РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 406 090** (13) **C2**

(51) МПК
G01N 33/50 (2006.01)
A23C 9/158 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2009105439/10, 18.02.2009

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 18.02.2009

(43) Дата публикации заявки: 27.08.2010

(45) Опубликовано: 10.12.2010 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: SU 1493949 A1, 15.07.1989. RU 2188421 C2, 19.05.2000. SU 1313353 A3, 23.05.1987. US 5434053 A, 18.07.1995. EP 0593112 A1, 20.04.1994. JP 63269999 A, 08.11.1988. WO 8102792 A1, 01.10.1981. CHARM S.L. Beta-lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftijfur, cephapirin and penicillin G. Operator's manual for raw, commingled bovine or goat milk, (см. прод.)

Адрес для переписки:
119071, Москва, Ленинский пр-кт, 33, стр.2, Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Патентоведу Т.М. Мелентьевой

(72) Автор(ы):
Дзантиев Борис Борисович (RU),
Бызова Надежда Алексеевна (RU),
Зверева Елена Анатольевна (RU),
Жердев Анатолий Виталиевич (RU),
Еремин Сергей Александрович (RU),
Грачев Олег Викторович (RU),
Горбовский Александр Дмитриевич (RU),
Свешников Петр Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Учреждение Российской академии наук Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН (ИНБИ РАН) (RU),
Общество с ограниченной ответственностью "Фармаблок" (RU),
Открытое акционерное общество "Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения" (ВНЦМДЛ) (RU)

RU 2406090 C2

(54) СПОСОБ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу иммуноанализа антибиотиков в молочных продуктах. Используют мультимембранный композит, в определенные зоны которого нанесены: 1) частицы окрашенного маркера в комплексе с антителами 1, специфичными к антибиотику; 2) конъюгат антибиотика с молекулой-носителем, обеспечивающей иммобилизацию конъюгата на мембране; 3) иммобилизованные на мембране антитела 2, специфичные к антителам 1 (контрольная зона). При контакте мультимембранного композита с тестируемой пробой молока или молочного продукта в определенной зоне или зонах мультимембранного композита образуются окрашенные полосы или полоса, которые интерпретируют как: а) при окрашивании только контрольной зоны - наличие в пробе определяемого антибиотика; б) при окрашивании аналитической и контрольной зон - отсутствие в пробе определяемого антибиотика. Особенностью предлагаемого подхода является использование специально подобранного сочетания антител 1 с высокой скоростью взаимодействия с антигеном, при кинетической константе реакции ассоциации не менее 10^5 M^{-1} $сек^{-1}$, мембранных носителей с размером пор не менее 10 мкм и частиц окрашенного маркера со средним диаметром не менее 30 нм. Изобретение позволяет проводить экспресс-анализ определения антибиотиков в молочных продуктах во внелабораторных условиях. 4 ил.

RU 2406090 C2

(56) (продолжение):
найдено в Интернете по адресу: http://www.idfa.org/reg/ncims/M-I-03-3-ATTACHMENT-FINAL.pdf.

RU 2406090 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** (11) **2 406 090** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01)
A23C 9/158 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2009105439/10, 18.02.2009

(24) Effective date for property rights:
18.02.2009

(43) Application published: 27.08.2010

(45) Date of publication: 10.12.2010 Bull. 34

Mail address:
119071, Moskva, Leninskij pr-kt, 33, str.2,
Institut biokhimii im. A.N. Bakha RAN,
Patentovedu T.M. Melent'evoj

(72) Inventor(s):
Dzantiev Boris Borisovich (RU),
Byzova Nadezhda Alekseevna (RU),
Zvereva Elena Anatol'evna (RU),
Zherdev Anatolij Vitalievich (RU),
Eremin Sergej Aleksandrovich (RU),
Grachev Oleg Viktorovich (RU),
Gorbovskij Aleksandr Dmitrievich (RU),
Sveshnikov Petr Georgievich (RU)

(73) Proprietor(s):
Uchrezhdenie Rossijskoj akademii nauk Institut biokhimii imeni A.N. Bakha RAN (INBI RAN) (RU),
Obshchestvo s ogranichennoj otvetstvennost'ju "Farmablok" (RU),
Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo "Vserossijskij nauchnyj tsentr molekuljarnoj diagnostiki i lechenija" (VNTsMDL) (RU)

(54) METHOD OF IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ASSAY OF MILK AND DAIRY PRODUCTS FOR ANTIBIOTICS

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: there is used a multi-membrane composite in certain regions of which there are applied: 1) coloured marker particles in complex with antibiotic specific antibodies 1, 2) antibiotic conjugate with a carrier molecule providing conjugate immobilisation on the membrane, 3) membrane immobilised antibodies 1 specific antibodies 2 (a reference zone). Once the multi-membrane composite contacts with sampled milk or dairy product to be tested, a coloured strip or strips are formed in a certain zone or zones of the multi-membrane composite to be interpreted as follows: a) the reference zone coloured - the presence of the antibiotics to be detected in the sample, b) the analytical and reference zones coloured - the absence of the antibiotics to be detected in the sample. A characteristic property of the offered approach is the use of a specially specified combination of antibodies 1 of high reaction rate with an antigen at a kinetic association reaction constant not less than 10^5 M^{-1} sec^{-1}, the membrane carriers of pore size not less than 10 mcm and coloured marker particles of average diametre not less than 30 nm.

EFFECT: invention allows non-laboratory express assay of dairy products for antibiotics.

4 dwg, 4 ex

RU 2406090 C2

RU 2406090 C2

Изобретение относится к аналитической биохимии и биохимии пищевых продуктов и может применяться для целей управления технологическими процессами и контроля готовой продукции.

В настоящее время антибиотики широко используются не только для борьбы с инфекционными заболеваниями человека, но и как средство профилактики и лечения заболеваний животных. В связи с этим существенным фактором риска становится поступление антибиотиков в организм человека с продуктами питания, которое может вызывать ряд нежелательных эффектов: дисбактериозы, развитие устойчивых форм микроорганизмов, аллергические реакции, подавление активности некоторых ферментов и т.д. (Bennish M.L. Animals, humans, and antibiotics: implications of the veterinary use of antibiotics on human health. Adv. Pediatr. Infect. Dis. 1999; 14: 269-290; Pedersen K.B., Aarestrup F.M., Jensen N.E., Bager F., Jensen L.B., Jorsal S.E., Nielsen T.K., Hansen H.C., Meyling A, Wegener H.C. The need for a veterinary antibiotic policy. Vet. Rec. 1999; 145 (2): 50-53; Schwarz S., Kehrenberg C., Walsh T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrob. Agents. 2001; 17 (6): 431-437; Hardy B. The issue of antibiotic use in the livestock industry: what have we learned? Anim. Biotechnol. 2002; 13 (1): 129-147; Ibrahim C. Management options with the regard to authorization of antibiotics in veterinary medicine. Int. J. Med. Microbiol. 2006; 296 (Suppl. 41): 51-54).

Для контроля содержания антибиотиков в продуктах питания предложены и используются различные аналитические методы как микробиологические, так и химические.

Микробиологическое тестирование основано на подавлении антибиотиками, содержащимися в пробе, роста тест-культуры микроорганизма или синтеза данным микроорганизмом специфического фермента. Поскольку используемые в практике антибиотики характеризуются широким спектром действия, для тестирования могут использоваться представители различных систематических групп микроорганизмов. Так, в патенте РФ №2000112381 (Леви М.И., Сучков Ю.Г. Способ экспрессного определения антибиотиков биологическим методом) предлагается применение высокочувствительных к антибиотикам штаммов термофильных бактерий с температурным оптимумом роста (50-60)°С. Авторы патента РФ №2063030 (Гудков А.В., Гудкова М.Я., Карликанова С.Н., Немирова B.C., Скобелев В.И. Способ определения ингибирующих веществ в молоке) рекомендуют использование специально подобранного штамма Streptococcus tnermophilus B-19. Применение тест-культуры Е. coli описано в патенте РФ №2002112511 (Лазаренко В.Н., Ветровая P.P., Сунагатуллин Ф.А., Царева О.М., Юсупова P.M., Галимов Д.М. Способ определения бактерицидной активности молока). Для детекции влияния антибиотиков на жизнедеятельность тестовых микроорганизмов, как правило, характеризуют изменения их метаболической активности, что существенно менее трудоемко, чем контроль количества микроорганизмов. Окислительная активность ферментов тестовых микроорганизмов в среде, содержащей пробу молока, сопровождается сдвигом рН. В качестве рН-индикатора используют растворы лакмуса или бромкрезолового пурпурного. Из восстановительных методов применяют пробы с метиленовой синью или с трифенил-тетразолхлоридом, а также диффузионный метод с использованием агара, который содержит окислительно-восстановительный индикатор и тестовые микроорганизмы (Кильвайн Г. Руководство по молочному делу и гигиене молока. М.: Россельхозиздат, 1980).

Хотя микробиологические методы предоставляют адекватную информацию о содержании в пробе физиологически активных молекул антибиотиков, их реализация требует довольно длительного времени - как правило, несколько часов.

Альтернативой микробиологическим методам являются химико-аналитические методы определения антибиотиков. Для детекции антибиотиков разработаны разнообразные методики, основанные на принципах капиллярного электрофореза, газовой и жидкостной хроматографии (Shaikh B., Moats W.A. Liquid chromatographic analysis of antibacterial drug residues in food products of animal origin. J. Chromatogr. 1993; 643 (1-2): 369-378; Schenck F.J., Callery P.S. Chromatographic methods of analysis of antibiotics in milk. J. Chromatogr. A. 1998; 812 (1-2): 99-109; Flurer C.L. Analysis of antibiotics by capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2003; 24 (22-23): 4116-4127; Stolker A.A., Brinkman U.A. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. J. Chromatogr. A. 2005; 1067 (1-2): 15-53; Castro-Puyana M., Crego A.L, Marina M.L. Recent advances in the analysis of antibiotics by CE and CEC. Electrophoresis. 2008; 29 (1): 274-293; Samanidou V., Nisyriou S. Multi-residue methods for confirmatory determination of antibiotics in milk. J Sep Sci 2008; 31 (11): 2068-2090). Однако, несмотря на высокую чувствительность (до 1 нг/мл и ниже), эти методы имеют существенные ограничения как средства массового скрининга. Для их реализации необходимо сложное дорогостоящее оборудование и квалифицированный персонал. К тому же хроматографический анализ предполагает проведение специальной пробоподготовки - экстракции детектируемого соединения, его концентрирования и других предварительных манипуляций.

Применение же простых качественных реакций на антибиотики с фотометрической детекцией результатов (Patetta C.F., Fischer L. Spectrophotometric assay for quantitative determination of 7-aminocephalosporanic acid from direct hydrolysis of cephalosporin C. Anal. Biochem. 2006,350 (2): 304-306; Darwish I.A., Refaat I.H., Askal H.F., Marzouq M.A. Generic nonextractive spectrophotometric method for determination of 4-quino-naphthollone antibiotics by formation of ion-pair complexes with β-naphthol. J. AOAC Intern. 2006, 89 (2): 334-340; Kanakapura B., Rangachar A.K.U. Sensitive spectrophotometric methods for quantitative determination of gatifloxacin in pharmaceutical formulations using bromate-bromide, thiocyanate and tiron as reagents. J. Mex. Chem. Soc. 2007, 51 (2): 106-112; Okoye N.N., Nwokedi G.I.C., Ukwueze N.N., Okoye F.B.C. Spectrophotometric determination of some cephalosporin antibiotics using Prussian blue reaction. Sci. Res. & Essay. 2007, 2 (8): 342-347), как правило, не обеспечивает достаточной чувствительности анализа. Ведь в соответствии с установленными пороговыми уровнями их допустимого содержания антибиотиков в пищевой продукции может требоваться их выявление в концентрациях до 10 нг/мл, что в среднем на 1-2 порядка ниже, чем пределы детекции фотометрических методов.

С учетом рассмотренных выше ограничений микробиологических и химических методов определения антибиотиков существует необходимость создания альтернативных аналитических методов, которые являются экспрессными, могут быть реализованы с минимальной трудоемкостью и превосходят по чувствительности традиционную спектрофотометрию. Перечисленные требования могут быть выполнены при использовании в качестве реагента, взаимодействующего с молекулами антибиотиков, специфических антител. Разработан ряд методов иммунохимической детекции антибиотиков. Большую часть из них составляют микропланшетные твердофазные иммуноферментные аналитические системы, в которых образующиеся иммунные комплексы выявляются на основании измерения каталитической активности фермента, соединенного с одним из взаимодействующих иммунореагентов (Martlbauer E., Usleber E., Schneider E., Dietrich R. Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. Analyst. 1994; 119 (12): 2543-2548; Kolosova A.Y., Samsonova J.V., Egorov A.M. Competitive ELISA of chloramphenicol: influence of immunoreagent structure and application of the method for the inspection of food of animal origin. Food Agric. Immunol. 2000. 12: 115-125; Loomans E.E., Van Wiltenburg J., Koets M., Van Amerongen A. Neamin as an immunogen for the development of a generic ELISA detecting gentamicin, kanamycin, and neomycin in milk. J. Agric. Food Chem. 2003.29; 51 (3): 587-593; Kumar K., Thompson A., Singh A.K., Chander Y., Gupta S.C. Enzyme-linked immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples. J. Environ. Qual. 2004; 33 (1): 250-256; Pattarawarapan M., Nangola S., Ayapiwatana C.Establishment of competitive ELISA for detection of chloramphenicol. Chiang Mai J. Sci. 2006. 33 (1): 85-94; Fitzgerald S.P., O'Loan N., Mcconnell R.I., Benchikh el O., Kane N.E. Stable competitive enzyme-linked immunosorbent assay kit for rapid measurement of 11 active beta-lactams in milk, tissue, urine, and serum. J. AOAC Intern. 2007; 90 (1): 334-342). Однако иммуноферментный анализ в силу диффузионных ограничений характеризуется продолжительностью от одного до нескольких часов и, кроме того, предполагает использование специального оборудования для решения двух задач: отделения прореагировавших молекул от непрореагировавших и фотометрической регистрации активности связавшейся с носителем ферментной метки.

Требованиям экспрессности и низкой трудоемкости в полной мере удовлетворяет иммунохроматографический вариант иммунохимического анализа. В иммунохроматографических аналитических системах на мультимембранный композит (тест-полоску) нанесены реагенты, необходимые для выявления определяемого соединения, и контакт тест-полоски с анализируемой жидкой пробой непосредственно инициирует протекание специфических взаимодействий в ходе движения жидкости по мембранам композита и формирования в определенных его зонах окрашенных полос, свидетельствующих о наличии или отсутствии в пробе определяемого соединения. Системы иммунохроматографического анализа разработаны для ряда соединений разных классов, в том числе и для антибиотиков (Muir D.D. Report of a survey of antibiotic test methods for raw milk, commissioned by the Dairy Industry Federation. 1999. Hannah Research Institute: Ayr; Legg D.R., Baumgartner A., Salter R., Wheeler A. ROSA (Rapid One Step Assay) for antibiotics in honey. Apiacta. 2003. 38: 207-217). Однако при анализе молока и молочных продуктов методом иммунохроматографии возникает необходимость в исключении блокирующего действия компонентов пробы на взаимодействие с иммобилизованными иммунореагентами, а также в предотвращении препятствия вязкости проб движению жидкости по мультимембранному композиту. В качестве принципиального решения, исключающего негативное влияние этих факторов, используется инкубация тест-полоски при повышенной температуре. Данный подход реализован, в частности, в тест-системах Charm Rosa® (Charm Science Inc.). Ниже представлено изложение предлагаемого разработчиками этих тест-систем способа проведения анализа бета-лактамных антибиотиков в молоке (согласно руководству пользователя «Charm SL. Beta-lactam test for amoxicillin, ampicillin, ceftiofur, cephapirin and penicillin G. Operator's manual for raw, commingled bovine or goat milk» (http: //www.idfa.org/reg/ncims/M-I-03-3-ATTACHMENT-FrNAL.pdf)), рассматриваемого в настоящей заявке в качестве прототипного:

Подготовка

Инкубатор ROSA для тест-полосок должен находиться в закрытом состоянии все время, когда он не используется для проведения анализа. Зеленый индикатор инкубатора ROSA должен показывать, что температура внутри инкубатора равняется 56±1°С. Рекомендуется проводить ежедневную проверку, используя для этого термометр. Инкубатор должен находиться в чистом состоянии.

Перед тестированием пробу молока необходимо хорошо перемешать. При тестировании замороженного или восстановленного порошкового молока его необходимо центрифугировать в течение 3 мин при 1200±200 g и отбирать надосадок для проведения анализа Множественные образцы могут инкубироваться одновременно в 2- или 4-местном инкубаторе.

Процедура

1. Пометьте тест-полоску для идентификации анализируемого образца. Вскройте упаковку и поместите тест-полоску для анализа бета-лактамов SL Beta-lactam Test в инкубатор ROSA так, чтобы ее плоская сторона оказалась сверху. Тест-полоска должна занимать предназначенное для нее углубление в инкубаторе.

Удерживая тест-полоску в инкубаторе в том же положении, отогните белую наклейку, закрывающую подложку для нанесения образца. Избегайте изгиба белой наклейки и ее попадания под тест-полоску.

2. Тщательно перемешайте пробу молока.

Медленно, чтобы избежать разлива, нанесите пипеткой 300±15 мкл молока или отцентрифугированного образца на подложку для нанесения образца. Наклейте белую наклейку на подложку для нанесения образца, надавив на нее. При тестировании нескольких образцов необходимо проделать полный цикл по отклеиванию, нанесению образца и заклеиванию, прежде чем переходить к следующей тест-полоске.

Закройте крышку инкубатора и зажмите ее с помощью защелки <…>

3. Инкубируйте в течение как минимум 8 мин, но не более чем 10 мин. После 8 мин индикатор инкубатора начнет мигать желтым светом и издавать звуковой сигнал в течение 2 мин. Уберите тест-полоску из инкубатора, прежде чем закончится звуковой сигнал, и закройте крышку.

Визуальная оценка результатов

Осторожно положите тест-полоску, избегая ее сминания. Если на полоске находятся посторонние компоненты (молоко, высохшее молоко, пыль и т.д.), аккуратно удалите их. Визуально оцените результаты анализа, сравнив тестовую и контрольную линии <…> Если контрольная линия отсутствует, смазана или неравномерна, то результаты тестирования следует считать недействительными, а анализ повторить.

Отметим, что из-за использования дополнительного оборудования - специального термостата для тест-полосок - проведение анализа непосредственно на месте отбора проб становится невозможным. К тому же необходимость приобретения термостата повышает стоимость анализа и тем самым препятствует широкому применению тест-систем для скринингового контроля.

Использование в прототипном способе анализа инкубирования тест-полоски при повышенной температуре (56±1°С) является принципиальным элементом методики, исключение которой при работе с той же тест-системой не позволит получать достоверные результаты тестирования проб. Отказ от инкубирования и проведение анализа при комнатной температуре увеличивают как вязкость пробы, так и степень неспецифического блокирования ее компонентами сайтов связывания окрашенного маркера на мембране. В связи с этим для перехода к анализу, проводимому при комнатной температуре, необходимо конструктивное решение, обеспечивающее высокую степень связывания маркера при детекции разных антибиотиков в молоке и молочных продуктах.

В настоящей заявке предлагается для этих целей использовать сочетание антител с высокой скоростью взаимодействия с антибиотиком-антигеном (кинетическая константа реакции ассоциации не менее 10^5 $М^{-1}сек^{-1}$), мембранных носителей с большим размером пор (не менее 10 мкм) и частиц окрашенного маркера с большими размерами (средний диаметр не менее 30 нм). Для такой комплектации мультимембранного композита одновременно обеспечиваются значительная степень протекания реакции специфических к антибиотику антител со свободными и иммобилизованными молекулами антибиотика-антигена и относительно небольшая степень блокирования компонентами тестируемой пробы взаимодействия между окрашенным маркером и иммобилизованными реагентами, что позволяет получать достоверные данные о содержании антибиотиков в пробах молока или молочных продуктов, проводя анализ при комнатной температуре. Благодаря этому анализ проводится без использования какого бы то ни было дополнительного оборудования, во внелабораторных условиях. Конкретные препараты антител и размерные характеристики мембран и маркера подбираются отдельно в каждом случае так, чтобы при их использовании пороговая концентрация антибиотика-антигена в пробе, при которой исчезает окрашивание аналитической полосы тест-полоски (зоны связывания конъюгата окрашенного маркера с антителами и иммобилизованного конъюгата антибиотик-носитель), соответствовала контролируемой предельно допустимой концентрации данного антибиотика в пищевой продукции.

Для иммунохроматографических систем известно, что эффективность связывания окрашенного маркера с носителем зависит от режима проведения взаимодействия между иммобилизованным и движущимся с потоком жидкости реагентом и степени достижения данной иммунохимической реакцией равновесия. Однако обычно (см., например, Rapid Lateral Flow Test Strips. Considerations for Product Development. Millipore. 2008) для увеличения степени связывания применяют замедление движения жидкости, что в данном случае неприемлемо, т.к. замедление приводит к росту неспецифической блокировки компонентами пробы сайтов связывания на мембране. Поэтому в предлагаемой системе используются крупнопористые мембраны, характеризующиеся высокой скоростью движения жидкости, а эффективность связывания обеспечивают антитела с высокой кинетической константой взаимодействия с антигеном. Тем самым выбор препарата антител против антибиотика, используемого в анализе, должен включать его характеристику по равновесной константе связывания, определяющей величину порогового уровня детекции (концентрации, при которой в аналитической зоне мультимембранного композита происходит исчезновение/появление окрашивания), и по кинетической константе, определяющей яркость полосы в аналитической зоне. При этом использование крупнопористых мембран предотвращает неспецифическую блокировку сайтов связывания, а использование крупных коллоидных частиц компенсирует меньшую объемную плотность сайтов связывания у крупнопористых мембран по сравнению с мелкопористыми.

Отказ от инкубации тест-полосок при повышенной температуре обеспечивает возможность проведения анализа проб молока и молочных продуктов без какого бы то ни было дополнительного оборудования во внелабораторных условиях. Тем самым становится возможным более широкий скрининг как сырья в молокоперерабатывающей промышленности, так и готовой продукции. Оперативное получение информации о содержании антибиотиков позволяет своевременно принимать решения о порядке использования сырья и готовой продукции, тем самым повышая производительность технологических процессов и расширяя возможности защиты здоровья населения.

Возможность реализации и эффективность предлагаемого подхода подтверждают представленные ниже примеры иммунохроматографического анализа различных антибиотиков. Выбранные концентрации антибиотиков - 10 нг/мл для хлорамфеникола, 500 нг/мл для стрептомицина и 10 нг/мл для ампициллина (представителя бета-лактамных антибиотиков) - соответствуют установленным максимальным допустимым уровням их содержания в молоке и молочных продуктах.

Пример 1. Иммунохроматографический анализ хлорамфеникола (левомицетина) в молоке

Формирование мультимембранного композита

Иммунохроматографическую систему собирают из набора мембран, включающего рабочую мембрану с размером пор 10 мкм, подложку под конъюгат, мембрану для нанесения образца, адсорбирующую мембрану и ламинирующую защитную пленку. Конъюгаты коллоидного золота со средним диаметром частиц 30 нм и моноклональных антител к хлорамфениколу наносят на подложку под конъюгат в объеме 32 мкл на 1 см полосы в разведении, соответствующем A_{520}=2,0. Для формирования аналитической зоны на рабочей мембране используют конъюгат хлорамфеникол-соевый ингибитор трипсина, контрольной зоны - антивидовые овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши. На 1 см полосы наносят 2 мкл конъюгата (0,5 мкг/мл) и 2 мкл антивидовых антител (0,5 мг/мл).

Проведение анализа.

В пластиковый флакон вносят 2 мл анализируемой пробы (молоко без разбавления). Тест-полоску погружают строго вертикально в анализируемую пробу до дна флакона на 2,5-3 мин.

Извлекают тест-полоску из флакона, кладут ее на горизонтальную поверхность и через 8-10 мин визуально оценивают результат анализа. При необходимости связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрируют количественно с помощью рефлектометрического компьютерного видеоцифрового анализатора «Рефлеком» (ООО «Окта-Медика», Россия).

Результаты тестирования проб молока с разным содержанием хлорамфеникола представлены на фиг.1. Появление двух параллельных линий розового цвета (фиг.1,а) свидетельствует о том, что в пробе не содержится хлорамфеникол или его концентрация ниже 10 нг/мл. Появление одной линии розового цвета (фиг.1,б) свидетельствует о том, что концентрация хлорамфеникола в пробе равна или выше 10 нг/мл.

Пример 2. Иммунохроматографический анализ хлорамфеникола (левомицетина) в кефире

Формирование мультимембранного композита

Иммунохроматографическую систему собирают из набора мембран, включающего рабочую мембрану с размером пор 10 мкм, подложку под конъюгат, мембрану для нанесения образца, адсорбирующую мембрану и ламинирующую защитную пленку. Конъюгаты коллоидного золота со средним диаметром частиц 30 нм и моноклональных антител к хлорамфениколу наносят на подложку под конъюгат в объеме 32 мкл на 1 см полосы в разведении, соответствующем A_{520}=2,0. Для формирования аналитической зоны на рабочей мембране используют конъюгат хлорамфеникол-соевый ингибитор трипсина, контрольной зоны - антивидовые овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши. На 1 см полосы наносят 2 мкл конъюгата (0,5 мкг/мл) и 2 мкл антивидовых антител (0,5 мг/мл).

Проведение анализа

В пластиковый флакон вносят 2 мл анализируемой пробы (смешивая 1,5 мл кефира и 0,5 мл воды). Тест-полоску погружают строго вертикально в анализируемую пробу до дна флакона на 2,5-3 мин.

Извлекают тест-полоску из флакона, кладут ее на горизонтальную поверхность и через 8-10 мин визуально оценивают результат анализа. При необходимости связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрируют количественно с помощью рефлектометрического компьютерного видеоцифрового анализатора «Рефлеком» (ООО «Окта-Медика», Россия).

Результаты тестирования проб кефира с разным содержанием хлорамфеникола представлены на фиг.2. Появление двух параллельных линий розового цвета (фиг.2,а) свидетельствует о том, что в пробе не содержится хлорамфеникол или его концентрация ниже 10 нг/мл. Появление одной линии розового цвета (фиг.2,б) свидетельствует о том, что концентрация хлорамфеникола в пробе равна или выше 10 нг/мл.

Пример 3. Иммунохроматографический анализ стрептомицина в молоке

Формирование мультимембранного композита

Иммунохроматографическую систему собирают из набора мембран, включающего рабочую мембрану с размером пор 10 мкм, подложку под конъюгат, мембрану для нанесения образца, адсорбирующую мембрану и ламинирующую защитную пленку. Конъюгаты коллоидного золота со средним диаметром частиц 30 нм и моноклональных антител к стрептомицину наносят на подложку под конъюгат в объеме 32 мкл на 1 см полосы в разведении, соответствующем A_{520}=2,0. Для формирования аналитической зоны на рабочей мембране используют конъюгат стрептомицин-яичный альбумин, контрольной зоны - антивидовые овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши. На 1 см полосы наносят 2 мкл конъюгата (0,5 мкг/мл) и 2 мкл антивидовых антител (0,5 мг/мл).

Проведение анализа.

В пластиковый флакон вносят 2 мл анализируемой пробы (молоко без разбавления). Тест-полоску погружают строго вертикально в анализируемую пробу до дна флакона на 2,5-3 мин.

Извлекают тест-полоску из флакона, кладут ее на горизонтальную поверхность и через 8-10 мин визуально оценивают результат анализа. При необходимости связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрируют количественно с помощью рефлектометрического компьютерного видеоцифрового анализатора «Рефлеком» (ООО «Окта-Медика», Россия).

Результаты тестирования проб молока с разным содержанием стрептомицина представлены на фиг.3. Появление двух параллельных линий розового цвета (фиг.3,а) свидетельствует о том, что в пробе не содержится стрептомицин или его концентрация ниже 500 нг/мл. Появление одной линии розового цвета (фиг.3,б) свидетельствует о том, что концентрация стрептомицина в пробе равна или выше 500 нг/мл.

Пример 4. Иммунохроматографический анализ ампициллина в молоке

Формирование мультимембранного композита

Иммунохроматографическую систему собирают из набора мембран, включающего рабочую мембрану с размером пор 10 мкм, подложку под конъюгат, мембрану для нанесения образца, адсорбирующую мембрану и ламинирующую защитную пленку. Конъюгаты коллоидного золота со средним диаметром частиц 30 нм и моноклональных антител к бета-лактамным антибиотикам наносят на подложку под конъюгат в объеме 32 мкл на 1 см полосы в разведении, соответствующем A_{520}=2,0. Для формирования аналитической зоны на рабочей мембране используют конъюгат пенициллин-бычий сывороточный альбумин, контрольной зоны - антивидовые овечьи антитела против иммуноглобулинов мыши. На 1 см полосы наносят 1 мкл конъюгата (0,4 мкг/мл) и 2 мкл антивидовых антител (0,4 мг/мл).

Проведение анализа

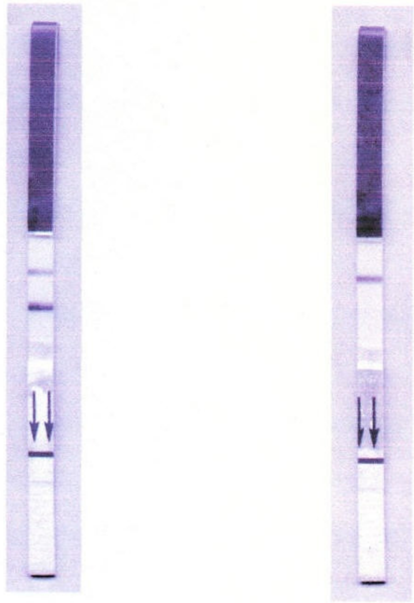
В пластиковый флакон вносят 2 мл анализируемой пробы (молоко без разбавления). Тест-полоску погружают строго вертикально в анализируемую пробу до дна флакона на 2,5-3 мин.

Извлекают тест-полоску из флакона, кладут ее на горизонтальную поверхность и через 8-10 мин визуально оценивают результат анализа. При необходимости связывание коллоида в контрольной и аналитической зонах регистрируют количественно с помощью рефлектометрического компьютерного видеоцифрового анализатора «Рефлеком» (ООО «Окта-Медика», Россия).

Результаты тестирования проб молока с разным содержанием ампициллина представлены на фиг.4. Появление двух параллельных линий розового цвета (фиг.4,а) свидетельствует о том, что в пробе не содержится ампициллин или его концентрация ниже 10 нг/мл. Появление одной линии розового цвета (фиг.4,б) свидетельствует о том, что концентрация ампициллина в пробе равна или выше 10 нг/мл.

Формула изобретения

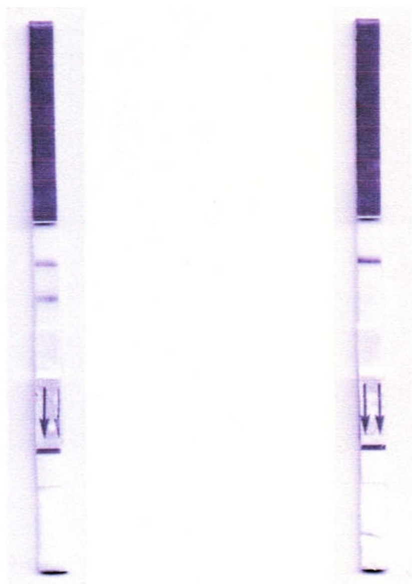
Способ иммунохроматографического определения антибиотика в молоке и молочных продуктах, включающий использование мультимембранного композита, в определенные зоны которого нанесены: 1) частицы окрашенного маркера в комплексе с антителами 1, специфичными к антибиотику, 2) конъюгат антибиотика с молекулой-носителем, обеспечивающей иммобилизацию конъюгата на мембране, 3) иммобилизованные на мембране антитела 2, специфичные к антителам 1 (контрольная зона), предусматривающий контакт мультимембранного композита с тестируемой пробой молока или молочного продукта и визуальную регистрацию образования в определенной зоне или зонах мультимембранного композита окрашенной полосы или полос, которую интерпретируют: а) при окрашивании только контрольной зоны - как свидетельство наличия в пробе определяемого антибиотика в концентрации, равной или превосходящей установленную пороговую концентрацию, б) при окрашивании аналитической и контрольной зон - как свидетельство отсутствия в пробе определяемого антибиотика или его наличия в пробе более низкой концентрации по сравнению с установленной пороговой концентрацией, отличающийся тем, что подбирают сочетания антител 1 с высокой скоростью взаимодействия с антигеном, при кинетической константе реакции ассоциации не менее 10^5 M^{-1} c^{-1}, мембранных носителей с размером пор не менее 10 мкм и частиц окрашенного маркера со средним диаметром не менее 30 нм.



а б

а – хлорамфеникол в пробе отсутствует, б – концентрация хлорамфеникола в пробе 10 нг/мл.

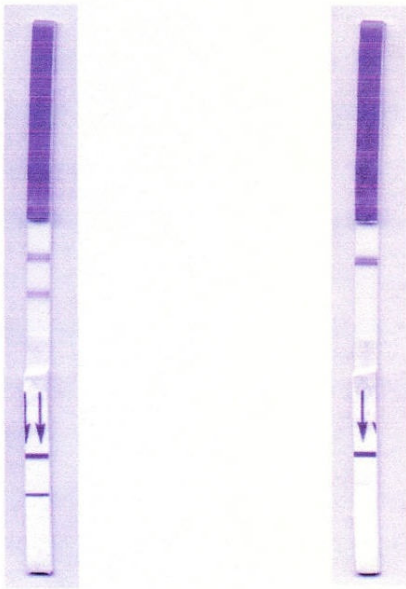
Фиг.1



а б

а – хлорамфеникол в пробе отсутствует, б – концентрация хлорамфеникола в пробе 10 нг/мл.

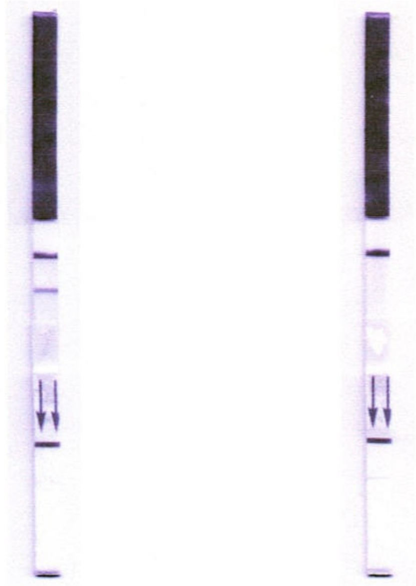
Фиг.2



а б

а – стрептомицин в пробе отсутствует, б – концентрация стрептомицина в пробе 500 нг/мл.

Фиг.3



а б

а – ампициллин в пробе отсутствует, б – концентрация ампициллина в пробе 10 нг/мл.

Фиг.4