноструктурированными материалами, для определения Аг *F. oxysporum* и контроля его содержания в сельскохозяйственных продуктах.

1. Экспериментальная часть

Основой разработанного иммуносенсора служила система, состоящая из рабочего, вспомогательного электродов и электрода сравнения, полученная на полимерной подложке методом печатных технологий конструкции «3 в 1» (получены

на кафедре аналитической химии КФУ, Казань, Россия). Материалом поверхности рабочего электрода, на которой иммобилизуются модификатор и фермент, являются графитовые чернила (GwentElectronicMaterials, США). Вспомогательный электрод изготовлен также из графитовых чернил. Электрод сравнения – паста AgCl/Ag.

Объем рабочей ячейки системы составлял 1.8 мл. Все измерения с использованием этих электродов проводили с помощью потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT204 (Metrohm Autolab, Нидерланды). Электрохимическую стабилизацию и очистку поверхности электрода проводили путем циклического изменения потенциала в диапазоне потенциалов от 0 до 1000 мВ, для этого регистрировали 6–7 циклических вольтамперограмм в растворе насыщенного KCl при скорости развертки 100 мВ/с.

Использовали фосфатный буферный (ФБ) раствор (рН 7.60 ± 0.05). Значения рН водных растворов определяли рН-метром «Эксперт 001» со стеклянным электродом, градуированным по стандартным буферным растворам.

В качестве субстратов использовали L-цистеин (Sigma), растворы которого готовили по точной навеске в рабочем буферном растворе. В качестве источника ЦДГ использовали гомогенат из проростков зерновых культур (овса), в качестве консерванта – 0.5 М сахарозу. Применяли 25%-ный раствор глутарового альдегида фирмы ICN (Biomedicals Inc., США), аминокпроизводное гиперразветвленного полиэфира полиола Boltorn-H20-NH2 (получен на кафедре неорганической химии КФУ, Казань, Россия) [34].

В настоящей работе использовали Ag *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* и сыворотку поликлональных Ат против *Fusarium oxysporum* (полученные и предоставленные лабораторией микологии Казанского НИИ эпидемиологии и микробиологии (КНИИЭМ) (Казань, Россия)). Концентрации водных растворов Ат и Ag были определены спектрофотометрически при λ 280 и 266 нм соответственно с помощью прибора BioSpectrometer (Eppendorf, Германия) при температуре 25 °С. Концентрация Ат против Ag *F. oxysporum* в разведении 1:20 – 4.8 мг/мл. Начальные концентрации Ag грибов *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata* составили 5.5, 2.4, 2.5, 1.5, 11.3 мг/мл соответственно.

Получение гомогената из проростков овса. Для приготовления гомогената растительный материал (проростки овса) мелко нарезали и растирали пестиком в вымороженной ступке, заливали 0.1 М ФБ рН 7.6 в соотношении 1:3, процеживали суспензию через двойной марлевый слой и добавляли 0.5 М раствор сахарозы. Полученный гомогенат использовали для получения биочувствительного слоя иммуносенсоров [35].

Получение Ag *F. oxysporum*. Антиген *F. oxysporum* получен по оригинальной методике (КНИИЭМ). Получение основано на экстракции биоактивных компонентов из биомассы гриба 0.85%-ным раствором NaCl с последующим удалением микотоксинов путем экстракции хлороформом. Затем экстракт фракционировали этанолом. Для стабилизации использовали стерилизующую фильтрацию через керамические фильтры. Культивирование биомассы проводили на среде Чапека. Полученную биомассу промывали, центрифугировали и обезжиривали ацетоном.

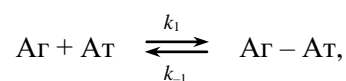
Готовые антигены тестировали на токсичность, аллергенную активность, активность в иммунологических реакциях (иммунодиффузия с кроличьими антисыворотками).

Изготовление амперометрических иммуносенсоров на основе иммобилизованного фермента ЦДГ. Для получения биочувствительной части ИФС на поверхность рабочего электрода наносили смесь, содержащую раствор фермента (ЦДГ), раствор Ат против Ag *F. oxysporum* (1:20), раствор Voltorn-N20-NH2, рабочий буфер (рН 7.6), дистиллированную воду и 1%-ный раствор глутарового альдегида. Глутаровый альдегид вносили в последнюю очередь и после перемешивания на поверхность электродов наносили по 1 мкл этой смеси. Полученные таким образом иммуносенсоры оставляли на ночь в закрытой чашке Петри при температуре +4 °С. В дальнейшем хранили в холодильнике не более 15 сут [35].

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office, определены средние величины (M), стандартная ошибка средней массы (m).

1.1. Определение характеристик иммунных комплексов

1.1.1. Определение констант связывания иммунного комплекса антиген – антитело. Константа связывания (константа образования иммунного комплекса) является одной из наиболее важных физико-химических характеристик иммунологической реакции, на основании которой можно сделать вывод о возможности использования данной реакции в аналитических целях, оценить качество иммунореагентов:



$$K_a = k_1/k_{-1} = [\text{Ag} - \text{At}] / [\text{Ag}] \cdot [\text{At}],$$

где K_a – константа образования иммунного комплекса, k_1 и k_{-1} – константы прямой и обратной иммунологических реакций; $[\text{Ag} - \text{At}]$ – равновесная концентрация иммунного комплекса, $[\text{Ag}]$ и $[\text{At}]$ – равновесные концентрации антигена и антител соответственно. Для разработки методов иммуноанализа достаточно знать эффективные значения констант связывания, характеризующие свойства используемых Ат.

Константу K_a определяли, используя зависимость B/F от B (график Скэтчарда), представляющую собой прямую линию с тангенсом угла наклона, равным K_a , пересекающую ось абсцисс в точке, соответствующей A_0 [36]. K_a можно представить в следующем виде: $K_a = B/F(C_0 - B)$, где F – равновесная концентрация антигена в растворе, A_0 – общая концентрация Ат в системе, C_0 – исходная концентрация антигена, B/F – отношение концентраций связанного и свободного Ag.

1.1.2. Определение процента перекрестного реагирования. Процент перекрестных реакций определяли как отношение концентрации основного и мешающего компонентов, полученных как точки пересечения перпендикуляра, восстановленного из значения аналитического сигнала, соответствующего используемой

концентрации, деленного на два (ось Y) с перпендикулярами, опущенными на ось концентраций (ось X), используя соответствующие градуировочные графики для их определения.

Процент перекрестных реакций вычисляли как $(C_1/C_2) \cdot 100\%$, где C_1 и C_2 – концентрации основного и мешающего компонентов при 0.5 величины максимального аналитического сигнала [37].

2. Результаты и их обсуждение

Изучение действия Аг *F. oxysporum* на фермент класса лиаз – ЦДГ – показало, что Аг не является эффектором этого фермента, поэтому были сделаны попытки использования его в качестве меток при создании ИФС для определения Аг грибов.

Разработанный ИФС представляет собой графитовый печатный электрод, на поверхности которого проводили соиммобилизацию фермента и Ат против Аг *F. oxysporum* (рис. 1).

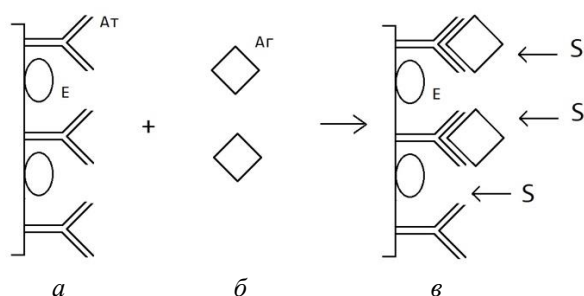
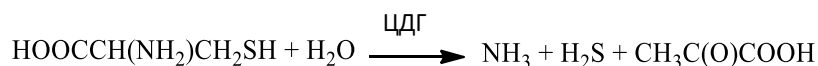


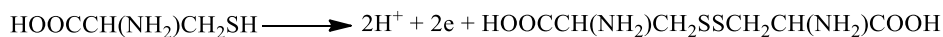
Рис. 1. Схема действия ИФС на основе иммобилизованных Ат против Аг *Fusarium oxysporum* и фермента (Е) включает: совместно иммобилизованные фермент и Ат (а), Аг в растворе (б), образующийся иммунный комплекс и варианты подхода субстрата к активной поверхности фермента (в)

2.1. Природа формирования аналитического сигнала ЦДГ-биосенсора.

ЦДГ катализирует разложение L-цистеина с образованием аммиака, пировиноградной кислоты и сероводорода [38]:



Пик окисления L-цистеина на графитовом печатном электроде на фоне ФБ раствора pH 7.6 наблюдается при потенциале 0.45 В (рис. 2). Концентрация субстрата, L-цистеина, составляла $1 \cdot 10^{-3}$ М:



2.2. Действие Аг *Fusarium oxysporum* на ИФС. Установлено, что Аг *F. oxysporum* оказывает ингибирующее действие на биочувствительную часть иммуносенсоров, что, вероятно, связано с образованием комплекса Ат-Аг, который создает стерические препятствия при подходе субстрата к активному центру фермента. В случае ИФС на основе ЦДГ ингибирующее действие Аг *F. oxysporum*

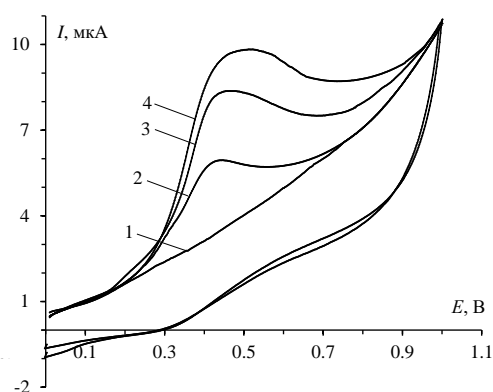


Рис. 2. Вольтамперограммы электроокисления раствора $1 \cdot 10^{-3}$ М цистеина на фоне ФБ раствора pH 7.6 (1), в присутствии ЦДГ (2), в отсутствие ЦДГ (4), в присутствии Аг *Fusarium oxysporum* и ЦДГ (3) на печатном графитовом электроде

Табл. 1

Определение Аг *Fusarium oxysporum* с помощью ИФС на основе ЦДГ ($n = 3, P = 0.95$)

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S_f	Процент открытия, %
$3 \cdot 10^{-8}$	$(2.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-8}$	0.069	94–107
$7 \cdot 10^{-9}$	$(7.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-9}$	0.042	96–104

Табл. 2

Определение *Fusarium oxysporum* с помощью ЦДГ-иммуносенсора ($n = 3, P = 0.95$)

Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	S_f	Процент открытия, %
$5 \cdot 10^{-7}$	$(4.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-7}$	0.043	96–104
$5 \cdot 10^{-8}$	$(5.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-8}$	0.038	96–104

наблюдалось в области концентраций $5 \cdot 10^{-10} - 5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл. Линейная зависимость между логарифмом концентрации и отношением токов описывается уравнением: $I^* = (-11.6 \pm 0.9) \cdot (-\lg C) + (127.0 \pm 0.9)$, где $I^* = I_p/I_0 \cdot 100$ (I_p – ток в присутствии ингибитора, I_0 – ток в отсутствие ингибитора). Разработанный иммуноферментный сенсор позволяет определять концентрации *F. oxysporum* с нижней границей определяемых содержаний до $1 \cdot 10^{-10}$ мг/мл.

Наибольший ингибирующий эффект наблюдался при использовании Ат в разведении 1:20 (максимальная степень ингибирования $(72.3 \pm 0.5)\%$). Разведения Ат 1:10, 1:30, 1:40, 1:50 обеспечивали более низкую величину аналитического сигнала и более низкую степень ингибирования.

Аналитические характеристики ИФС для определения *F. oxysporum* представлены в табл. 1. Правильность результатов определения Аг *F. oxysporum*, полученных с использованием разработанных ИФС, подтверждена методом «введено – найдено» (табл. 2).

2.3. Оценка констант связывания иммунных комплексов и специфичности иммунохимических взаимодействий. Для характеристики иммунных комплексов были определены константы образования иммунных комплексов K_a с помощью метода Скэтчарда.

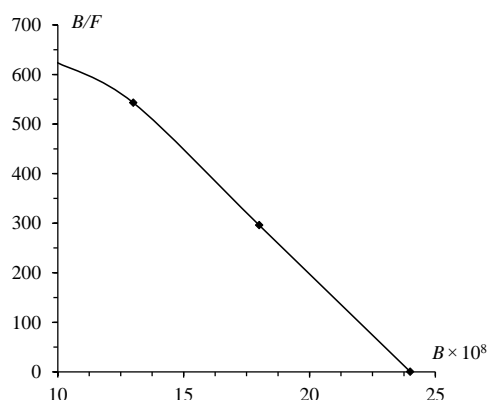


Рис. 3. График Скэтчарда для нахождения констант связывания иммунного комплекса Ат-Аг *Fusarium*

Проводили серию опытов по определению концентрации свободного и связанного Аг при различных начальных концентрациях Аг и постоянной концентрации Ат в системе. Для определения несвязанного количества Аг использовали градуировочную зависимость действия Аг *F. oxysporum* на другую фермент-субстратную систему (тирозиназа – фенол), для которой установлено наличие активирующего эффекта.

Полученная зависимость взаимодействия Аг-Ат в координатах Скэтчарда имеет близкий к линейному характер, что свидетельствует об однородности используемых антител (рис. 3). Найденное значение константы связывания для Ат к *F. oxysporum* $K_a = (6.2 \pm 0.2) \cdot 10^9$ (мг/мл)⁻¹ указывает на достаточную прочность образующихся иммунных комплексов. Это позволяет проводить селективный анализ независимо от присутствия других грибковых патогенов.

Полученные результаты показывают, что предлагаемые иммуносенсоры могут быть использованы для определения содержания *F. oxysporum* в сельскохозяйственных продуктах.

2.4. Определение Аг *F. oxysporum* в сельскохозяйственной продукции.

В связи с широкой распространенностью *F. oxysporum* и его способностью поражать разнообразные сельскохозяйственные культуры, представляло интерес количественно оценить его содержание в продуктах переработки зерна – пшеничной крупе.

Методика извлечения Аг *F. oxysporum* из крупы. Навеску образца (1 г) (пшеничной крупы) растирали в порошок, используя блендер фирмы Jiplai (Китай) и добавляли 10 мл водно-солевого буфера (фосфатного буфера рН 7.6). Смесь фильтровали на воронке трижды. Фильтраты объединили и центрифугировали в течение 15 мин при скорости 7000 об./мин, после этого использовали для последующего определения *F. oxysporum* с помощью иммуносенсора на основе ЦДГ.

Методика определения содержания Аг *F. oxysporum* в образце крупы. В ячейку на 1800 мкл вносили 180 мкл раствора образца, полученного как описано выше, 180 мкл L-цистеина ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ М), фосфатный буферный раствор (рН 7.6) и ЦДГ-иммуносенсор. Растворы инкубировали в течение 10 мин. Затем измеряли значение тока при потенциале +0.45 В.

В образцах пшеничной крупы («Каждый день», ОАО «МК Сарапул-молоко», г. Сарапул) *F. oxysporum* не обнаружен.

Возможность определения *F. oxysporum* с использованием разработанного ИФС оценена методом «введено – найдено».

Заключение

Впервые показана возможность использования амперометрических ИФС с ЦДГ в качестве метки для определения Аг *F. oxysporum*, действие которого основано на сочетании иммунологической, ферментативной и электрохимической реакций.

Разработанный иммуносенсор позволил определять Аг *F. oxysporum* в концентрационном интервале $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ мг/мл, а нижняя граница определяемых содержаний составила $1 \cdot 10^{-10}$ мг/мл.

Оценена константа связывания иммунных комплексов: $K_a = (6.2 \pm 0.2) \cdot 10^9$ (мг/мл)⁻¹. Перекрестное реагирование полностью отсутствовало для Аг патогенных грибов *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*.

Разработана методика определения Аг *F. oxysporum* с помощью предлагаемого цистеиндесульгидразного ИФС в сельскохозяйственной продукции, апробирована на примере оценки качества пшеничной крупы. В исследуемых образцах *F. oxysporum* не был обнаружен.

Литература

1. Senes C.E.R., Saldan N.C., Costa W.F., Svidzinski T., Oliveira C.C. Identification of *Fusarium oxysporum* fungus in wheat based on chemical markers and qualitative GC-MS test // J. Braz. Chem. Soc. – 2018. – V. 29, No 12. – P. 2626–2635. – doi: 10.21577/0103-5053.20180143.
2. Graça M.G., Heijden I.M., Perdigão L., Taira C., Costa S.F., Levin A.S. Evaluation of two methods for direct detection of *Fusarium* spp. in water // J. Microbiol. Methods. – 2016. – V. 123. – P. 39–43. – doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.015.
3. Singh N., Kapoor R. Quick and accurate detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami* in host tissue and soil using conventional and real-time PCR assay // World J. Microbiol. Biotechnol. – 2018. – V. 34, No 175. – P. 175–187. – doi: 10.1007/s11274-018-2556-y.
4. Omori A.M., Ono E.Y.S., Bordini J.G., Hirozawa M.T., Fungaro M.H.P., Ono M.A. Detection of *Fusarium verticillioides* by PCR-ELISA based on *FUM21* gene // Food Microbiol. – 2018. – V. 73. – P. 160–167. – doi: 10.1016/j.fm.2018.01.020.
5. Ge B., Wang B., Guo C., Sun S., Chen G., Wang X., Zhu Z., Duan C. Composition and quantitative analysis of *Fusarium* species in maize rhizosphere soil // Sci. Agric. Sin. – 2018. – V. 51, No 19. – P. 3683–3693.
6. Mishra R.K., Pandey B.K., Muthukumar M., Pathak N., Zeeshan M. Detection of *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. in soil using culture independent PCR (ciPCR) // Saudi J. Biol. Sci. – 2013. – V. 20, No 1. – P. 51–56. – doi: 10.1016/j.sjbs.2012.10.007.
7. Crespo-Sempere A., Estiarte N., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products // Int. J. Food Microbiol. – 2013. – V. 165, No 3. – P. 214–220. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.017.

8. Kumar S., Singh R., Kashyap P.L., Srivastava A.K. Rapid detection and quantification of *Alternaria solani* in tomato // *Sci. Hortic.* – 2013. – V. 151. – P. 184–189. – doi: 10.1016/j.scienta.2012.12.026.
9. von Hertwig A.M., Sant'Ana A.S., Sartori D., Silva J., Nascimento M.S., Iamanaka B.T., Pelegrinelli Fungaro M.H., Taniwaki M.H. Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee // *J. Microbiol. Methods.* – 2018. – V. 148. – P. 87–92. – doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.010.
10. Nikitin M., Deych K., Grevtseva I., Girsova N.V., Kuznetsova M., Pridannikov M., Dzhavakhiya V., Statsyuk N., Golikov A.G. Preserved microarrays for simultaneous detection and identification of six fungal potato pathogens with the use of real-time PCR in matrix format // *Biosensors.* – 2018. – V. 8, No 4. – P. 129–137. – doi: 10.3390/bios8040129.
11. De la Lastra E., Basallote-Ureba M.J., De los Santos B., Miranda L., Vela-Delgado M.D., Capote N. A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil // *Sci. Hortic.* – 2018. – V. 237. – P. 128–134. – doi: 10.1016/j.scienta.2018.04.007.
12. Shan L., Haseeb H.A., Zhang J., Zhang D., Jeffers D.P., Dai X., Guo W. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of toxigenic *Fusarium temperatum* in maize stalks and kernels // *Int. J. Food Microbiol.* – 2019. – V. 291. – P. 72–78. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.021.
13. Lan C., Ruan H., Yang X., Yao J., Jiang J. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen // *Phytoparasitica.* – 2018. – V. 46. – P. 283–293. – doi: 10.1007/s12600-018-0669-3.
14. Pu J., Xie Y., Zhang H., Zhang X., Qi Y., Peng J. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* – 2014. – V. 86. – P. 81–88. – doi: 10.1016/j.pmp.2014.04.002.
15. Denschlag C., Rieder J., Vogel R.F., Niessen L. Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat // *Int. J. Food Microbiol.* – 2014. – V. 177. – P. 117–127. – doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.010.
16. Jaillais B., Roumet P., Pinson-Gadais L., Bertrand D. Detection of *Fusarium* head blight contamination in wheat kernels by multivariate imaging // *Food Control.* – 2015. – V. 54. – P. 250–258. – doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.048.
17. Kaya-Celiker H., Mallikarjunan P.K., Kaaya A. Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts // *Food Control.* – 2015. – V. 52. – P. 103–111. – doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.013.
18. Liang P.-S., Slaughter D.C., Ortega-Beltran A., Michailides T.J. Detection of fungal infection in almond kernels using near-infrared reflectance spectroscopy // *Biosyst. Eng.* – 2015. – V. 137. – P. 64–72. – doi: 10.1016/j.biosystemseng.2015.07.010.
19. Pan T., Sun D.-W., Pu H., Wei Q., Xiao W., Wang Q.-J. Detection of *A. alternata* from pear juice using surface-enhanced Raman spectroscopy based silver nanodots array // *J. Food Eng.* – 2017. – V. 215. – P. 147–155. – doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.07.019.
20. Shen F., Zhao T., Jiang X., Liu X., Fang Y., Liu Q., Hu Q., Liu X. On-line detection of toxigenic fungal infection in wheat by visible/near infrared spectroscopy // *J. Food Sci. Technol.* – 2019. – V. 109. – P. 216–224. – doi: 10.1016/j.lwt.2019.04.019.
21. Shen F., Wu Q., Liu P., Jiang X., Fang Y., Cao C. Detection of *Aspergillus* spp. contamination levels in peanuts by near infrared spectroscopy and electronic nose // *Food Control.* – 2018. – V. 93. – P. 1–8. – doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.039.

22. *Tamburini E., Mamolini E., De Bastiani M., Marchetti M.G.* Quantitative determination of *Fusarium proliferatum* concentration in intact garlic cloves using near-infrared spectroscopy // *Sensors*. – 2016. – V. 16, No 7. – P. 1099–1112. – doi: 10.3390/s16071099.
23. *Wu Q., Xie L., Xu H.* Determination of toxigenic fungi and aflatoxins in nuts and dried fruits using imaging and spectroscopic techniques // *Food Chem.* – 2018. – V. 252. – P. 228–242. – doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.076.
24. *Saldan N.C., Almeida R.T.R., Avincola A., Porto C., Galuch M.B., Magon T.F.S., Pilau E.J., Svidzinski T.I.E., Oliveira C.C.* Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS // *Food Chem.* – 2018. – V. 241. – P. 113–121. – doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.065.
25. *Gu S., Wang J., Wang Y.* Early discrimination and growth tracking of *Aspergillus* spp. contamination in rice kernels using electronic nose // *Food Chem.* – 2019. – V. 292. – P. 325–335. – doi: 10.1016/j.foodchem.2019.04.054.
26. *Erler A., Riebe D., Beitz T., Löhmansröben H.-G., Grothusheitkamp D., Kunz T., Methner F.-J.* Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation-based APCI-MS // *J. Mass Spectrom.* – 2018. – V. 53, No 10. – P. 911–920. – doi: 10.1002/jms.4210.
27. *Siddiquee S., Rovina K., Yusof N.A., Rodrigues K.F., Suryani S.* Nanoparticle-enhanced electrochemical biosensor with DNA immobilization and hybridization of *Trichoderma harzianum* gene // *Sens. Bio-Sens. Res.* – 2014. – V. 2. – P. 16–22. – doi: 10.1016/j.sbsr.2014.06.002.
28. *Peltomaa R., Vaghini S., Patiño B., Benito-Peña E., Moreno-Bondi M.* Species-specific optical genosensors for the detection of mycotoxigenic *Fusarium* fungi in food samples // *Anal. Chim. Acta.* – 2016. – V. 935. – P. 231–238. – doi: 10.1016/j.aca.2016.06.009.
29. *Cecchini F., Manzano M., Mandabi Y., Perelman E., Marks R.S.* Chemiluminescent DNA optical fibre sensor for *Brettanomyces bruxellensis* detection // *J. Biotechnol.* – 2012. – V. 157, No 1. – P. 25–30. – doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.004.
30. *Wee E.J.H., Lau H.Y., Botella J.R., Trau M.* Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings // *Chem. Commun.* – 2015. – V. 51, No 27. – P. 5828–5831. – doi: 10.1039/C4CC10068A.
31. *Zhan F., Wang T., Iradukunda L., Zhan J.* A gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for sensitive visual detection of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans* // *Anal. Chim. Acta.* – 2018. – V. 1036. – P. 153–161. – doi: 10.1016/j.aca.2018.06.083.
32. *Miranda B.S., Linares E.M., Thalhammer S., Kubota L.T.* Development of a disposable and highly sensitive paper-based immunosensor for early diagnosis of Asian soybean rust // *Biosens. Bioelectron.* – 2013. – V. 45. – P. 123–128. – doi: 10.1016/j.bios.2013.01.048.
33. *Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C.* Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum* // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 411, No 1–2. – P. 13–18.
34. *Kavand A., Anton N., Vandamme T., Serra C.A., Chan-Seng D.* Synthesis and functionalization of hyperbranched polymers for targeted drug delivery // *J. Controlled Release.* – 2020. – V. 321. – P. 285–311. – doi: 10.1016/j.jconrel.2020.02.019.
35. *Медянцева Э.П., Кремлева Н.В., Будников Г.К., Бормотова Ю.И.* Амперометрический биосенсор для определения свинца и кадмия // *Журн. аналит. химии.* – 1999. – Т. 54, № 2. – С. 166–170.
36. *Ёсида К.* Электроокисление в органической химии. Роль катион радикалов как интермедиатов в синтезе. – М.: Мир, 1987. – 336 с.
37. *Егоров А.М.* Теория и практика иммуноферментного анализа. – М.: Высш. шк., 1991. – 288 с.

38. Мусил Я., Новакова О., Куниц К. Современная биохимия в схемах. – М.: Мир, 1994. – 44 с.

Поступила в редакцию
24.09.2021

Бейлинсон Регина Марковна, кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *rvarlamo@mail.ru*

Медянцева Эльвина Павловна, доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *emedyant@gmail.com*

Кириллова Елена Александровна, студент Химического института им. А.М. Бутлерова

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *elena.al.kirillova@gmail.com*

Халдеева Елена Владимировна, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией микологии

Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора
ул. Большая Красная, д. 67, г. Казань, 420015, Россия
E-mail: *mycology-kazan@yandex.ru*

Будников Герман Константинович, доктор химических наук, профессор-консультант кафедры аналитической химии

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Herman.Budnikov@kpfu.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2022, vol. 164, no. 1, pp. 22–35

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.1.22-35

**Amperometric Enzyme Immunoassay Sensors
in Determination of *Fusarium oxysporum* Antigens**

R.M. Beilinson^{a*}, *E.P. Medyantseva*^{a**}, *E.A. Kirillova*^{a***}, *E.V. Khaldeeva*^{b****},
H.C. Budnikov^{a*****}

^aKazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

^bKazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, 420015 Russia
E-mail: **rvarlamo@mail.ru*, ***emedyant@gmail.com*, ****elena.al.kirillova@gmail.com*,
*****mycology-kazan@yandex.ru*, ******Herman.Budnikov@kpfu.ru*

Received September 24, 2021

Abstract

Enzyme immunoassay sensors (EIS) with L-cysteine desulphydrase (CDH) as a label based on planar graphite electrodes were created to determine *Fusarium oxysporum* antigen (Ag). The EIS action relies

on the combined effect of immunological, enzymatic, and electrochemical reactions. The immunosensors developed allow the determination of *Fusarium oxysporum* Ag in the concentration range of $5 \cdot 10^{-10}$ – $5 \cdot 10^{-6}$ mg/mL with the limit of quantification of $1 \cdot 10^{-10}$ mg/mL. The binding constant of the Ab-Ag immune complexes was estimated as $K_{a1} = (6.2 \pm 0.2) \cdot 10^9$ (mg/mL) $^{-1}$. No cross-reaction with Ag of such pathogenic fungi as *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus niger* was confirmed. Here the quality of wheat groats was assessed to test the methods for the determination of *Fusarium oxysporum* Ag using the developed CDH immunosensor.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, enzyme immunoassay sensor, L-cysteine desulphhydrase, fungal pathogens

Figure Captions

Fig. 1. Schematic representation of the action of enzyme immunoassay sensors based on immobilized Ab against *Fusarium oxysporum* Ag and the enzyme (E) includes: co-immobilized enzyme and Ab (a), Ag in solution (b), immune complex that is formed and variants of the substrate access to the active enzyme surface (c).

Fig. 2. Voltammograms of the electrooxidation of a $1 \cdot 10^{-3}$ M cysteine solution in phosphate buffer (pH 7.6) (1), in the presence of L-cysteine desulphhydrase (2), in the absence of L-cysteine desulphhydrase (4), in the presence of *Fusarium oxysporum* Ag and L-cysteine desulphhydrase (3) at the planar graphite electrode.

Fig. 3. Scatchard plot for determining the binding constant of the Ab-Ag immune complex of *Fusarium oxysporum*.

References

1. Senes C.E.R., Saldan N.C., Costa W.F., Svidzinski T., Oliveira C.C. Identification of *Fusarium oxysporum* fungus in wheat based on chemical markers and qualitative GC-MS test. *J. Braz. Chem. Soc.*, 2018, vol. 29, no. 12, pp. 2626–2635. doi: 10.21577/0103-5053.20180143.
2. Graça M.G., Heijden I.M., Perdigão L., Taira C., Costa S.F., Levin A.S. Evaluation of two methods for direct detection of *Fusarium* spp. in water. *J. Microbiol. Methods*, 2016, vol. 123, pp. 39–43. doi: 10.1016/j.mimet.2016.01.015.
3. Singh N., Kapoor R. Quick and accurate detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *carthami* in host tissue and soil using conventional and real-time PCR assay. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2018, vol. 34, no. 175, pp. 175–187. doi: 10.1007/s11274-018-2556-y.
4. Omori A.M., Ono E.Y.S., Bordini J.G., Hirozawa M.T., Fungaro M.H.P., Ono M.A. Detection of *Fusarium verticillioides* by PCR-ELISA based on *FUM21* gene. *Food Microbiol.*, 2018, vol. 73, pp. 160–167. doi: 10.1016/j.fm.2018.01.020.
5. Ge B., Wang B., Guo C., Sun S., Chen G., Wang X., Zhu Z., Duan C. Composition and quantitative analysis of *Fusarium* species in maize rhizosphere soil. *Sci. Agric. Sin.*, 2018, vol. 51, no. 19, pp. 3683–3693.
6. Mishra R.K., Pandey B.K., Muthukumar M., Pathak N., Zeeshan M. Detection of *Fusarium* wilt pathogens of *Psidium guajava* L. in soil using culture independent PCR (ciPCR). *Saudi J. Biol. Sci.*, 2013, vol. 20, no. 1, pp. 51–56. doi: 10.1016/j.sjbs.2012.10.007.
7. Crespo-Sempere A., Estiarte N., Marín S., Sanchis V., Ramos A.J. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. *Int. J. Food Microbiol.*, 2013, vol. 165, no. 3, pp. 214–220. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.017.
8. Kumar S., Singh R., Kashyap P.L., Srivastava A.K. Rapid detection and quantification of *Alternaria solani* in tomato. *Sci. Hortic.*, 2013, vol. 151, pp. 184–189. doi: 10.1016/j.scienta.2012.12.026.
9. von Hertwig A.M., Sant'Ana A.S., Sartori D., Silva J., Nascimento M.S., Iamanaka B.T., Pelegrinelli Fungaro M.H., Taniwaki M.H. Real-time PCR-based method for rapid detection of *Aspergillus niger* and *Aspergillus welwitschiae* isolated from coffee. *J. Microbiol. Methods*, 2018, vol. 148, pp. 87–92. doi: 10.1016/j.mimet.2018.03.010.
10. Nikitin M., Deych K., Grevtseva I., Girsova N.V., Kuznetsova M., Pridannikov M., Dzhevakhya V., Statsyuk N., Golikov A.G. Preserved microarrays for simultaneous detection and identification of six fungal potato pathogens with the use of real-time PCR in matrix format. *Biosensors*, 2018, vol. 8, no. 4, pp. 129–137. doi: 10.3390/bios8040129.

11. De la Lastra E., Basallote-Ureba M.J., De los Santos B., Miranda L., Vela-Delgado M.D., Capote N. A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil. *Sci. Hortic.*, 2018, vol. 237, pp. 128–134. doi: 10.1016/j.scienta.2018.04.007.
12. Shan L., Haseeb H.A., Zhang J., Zhang D. Jeffers D.P., Dai X., Guo W. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of toxigenic *Fusarium temperatum* in maize stalks and kernels. *Int. J. Food Microbiol.*, 2019, vol. 291, pp. 72–78. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.021.
13. Lan C., Ruan H., Yang X., Yao J. Jiang J. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen. *Phytoparasitica*, 2018, vol. 46, pp. 283–293. doi: 10.1007/s12600-018-0669-3.
14. Pu J., Xie Y., Zhang H., Zhang X., Qi Y., Peng J. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 2014, vol. 86, pp. 81–88. doi: 10.1016/j.pmpp.2014.04.002.
15. Denschlag C., Rieder J., Vogel R.F., Niessen L. Real-time loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for group specific detection of important trichothecene producing *Fusarium* species in wheat. *Int. J. Food Microbiol.*, 2014, vol. 177, pp. 117–127. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.010.
16. Jaillais B., Roumet P., Pinson-Gadais L., Bertrand D. Detection of *Fusarium* head blight contamination in wheat kernels by multivariate imaging. *Food Control*, 2015, vol. 54, pp. 250–258. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.01.048.
17. Kaya-Celiker H., Mallikarjunan P.K., Kaaya A. Mid-infrared spectroscopy for discrimination and classification of *Aspergillus* spp. contamination in peanuts. *Food Control*, 2015, vol. 52, pp. 103–111. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.013.
18. Liang P.-S., Slaughter D.C., Ortega-Beltran A., Michailides T.J. Detection of fungal infection in almond kernels using near-infrared reflectance spectroscopy. *Biosyst. Eng.*, 2015, vol. 137, pp. 64–72. doi: 10.1016/j.biosystemseng.2015.07.010.
19. Pan T., Sun D.-W., Pu H., Wei Q., Xiao W., Wang Q.-J. Detection of *A. alternata* from pear juice using surface-enhanced Raman spectroscopy based silver nanodots array. *J. Food Eng.*, 2017, vol. 215, pp. 147–155. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2017.07.019.
20. Shen F., Zhao T., Jiang X., Liu X., Fang Y., Liu Q., Hu Q., Liu X. On-line detection of toxigenic fungal infection in wheat by visible/near infrared spectroscopy. *J. Food Sci. Technol.*, 2019, vol. 109, pp. 216–224. doi: 10.1016/j.lwt.2019.04.019.
21. Shen F., Wu Q., Liu P., Jiang X., Fang Y., Cao C. Detection of *Aspergillus* spp. contamination levels in peanuts by near infrared spectroscopy and electronic nose. *Food Control*, 2018, vol. 93, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.039.
22. Tamburini E., Mamolini E., De Bastiani M., Marchetti M.G. Quantitative determination of *Fusarium proliferatum* concentration in intact garlic cloves using near-infrared spectroscopy. *Sensors*, 2016, vol. 16, no. 7, pp. 1099–1112. doi: 10.3390/s16071099.
23. Wu Q., Xie L., Xu H. Determination of toxigenic fungi and aflatoxins in nuts and dried fruits using imaging and spectroscopic techniques. *Food Chem.*, 2018, vol. 252, pp. 228–242. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.076.
24. Saldan N.C. Almeida R.T.R., Avincola A., Porto C., Galuch M.B., Magon T.F.S., Pilau E.J., Svidzinski T.I.E., Oliveira C.C. Development of an analytical method for identification of *Aspergillus flavus* based on chemical markers using HPLC-MS. *Food Chem.*, 2018, vol. 241, pp. 113–121. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.08.065.
25. Gu S., Wang J., Wang Y. Early discrimination and growth tracking of *Aspergillus* spp. contamination in rice kernels using electronic nose. *Food Chem.*, 2019, vol. 292, pp. 325–335. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.04.054.
26. Erler A., Riebe D., Beitz T., Löhmannsröben H.-G., Grothusheitkamp D., Kunz T., Methner F.-J. Detection of volatile organic compounds in the headspace above mold fungi by GC-soft X-radiation-based APCI-MS. *J. Mass Spectrom.*, 2018, vol. 53, no. 10, pp. 911–920. doi: 10.1002/jms.4210.

27. Siddiquee S., Rovina K., Yusof N.A., Rodrigues K.F., Suryani S. Nanoparticle-enhanced electrochemical biosensor with DNA immobilization and hybridization of *Trichoderma harzianum* gene. *Sens. Bio-Sens. Res.*, 2014, vol. 2, pp. 16–22. doi: 10.1016/j.sbsr.2014.06.002.
28. Peltomaa R., Vaghini S., Patiño B., Benito-Peña E., Moreno-Bondi M. Species-specific optical genosensors for the detection of mycotoxigenic *Fusarium* fungi in food samples. *Anal. Chim. Acta*, 2016, vol. 935, pp. 231–238. doi: 10.1016/j.aca.2016.06.009.
29. Cecchini F., Manzano M., Mandabi Y., Perelman E., Marks R.S. Chemiluminescent DNA optical fibre sensor for *Brettanomyces bruxellensis* detection. *J. Biotechnol.*, 2012, vol. 157, no. 1, pp. 25–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.10.004.
30. Wee E.J.H., Lau H.Y., Botella J.R., Trau M. Re-purposing bridging flocculation for on-site, rapid, qualitative DNA detection in resource-poor settings. *Chem. Commun.*, 2015, vol. 51, no. 27, pp. 5828–5831. doi: 10.1039/C4CC10068A.
31. Zhan F., Wang T., Iradukunda L., Zhan J. A gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for sensitive visual detection of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Anal. Chim. Acta*, 2018, vol. 1036, pp. 153–161. doi: 10.1016/j.aca.2018.06.083.
32. Miranda B.S., Linares E.M., Thalhammer S., Kubota L.T. Development of a disposable and highly sensitive paper-based immunosensor for early diagnosis of Asian soybean rust. *Biosens. Bioelectron.*, 2013, vol. 45, pp. 123–128. doi: 10.1016/j.bios.2013.01.048.
33. Medyantseva E.P., Khaldeeva E.V., Glushko N.I., Budnikov H.C. Amperometric enzyme immunosensor for the determination of the antigen of the pathogenic fungi *Trichophyton rubrum*. *Anal. Chim. Acta*, 2000, vol. 411, nos. 1–2, pp. 13–18.
34. Kavand A., Anton N., Vandamme T., Serra C.A., Chan-Seng D. Synthesis and functionalization of hyperbranched polymers for targeted drug delivery. *J. Controlled Release*, 2020, vol. 321, pp. 285–311. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.02.019.
35. Medyantseva E.P., Kremleva N.V., Budnikov H.C., Bormotova Y.I. Amperometric biosensor for lead and cadmium determination. *J. Anal. Chem.*, 1999, vol. 54, no. 2, pp. 151–154.
36. Yoshida K. *Elektrookislenie v organicheskoi khimii. Rol' kation radikalov kak intermediatov v sinteze* [Electrooxidation in Organic Chemistry. The Role of Cation Radicals as Synthetic Intermediates]. Moscow, Mir, 1987. 336 p. (In Russian)
37. Egorov A.M. *Teoriya i praktika immunofermentnogo analiza* [Theory and Practice of Enzyme Immunoassay]. Moscow, Vyssh. Shk., 1991. 288 p. (In Russian)
38. Musil Ya., Novakova O., Kunts K. *Sovremennaya biokhimiya v skhemakh* [Modern Biochemistry in Schemes]. Moscow, Mir, 1994. 44 p. (In Russian)

Для цитирования: Бейлинсон Р.М., Медянцева Э.П., Кириллова Е.А., Халдеева Е.В., Будников Г.К. Амперометрические иммуноферментные сенсоры в определении антигенов *Fusarium oxysporum* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 1. – С. 22–35. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.1.22-35.

For citation: Beilinson R.M., Medyantseva E.P., Kirillova E.A., Khaldeeva E.V., Budnikov H.C. Amperometric enzyme immunoassay sensors in determination of *Fusarium oxysporum* antigens. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 1, pp. 22–35. doi: 10.26907/2542-064X.2022.1.22-35. (In Russian)