

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-59

**РАЗРАБОТКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СТРЕПТОМИЦИНА В МОЛОКЕ**

**DEVELOPMENT OF AN IMMUNOCHROMATOGRAPHIC TEST SYSTEM
FOR THE DETERMINATION OF STREPTOMYCIN IN MILK**

А. Г. Гербст^{1,2}, А. А. Моисеева², А. А. Семейкина²

¹*Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва*

²*Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Москва*

A. G. Gerbst^{1,2}, A. A. Moiseeva², A. A. Semeykina²

¹*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow*

²*Bakh Institute of Biochemistry RAS, Moscow*

✉ Gerbst-Alexander@yandex.ru

Аннотация

В работе представлена разработка тест-системы для обнаружения стрептомицина в молоке, включая основные этапы и используемые компоненты. Рассмотрены методы связывания гаптена с белком, подбор оптимальных буферных сред для нанесения реагентов и проведения анализа, а также состав мультимембранного композита. Эти исследования позволили создать высокочувствительный и надежный тест для мониторинга качества молочной продукции.

Abstract

This paper presents the development of a test system for the detection of streptomycin in milk, including the main stages and components used. The methods of hapten binding to protein, the selection of optimal buffer solutions for reagent application and analysis, and the composition of the multi-membrane composite are considered. These studies have allowed the creation of a highly sensitive and reliable test for monitoring the quality of dairy products.

Стрептомицин — это антибиотик широкого спектра действия, который часто используется в ветеринарии для лечения различных инфекций животных, вызванных бактериями. Одним из важных аспектов использования стрептомицина в ветеринарии является его потенциальное попадание в молоко при лечении крупного рогатого скота. Это происходит вследствие пассивной диффузии антибиотика через эпителий молочной железы. Употребление молока с высоким содержанием стрептомицина людьми может привести к развитию устойчивых к антибиотикам бактерий, что представляет собой серьезную проблему для общественного здравоохранения. Развитие резистентности к антибиотикам — глобальная угроза, так как устойчивые патогены трудно поддаются лечению и могут вызывать серьезные и потенциально опасные для жизни инфекции.

Среди множества методов определения содержания антибиотиков в молоке, представленных на рынке, иммунохроматографический анализ выделяется как наиболее перспективный. Иммунохроматографический метод анализа основан на принципах специфического взаимодействия антител с антигенами и используется для качественного или количественного определения различных веществ, таких как антибиотики. Поэтому целью исследования является разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления стрептомицина в молоке.

Для реализации исследования в качестве маркера использованы частицы цветных латексов, которые были конъюгированы с моноклональными антителами против стрептомицина карбодиимидно-сукцинимидным методом.

Конъюгат гаптена с белком синтезирован из стрептомицин-сульфата с использованием таких химических реагентов, как цианурхлорид и триэтиламин в качестве катализатора. В качестве белка использовали бычий сывороточный альбумин (БСА). При синтезе гаптен-белка проведен подбор концентрации активного вещества стрептомицина (от 17 до 68 мг/мл) и концентрации белка (от 5 до 20 мг/мл) для достижения наиболее стабильного связывания с БСА и низкого предела детекции. По результатам экспериментальных данных подобраны оптимальные концентрации для синтеза, а именно: стрептомицин-сульфат — 68 мг/мл, БСА — 20 мг/мл.

Проведена оптимизация условий для нанесения реагентов на рабочую мембрану. Исследовались три типа буферных растворов: на основе триса, бората и фосфатных солей. Определялась оптимальная молярность (от 10

до 50 мМ) и концентрации добавок в виде сахаров, таких как сахароза, мальтоза и трегалоза (от 1 до 4 %). Наилучшие результаты работы реагентов достигнуты при использовании буферного раствора на основе бората (10 мМ) с добавлением 4 % трегалозы.

В ходе разработки иммунохроматографической тест-системы проведена оптимизация состава мульти-мембранного композита. Осуществлена сравнительная оценка рабочих мембран (Sartorius, Германия), а также мембран для образца и конъюгата (KinBio, Китай). Применение микростекловолоконной мембраны для образца ВТ-03 и стекловолоконной мембраны для конъюгата СВ-06 от компании KinBio обеспечило более высокую чувствительность и интенсивность окрашивания по сравнению с другими типами мембран. В качестве рабочей мембраны выбрана CN-95 (Sartorius), которая обладает подходящим размером пор и обеспечивает равномерное прохождение образца молока с комплексом биореагентов к тестовой и контрольной зонам.

В процессе экспериментов подобрана реакционная среда для достижения минимального предела обнаружения. Оценены три типа буферных растворов: на основе трис-соединения, а также солей бората и фосфата. Исследованы диапазоны pH (от 6 до 9) и молярности (от 50 до 200 мМ) для каждой из выбранных буферных основ. Наилучшие характеристики тест-системы достигнуты при использовании трис буфера с молярностью 100 мМ и pH 8,5.

Предел обнаружения разработанной иммунохроматографической тест-системы для определения антибиотика стрептомицина в молоке при визуальном анализе составляет 200 нг/мл. Время проведения анализа — 10 мин. Полученные результаты соответствуют требованиям российского законодательства (СанПиН 2.3.2.1078-01), что подтверждает пригодность тест-системы для контроля содержания стрептомицина в молоке.