

УДК 577.11

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-565-581>

EDN SCSQPA



## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

# Разработка иммунохроматографического анализа для одновременного обнаружения тетрациклинов и стрептомицина в молоке

И.В. Максин<sup>1,2,✉</sup>, Д.И. Полякова<sup>2,3</sup>, В.А. Кесарева<sup>2,3</sup>, А.А. Сысуев<sup>1</sup>, В.С. Иванов<sup>2</sup>,  
Е.И. Симонова<sup>2,3</sup>, Г.А. Хунтеев<sup>2</sup>, Ю.Г. Кириллова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119454 Россия

<sup>2</sup> ООО «Рapid Био», Москва, 121205 Россия

<sup>3</sup> Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, 117198 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: [taxinivanv@gmail.com](mailto:taxinivanv@gmail.com)

## Аннотация

**Цели.** Оптимизация стабильности конъюгатов, полученных методом непрямой иммобилизации специфических антител на наночастицах золота (НЧЗ) при помощи антивидовых антител, и разработка на их основе иммунохроматографического анализа (ИХА) для определения антибиотиков в молоке.

**Методы.** НЧЗ синтезировали восстановлением золотохлористоводородной кислоты в присутствии зародышей. Размер определяли спектрофотометрически по литературным данным на приборе *Thermo Fisher Scientific Varioskan LUX*. Моноклональные мышиные антитела к тетрациклину и стрептомицину иммобилизовали на поверхности НЧЗ посредством анти-мышиных антител. Конъюгаты бычьего сывороточного альбумина с тетрациклином и стрептомицином получали реакцией Манниха и клик-реакцией соответственно. Степень конъюгации определяли при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии на приборе *Bruker RapifleX*. Иммунореагенты наносили на нитроцеллюлозную мембрану на диспенсере *BioDot ZX1010*. Собранный мультимембранный композит нарезали на тест-полоски на гильотинном резчике *KinBio ZQ4500*. Результаты ИХА интерпретировали визуально, а также при помощи считывателя тест-полосок *Allsheng TSR-100*.

**Результаты.** После получения конъюгатов посредством непрямой иммобилизации при помощи антивидовых антител необходимо проводить блокировку оставшихся незанятыми сайтов связывания антивидовых антител, чтобы повысить стабильность конъюгатов в растворе. В результате оптимизации концентраций иммунореагентов был разработан ИХА для одновременного обнаружения стрептомицина и тетрациклинов в молоке. Предел обнаружения оптимизированного анализа тетрациклинов и стрептомицина составил 2–7.5 и 25 нг/мл при визуальной интерпретации результатов, 0.29–2.15 и 1.34 нг/мл при использовании считывателя тест-полосок соответственно.

**Выводы.** Установлено, что блокировка свободных сайтов связывания вторичных антител повышает стабильность полученных конъюгатов антител в растворе, предотвращая кросс-сшивки наночастиц, вызываемые связыванием антивидовых антител.

## Ключевые слова

антибиотики, экспресс-тест, наночастицы золота, тетрациклин, стрептомицин, иммобилизация

Поступила: 30.04.2025

Доработана: 07.08.2025

Принята в печать: 11.11.2025

## Для цитирования

Максин И.В., Полякова Д.И., Кесарева В.А., Сысуюев А.А., Иванов В.С., Симонова Е.И., Хунтеев Г.А., Кириллова Ю.Г. Разработка иммунохроматографического анализа для одновременного обнаружения тетрациклинов и стрептомицина в молоке. *Тонкие химические технологии*. 2025;20(6):565–581. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-565-581>

## RESEARCH ARTICLE

# Development of immunochromatographic assay for simultaneous detection of tetracyclines and streptomycin in milk

Ivan V. Maksin<sup>1,2,✉</sup>, Darya I. Polyakova<sup>2,3</sup>, Viktoriia A. Kesareva<sup>2,3</sup>, Alexander A. Sysuev<sup>1</sup>, Vladislav S. Ivanov<sup>2</sup>, Evgeniia I. Simonova<sup>2,3</sup>, German A. Khunteev<sup>2</sup>, Yuliya G. Kirillova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> MIREA – Russian Technological University (Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119454 Russia

<sup>2</sup> Rapid Bio, Moscow, 121205 Russia

<sup>3</sup> Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198 Russia

✉ Corresponding author; e-mail: [maxinivanv@gmail.com](mailto:maxinivanv@gmail.com)

## Abstract

**Objectives.** To optimize indirect antibody immobilization on gold nanoparticles (GNPs) using anti-species antibodies for enhanced conjugate stability and to develop an immunochromatographic assay (ICA) for antibiotic detection in milk.

**Methods.** The GNPs were synthesized by reduction of tetrachloroauric acid in the presence of seed particles. The size of GNPs was determined spectrophotometrically according to literature data using a *Thermo Fisher Scientific* Varioskan LUX instrument. Monoclonal mouse antibodies to tetracycline and streptomycin were immobilized on the surface of the GNPs via anti-mouse antibodies. Conjugates of bovine serum albumin with tetracycline and streptomycin were obtained through Mannich reaction and click-reaction, respectively. The coupling ratio was determined by MALDI-TOF mass spectrometry on a *Bruker* RapifleX instrument. Immunoreagents were dispensed onto a nitrocellulose membrane using a *BioDot* ZX1010 dispenser. The assembled multi-membrane composite was cut into test strips using a *KinBio* ZQ4500 guillotine cutter. The test results were interpreted visually and using an *Allsheng* TSR-100 test strip reader.

**Results.** Following conjugate formation via indirect immobilization using anti-species antibodies, it was necessary to block residual binding sites on the anti-species antibodies in order to enhance solution-phase conjugate stability. As a result of optimizing the concentrations of immunoreagents, an ICA was developed for the simultaneous detection of streptomycin and tetracyclines in milk. The detection limit of the optimized ICA for tetracyclines and streptomycin was 2–7.5 and 25 ng/mL, respectively, for visual result interpretation, and 0.29–2.15 and 1.34 ng/mL, respectively, when using a test strip reader.

**Conclusions.** It is shown that the stability of the resulting conjugates in solution can be enhanced by blocking the free binding sites of the anti-species antibodies to prevent cross-linking of the nanoparticles caused by anti-species antibody binding.

## Keywords

lateral flow immunoassay, antibiotics, rapid test, gold nanoparticles, tetracycline, streptomycin, immobilization

**Submitted:** 30.04.2025

**Revised:** 07.08.2025

**Accepted:** 11.11.2025

## For citation

Maksin I.V., Polyakova D.I., Kesareva V.A., Sysuev A.A., Ivanov V.S., Simonova E.I., Khunteev G.A., Kirillova Yu.G. Development of immunochromatographic assay for simultaneous detection of tetracyclines and streptomycin in milk. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2025;20(6):565–581. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-565-581>

## ВВЕДЕНИЕ

Определение антибиотиков в пищевых продуктах представляет собой критически важную задачу для обеспечения безопасности пищевой продукции и защиты здоровья населения. Неконтролируемое использование антибиотиков в ветеринарии приводит к их накоплению в продуктах животноводства, что создает потенциальную угрозу для здоровья человека, т.к. ведет к развитию антибиотикорезистентности микроорганизмов и возникновению аллергических реакций.

Методы физико-химического анализа, включающие высокоэффективную жидкостную хроматографию и масс-спектрометрию, обладают высокой чувствительностью и специфичностью и эффективно используются для обнаружения антибиотиков. Однако эти методы требуют применения дорогостоящего оборудования, а также компетенций высококвалифицированных специалистов [1]. По упомянутым причинам данные методы применяются лишь в крупных лабораторных центрах.

Для эффективного тестирования во внелабораторных условиях необходимо применение простых и доступных методов, таких как иммунохроматографический анализ (ИХА). Принцип ИХА основан на высокоспецифичном взаимодействии антиген – антитело с последующим отделением образующегося иммунного комплекса при движении жидкости вдоль пористой мембраны и характеризуется простотой проведения и экспрессностью, позволяя без использования дополнительного оборудования провести качественную оценку наличия или отсутствия контролируемого соединения в пробе [2].

Одним из главных лимитирующих факторов ИХА, сдерживающим широкое применение метода, является его относительно невысокая чувствительность [2, 3]. Традиционные подходы для повышения чувствительности ИХА включают использование меток с высокой интенсивностью сигнала, например, квантовых точек [4], усиление сигнала за счет окрашивания солями серебра [5], концентрирование аналита при помощи функционализированных магнитных наночастиц [6], преинкубацию образца с конъюгатом антитело-метка перед его внесением в тест-полоску [7]. Важно, чтобы в погоне за низким пределом обнаружения не были принесены в жертву ключевые преимущества метода — быстрота и простота использования.

Ориентация специфических антител на сенсорных поверхностях, направленная на максимизацию экспозиции участков связывания — относительно новое и перспективное направление в иммуноанализе, позволяющее существенно снизить предел обнаружения иммуносенсора. Многочисленные подходы, направленные на ориентированную иммобилизацию

антител, были недавно рассмотрены [3, 8]. Так, исследовательская группа Б.Б. Дзантиева разработала ряд высокочувствительных тест-систем [9–11], в том числе с одновременным обнаружением нескольких аналитов на одной тест полоске [12, 13]. Тем не менее, разработка новых приложений остается актуальной и требует расширения сферы применения.

Цель нашей работы заключается в разработке ИХА для одновременного определения стрептомицина и тетрациклинов в необработанном молоке с бесприборной интерпретацией результата. Для достижения низкого предела обнаружения ИХА мы использовали вторичные антитела, специфичные к Fc-фрагменту мышинных иммуноглобулинов G для иммобилизации мышинных антител к тетрациклину и стрептомицину на поверхности наночастиц золота (НЧЗ), а также применили подход преинкубации образца с конъюгатом антитело-метка перед его внесением в тест-полоску.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Материалы, реагенты и растворы

Использовали следующие реагенты: бычий сывороточный альбумин (БСА), фракция V5 (*Proliant*, Новая Зеландия), стрептомицина сульфат (*PanReac Applichem*, Испания), гидразид пропинилоксипропионовой кислоты, оксисукцинимидный эфир  $\gamma$ -азидобутировой кислоты (*Праймтех*, Республика Беларусь), золотохлористоводородная кислота (*Аурат*, Россия), гидрохлорид тетрациклина (*Biotopped*, Китай), ХЕПЕС ((4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), сахараза, трис(гидроксиметил)аминометан (*Диа-М*, Россия), трис-гидроксипропилтриазолилметиламин (ТНРТА) (*Люминпроб*, Россия), гуанидина гидрохлорид, цитрат натрия (*Helicon*, Россия), L-аскорбиновая кислота (*Sigma-Aldrich*, США), гидрохлорид гидроксиламина (*Panreac*, Испания), формальдегид (*neoFroxx*, Германия). В качестве аналита для определения предела обнаружения и кросс-реактивности использовали государственные стандартные образцы — стрептомицина сульфат, тетрациклина гидрохлорид, доксициклина гиклат, левомицетин (хлорамфеникол) (*ФГБУ «ВГНКИ»*, Россия), а также окситетрациклина гидрохлорид (*Thermo Fisher Scientific*, США), натриевую соль пенициллина G (*Biotopped*, Китай), хлортетрациклина гидрохлорид, натриевую соль цефоперазона (*Molekula*, Великобритания), гентамицина сульфат, канамицина сульфат (*neoFroxx*, Германия). Остальные используемые реагенты российского производства имели квалификацию не ниже х.ч. Образцы молока с жирностью 3.2% приобретены в торговой сети г. Москвы (Россия). При подготовке стандартных растворов антибиотиков в молоке концентрации рассчитывались в пересчете

на чистое действующее вещество, с учетом молекулярной массы соответствующих солей. Кроме этого, использовались поликлональные антитела козы к антителам куриного яйца, поликлональные антитела козы к антителам мыши, антитела куриного яйца IgY (*Arista Biologicals*, США), мышинные моноклональные антитела к тетрациклину, мышинные моноклональные антитела к стрептомицину (*Eastmab*, Китай). Для приготовления растворов, препаратов НЧЗ и конъюгатов на их основе использовали деионизированную воду (Milli-Q®, *Millipore*, США).

Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на алюминиевых пластинках с обращенной фазой RP-18 F254s (*Merck*, Германия).

При изготовлении иммунохроматографических тест-полосок использовалась клейкая подложка SM31-40 (*KinBio*, Китай), аналитическая нитроцеллюлозная мембрана 70CNPН, мембрана для образца FR-1, впитывающая мембрана AP45 (*Advanced Microdevices*, Индия).

### Получение конъюгата БСА–стрептомицин (СТР)

**Получение конъюгата СТР–алкин.** К раствору 0.85 мл 0.45 М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  добавляли стрептомицина сульфат (408 мг, 0.56 ммоль) и гидразид пропинилоксипропионовой кислоты (30 мг, 0.21 ммоль) и инкубировали 24 ч при 4°C. Завершение реакции контролировали методом ТСХ в системе метилхлорид/метанол = 40 : 1 по исчезновению исходного вещества (коэффициент удерживания  $R_f$  = 0.3). После элюирования пластинки обрабатывали раствором нингидрина и нагревали для визуализации. Предполагали, что концентрация СТР–алкин в растворе составляет 0.247 М.

**Получение конъюгата БСА–азид.** К раствору 3.2 мл раствора БСА с концентрацией 20 мг/мл (0.962 мкмоль) в 0.1 М бикарбоната натрия с pH 8.5 добавляли 0.6 мл раствора оксисукцинимидного эфира  $\gamma$ -азидомасляной кислоты с концентрацией 6 мг/мл (15.91 мкмоль) в диметилсульфоксиде. Затем инкубировали 24 ч при 4°C. Конъюгат очищали диализом против деионизированной воды. По окончании диализа определяли концентрацию белка методом УФ-видимой спектрофотометрии на приборе UV5Nano (*Mettler Toledo*, Швейцария). Готовый конъюгат хранили при 4°C.

**Получение конъюгата БСА–СТР (восстановитель меди — L-аскорбиновая кислота).** К раствору 0.5 мл БСА–азиды с концентрацией 8.46 мг/мл

(0.063 мкмоль, 1 экв.) добавляли 0.1 мл раствора 1 М ХЕПЕС с pH 7.2 и 13 мкл СТР–алкина (3.211 мкмоль, 50 экв.). В отдельной пробирке смешивали растворы 6.25 мкл 20 мМ  $\text{CuSO}_4$  (0.125 мкмоль, 2 экв.) и 12.5 мкл 50 мМ ТНРТА (0.625 мкмоль, 10 экв.), затем весь объем полученного раствора переносили к смеси БСА–азиды и СТР–алкина. Затем добавляли 25 мкл 100 мМ хлорида гуанидина (2.5 мкмоль, 40 экв.), 25 мкл 100 мМ L-аскорбиновой кислоты (2.5 мкмоль, 40 экв.), 25 мкл 100 мМ NaOH (2.5 мкмоль, 40 экв.). Пробирку заполняли аргоном и оставляли на перемешивание на 24 ч. Конъюгат очищали диализом против 10 мМ фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7.4. Далее конъюгат называем БСА–СТР.

**Получение конъюгата БСА–СТР (восстановитель меди — гидроксилламин).** К раствору 0.5 мл БСА–азиды с концентрацией 8.46 мг/мл (0.063 мкмоль, 1 экв.) добавляли 0.1 мл раствора 1 М ХЕПЕС с pH 7.2 и 13 мкл СТР–алкина (3.211 мкмоль, 50 экв.). В отдельной пробирке смешивали растворы 6.25 мкл 20 мМ  $\text{CuSO}_4$  (0.125 мкмоль, 2 экв.) и 12.5 мкл 50 мМ ТНРТА (0.625 мкмоль, 10 экв.), затем весь объем полученного раствора переносили к смеси БСА–азиды и СТР–алкина. Затем добавляли 50 мкл 100 мМ гидрохлорида гидроксиламина (5 мкмоль, 80 экв.). Пробирку заполняли аргоном и оставляли на перемешивание на 24 ч. Конъюгат очищали диализом против 10 мМ ФСБ, pH 7.4. По окончании диализа определяли концентрацию белка методом УФ-видимой спектрофотометрии на приборе UV5Nano (*Mettler Toledo*, Швейцария). Готовый конъюгат хранили при 4°C.

### Синтез конъюгата БСА–тетрациклин

Конъюгат БСА–тетрациклин получали по известной методике с изменениями [14]. Смешивали 8 мл раствора 18.75 мг/мл БСА, 2 мл 3 М раствора ацетата натрия и 12 мл раствора 8.3 мг/мл тетрациклина гидрохлорида в воде, после чего по каплям при перемешивании добавляли 3.75 мл 37% раствора формальдегида. Закрывали емкость от света фольгой. Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при комнатной температуре (20–22°C). Затем проводили диализ против 10 мМ ФСБ, pH 7.4. Далее конъюгат называем БСА–ТЕТ.

### MALDI-TOF<sup>1</sup> спектрометрия

Масс-спектрометрический анализ осуществляли в режиме регистрации положительно заряженных

<sup>1</sup> Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (англ. matrix-activated laser desorption/ionization, MALDI) — процесс, в котором анализируемое вещество (аналит) ионизируется под воздействием лазера в присутствии специальной матрицы. После ионизации ионы разделяются по времени пролета (англ. time of flight, TOF), что позволяет определить их соотношение массы к заряду и таким образом идентифицировать молекулу.



ионов на приборе RapifleX (*Bruker*, Германия) в центре коллективного пользования передовой масс-спектрометрии Сколковского института науки и технологий. В анализе использовали раствор матрицы НССА ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота): навеску сухой матрицы НССА (*Sigma-Aldrich*, США) растворяли в 50% водном ацетонитриле с 0.5% трифторуксусной кислоты в концентрации 20 мг/мл. Образцы по 1 мкл наносили на мишень Ground Steel (*Bruker*, Германия). После высыхания капли поверх образца наносили 1 мкл матрицы. Кристаллизация образца и матрицы проходила при комнатной температуре в ламинарном шкафу. Каждую пробу анализировали в одном техническом повторе в режиме измерения положительных ионов. Ошибка измерения  $m/z$  составляла не более 500 ppm (до 35 Да на массе 70000 Да). Визуализацию спектров выполняли с использованием Origin 9.8 (*OriginLab*, США).

### Синтез НЧЗ

НЧЗ синтезировали по методике [15]. Сначала получали зародышевый раствор. К 50 мл деионизированной воды при перемешивании 700 об/мин добавляли 100 мкл 5% раствора золотохлористоводородной кислоты и доводили до кипения. Затем добавляли 1.5 мл 1% раствора цитрата натрия и продолжали кипячение в течение 15 мин. Готовый зародышевый раствор доводили до комнатной температуры перед использованием. Затем к 49 мл деионизированной воды при перемешивании 700 об/мин добавляли 1 мл полученного зародышевого раствора НЧЗ, 0.5 мл 1% раствора цитрата натрия, 0.1 мл 5% золотохлористоводородной кислоты и 0.25 мл 0.5% раствора гидрохинона. Полученный золь хранили при 4°C в течение двух месяцев.

### Подготовка тест-полосок

При помощи диспенсера ZX1010 (*BioDot*, США) на тестовую зону нитроцеллюлозной мембраны наносили конъюгаты БСА–СТР и БСА–ТЕТ, а на контрольную зону — иммуноглобулины куриного яйца IgY. Мембрану с нанесенными реагентами сушили в термостате при 45°C в течение 1 ч. Мультимембранный композит нарезали на тест-полоски шириной 4 мм на гильотинном резаке ZQ4500 (*KinBio*, Китай) и хранили при комнатной температуре в герметичном пакете с добавлением силикагеля.

### Подбор оптимального значения pH и концентрации белка для сорбции на поверхности НЧЗ

Подбор проводили по методике [16]. Оптимальные значения pH для конъюгации и концентрацию антител определяли по устойчивости конъюгата НЧЗ к воздействию сильного электролита (раствор 10%

NaCl). Подбор осуществляли при помощи спектрофотометрии на приборе Varioskan LUX (*Thermo Fisher Scientific*, США). При агрегации золя наночастиц пик на спектре поглощения раствора уширяется, оптическая плотность (ОП) раствора на длине волны максимального светопоглощения снижается, а в области длинных волн растет. Таким образом, для измерения степени агрегации использовали условный спектральный коэффициент  $K = \text{ОП}_{536} / \text{ОП}_{750}$ , отражающий степень агрегации. При агрегации золя значение  $K$  будет снижаться.

### Конъюгация антител с НЧЗ

К 10 мл раствора НЧЗ, доведенного до pH 8, добавляли 20 мкг поликлональных козьих антител к иммуноглобулинам мыши. Инкубировали в течение 1 ч на орбитальной мешалке. Добавляли 0.4 мл 10% раствора БСА и инкубировали еще 30 мин. Центрифугировали 30 мин при 5000g. Супернатант отбирали, осадок перерастворяли в 0.5 мл 4 mM трис-буфера pH 8, содержащего 5% сахарозы и 0.1% БСА. Полученный конъюгат обозначили НЧЗ–анти-мышь. Конъюгат НЧЗ с поликлональными козьими антителами к антителам курицы IgY получали аналогично и обозначили НЧЗ–анти-IgY. Готовые конъюгаты хранили при 4°C.

К конъюгату НЧЗ–анти-мышь добавляли антитела к стрептомицину или тетрациклину и инкубировали на орбитальном шейкере. Спустя 10 мин добавляли мышинные иммуноглобулины для блокирования оставшихся сайтов связывания. Полученные конъюгаты обозначили НЧЗ–анти-СТР и НЧЗ–анти-ТЕТ соответственно. Готовые конъюгаты хранили при 4°C.

### Проведение ИХА

В лунке микротитровального планшета смешивали раствор конъюгатов НЧЗ–анти-ТЕТ, НЧЗ–анти-СТР, НЧЗ–анти-IgY и 200 мкл образца молока. Молоко использовали без предварительной обработки или разбавления. Диапазон исследованных концентраций иммунореагентов приведен в табл. 1. Затем лунку на 5 мин помещали в нагретый до 40°C термоинкубатор. После этого погружали тест-полоску в лунку на 5 мин. Вынимали тест-полоску из раствора и удаляли мембрану для образца с целью остановки реакции. Интенсивность окрашивания линии тест-полоски считывали на ридере TSR-100 (*Allsheng*, Китай).

### Обработка результатов ИХА

Для анализа взаимосвязи интенсивности сигнала ( $y$ ) и концентрации аналитов в образце ( $x$ ) применяли программное обеспечение Origin 9.8 (*Origin Lab*,

США). Для аппроксимации концентрационных зависимостей использовали сигмоидальную функцию:

$$y = (a - b) / [1 + (x / c)^d] + b,$$

где  $a$  — максимальный сигнал;  $b$  — минимальный сигнал;  $c$  (или  $IC_{50}$ ) — концентрация антигена, при которой сигнал уменьшается на 50% от диапазона его изменений;  $d$  — крутизна аппроксимирующей зависимости в точке  $c$ .

Инструментальный предел обнаружения рассматривался как концентрация аналита, вызывающая 10% снижение регистрируемого аналитического сигнала [17]. Визуальным пределом обнаружения называли минимальную концентрацию аналита, при которой интенсивность окрашивания тестовой линии окажется слабее интенсивности окрашивания контрольной линии или будет сопоставима.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для достижения цели работы было необходимо выполнить ряд задач: 1) осуществить синтез конъюгатов стрептомицина и тетрациклина с белком-носителем для иммобилизации на аналитической мембране; 2) провести оптимизацию иммобилизации специфических антител к антибиотикам на поверхность НЧЗ, опосредованную вторичными антителами; 3) определить предел обнаружения ИХА с применением полученных иммунореагентов.

## Синтез конъюгатов БСА с антибиотиками

Конъюгат БСА–СТР **1** получали при помощи клик-реакции (рис. 1) [18]. БСА предварительно конъюгировали с оксисукцинимидным эфиром  $\gamma$ -азидобутировой кислоты с получением конъюгата БСА–азид **2**. Эффективность конъюгации по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии составила 14 азидных групп на 1 молекулу БСА. Алкиновый аддукт **3** получали реакцией стрептомицина с гидразидом пропинолксипропионовой кислоты с образованием соответствующего гидразона **3**. Реакционная способность стрептомицина с дигидразидом адипиновой кислоты была описана ранее [19], что было положено в основу используемой в данной работе методики.

В клик-реакции в качестве восстановителя меди стандартно применяют L-аскорбат натрия. Сообщается [18], что побочный продукт окисления дегидроаскорбат может взаимодействовать с боковыми радикалами белков (преимущественно аргинина), поэтому рекомендуется добавлять в реакцию ловушку для дегидроаскорбата («скавенджер»), например, аминокуанидин. Чтобы защитить гуанидиновые группы стрептомицина от нежелательной реакции, мы проводили клик-реакцию, используя два разных восстановителя меди — L-аскорбат натрия, с добавлением гуанидина в качестве «скавенджера», и гидроксилламин. Результаты конъюгации по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии составили 6.0 и 5.6 молекул гаптена на 1 молекулу БСА при

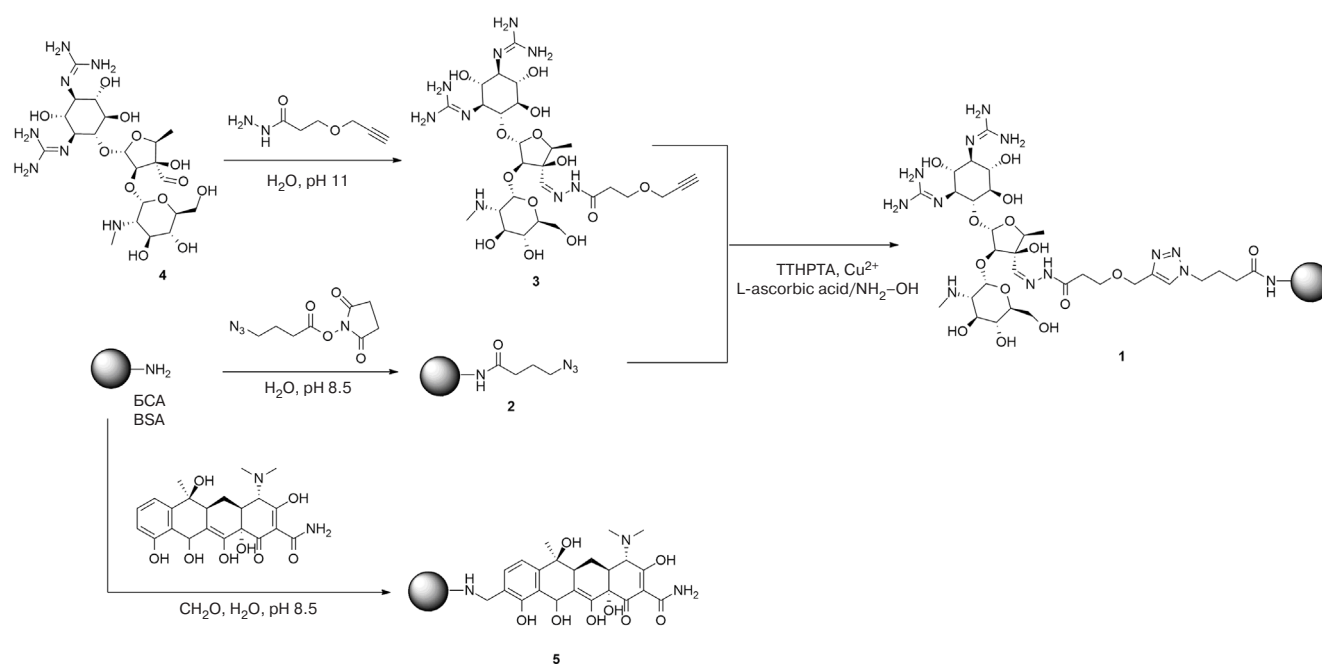
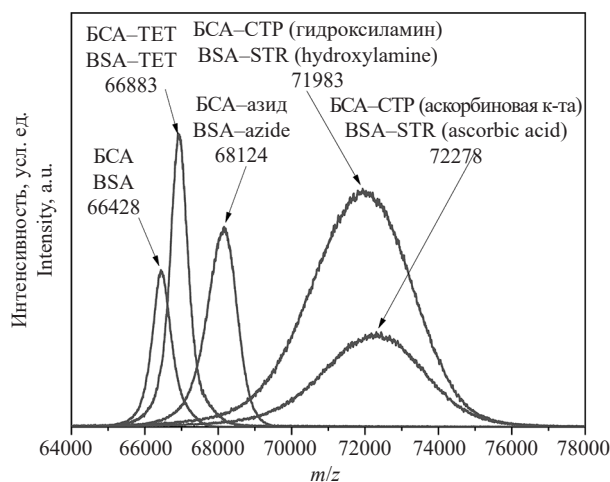


Рис. 1. Схема синтеза конъюгатов БСА–СТР **1** и БСА–ТЕТ **5**

Fig. 1. Scheme of the synthesis of bovine serum albumin (BSA)– streptomycin (STR) **1** and BSA– tetracycline (TET) **5** conjugates



**Рис. 2.** Спектры MALDI-TOF масс-спектрометрии конъюгатов с БСА

**Fig. 2.** MALDI-TOF mass spectra of the BSA conjugates

использовании L-аскорбата натрия и гидроксилamina соответственно (рис. 2). При сравнительном эксперименте в ИХА конъюгаты не отличались друг от друга по работоспособности (данные не показаны). В дальнейшем мы использовали конъюгат, полученный восстановлением в присутствии только гидроксилamina.

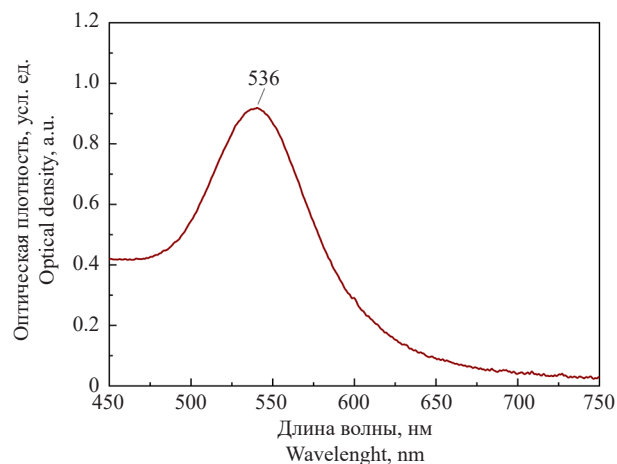
Конъюгат БСА–ТЕТ **5** получали в стандартных условиях по реакции Манниха [14]. Эффективность конъюгации составила 1 молекулу тетрациклина на 1 молекулу БСА (рис. 2).

## Синтез НЧЗ

По данным УФ-видимой спектрофотометрии длина волны максимального светопоглощения полученного золя составляет 536 нм, что соответствует среднему размеру частиц приблизительно 55–60 нм (рис. 3) [20].

## Схема конкурентного ИХА для определения тетрациклинов и стрептомицина

Иммунохроматографическая тест-полоска для определения тетрациклинов и стрептомицина была устроена следующим образом (рис. 4). Нанесенные на нитроцеллюлозную мембрану конъюгаты БСА–ТЕТ, БСА–СТР и иммуноглобулины куриного яйца IgY формировали на аналитической мембране две тестовые линии (ТЛ) и контрольную линию (КЛ) соответственно. Аналитические конъюгаты НЧЗ–анти-ТЕТ, НЧЗ–анти-СТР и контрольный конъюгат НЧЗ–анти-IgY смешивали с пробой в микролунке непосредственно перед анализом



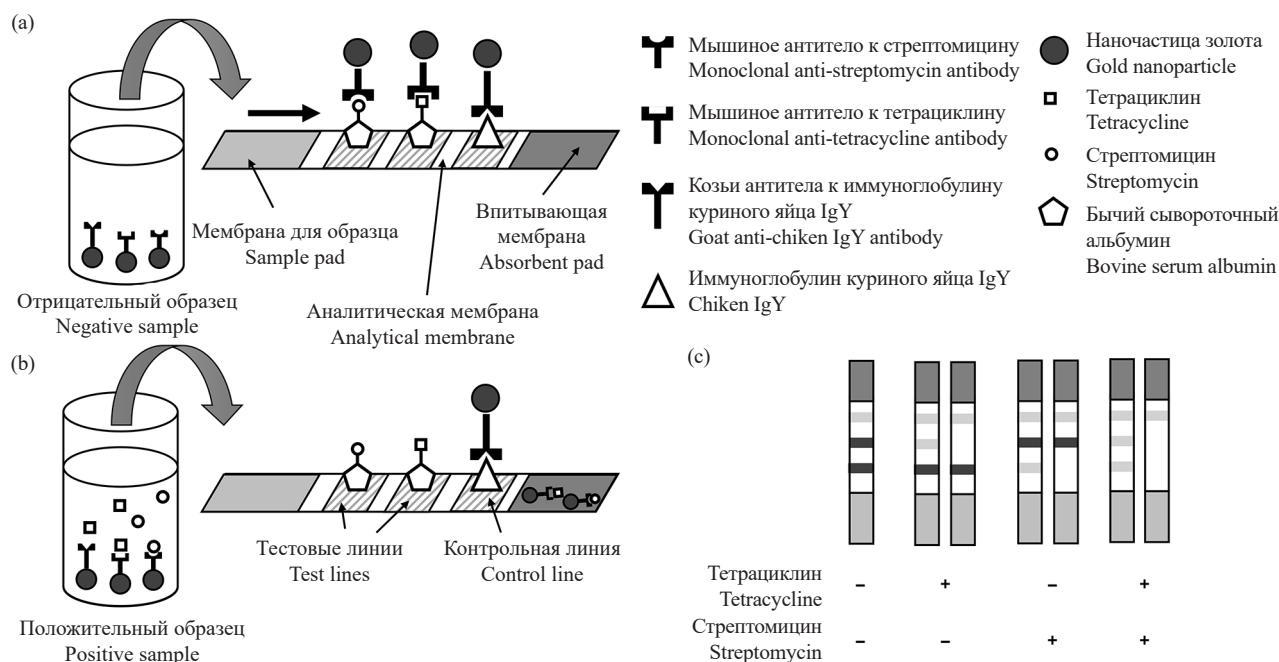
**Рис. 3.** Спектр светопоглощения наночастиц коллоидного золота

**Fig. 3.** Light absorption spectrum of the colloidal gold nanoparticles

и инкубировали в течение 5 мин. Благодаря стадии инкубации антител с образцом время их взаимодействия с аналитом увеличивается, что приводит к снижению предела обнаружения [7], поскольку обеспечиваются лучшие кинетические условия для образования комплекса антитело–антиген по сравнению с традиционным форматом ИХА, в котором реакция ограничена диффузией иммунореагентов в пористых структурах мембраны тест-полоски [21].

После погружения тест-полоски в пробу, смешанную с конъюгатом НЧЗ, смесь движется вдоль тест-полоски с нанесенными на нее реагентами под действием капиллярных сил. При отсутствии аналитов в пробе (рис. 4а), антитела свяжутся с аналитами, закрепленными на БСА, что приведет к аккумулярованию золотых частиц на ТЛ и появлению окрашивания. Если в образце присутствует один из аналитов или сразу оба (рис. 4б), то он (они) будет препятствовать связыванию конъюгата НЧЗ с конъюгатом аналита с БСА на ТЛ, за счет чего окрашивание ТЛ будет неярым или будет отсутствовать.

Поскольку условия проведения анализа и состав образца молока могут повлиять на визуальную интерпретацию результата, мы посчитали необходимым использование контрольной линии в качестве эталона сравнения яркости окрашивания. В связи с этим, КЛ окрашивается за счет специфического связывания НЧЗ–анти-IgY с иммуноглобулинами куриного яйца IgY. Таким образом, яркость окрашивания будет постоянной и независимой от того, какая часть аналитического конъюгата задержится на ТЛ.



**Рис. 4.** Схема конкурентного ИХА тетрациклинов и стрептомицина. (а) Отрицательный образец; (б) положительный образец; (с) схема интерпретации результата анализа

**Fig. 4.** Schematic diagram of the developed competitive immunochromatographic assay (ICA) of tetracyclines and streptomycin. (a) Negative sample; (b) positive sample; (c) result interpretation scheme

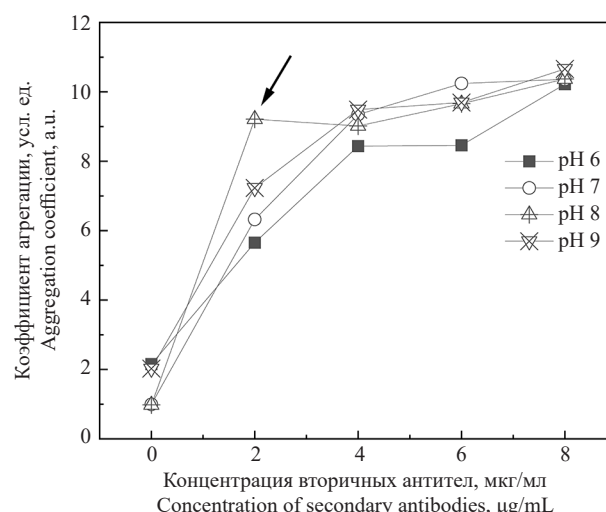
Результат анализа определяется сравнением яркости ТЛ и КЛ. Если ТЛ более яркая, чем КЛ — результат отрицательный. Если ТЛ менее яркая, чем КЛ или их яркость сопоставима — положительный. Выбранный способ оценки результата мы посчитали более приемлемым, учитывая субъективность визуальной интерпретации. Это позволяет снизить предел обнаружения анализа при визуальной интерпретации результатов, поскольку положительным результатом будет считаться не только полное исчезновение тестовой линии (что характерно для высоких концентраций аналита), а даже видимое снижение ее интенсивности для относительно невысоких концентраций аналита.

### Конъюгация антител с НЧЗ

Вторичные антитела конъюгировали с НЧЗ посредством физической адсорбции при pH 8 и концентрации 2 мкг/мл. Выбранные параметры получили, исходя из эксперимента по подбору оптимальных условий (рис. 5).

Предварительные эксперименты с иммобилизацией антител к стрептомицину на НЧЗ посредством вторичных антител показали, что полученный конъюгат оказался нестабильным. Уже через сутки после приготовления конъюгатов

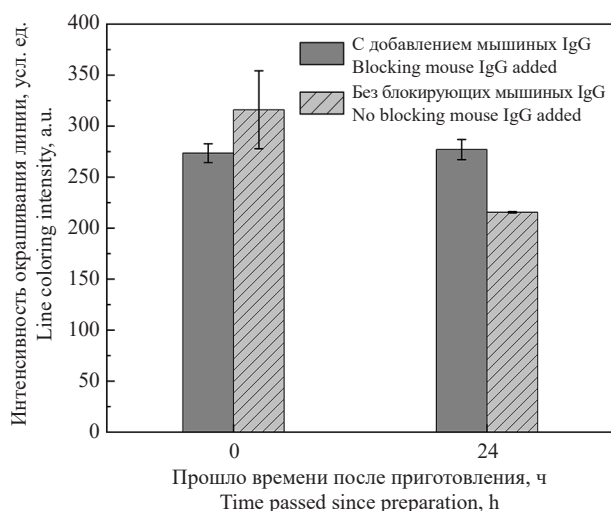
наблюдалась статистически значимая утрата активности (рис. 6, заштрихованный столбец,  $p < 0.05$ ) и существенная агрегация, о чем свидетельствовало снижение коэффициента агрегации раствора конъюгата. При использовании двух конъюгатов



**Рис. 5.** Подбор оптимальных условий сорбции антител к мышиным иммуноглобулинам. Стрелкой обозначена выбранная концентрация и значение pH

**Fig. 5.** Selection of optimal conditions for the sorption of antibodies to mouse immunoglobulins. The arrow indicates the selected concentration and pH value



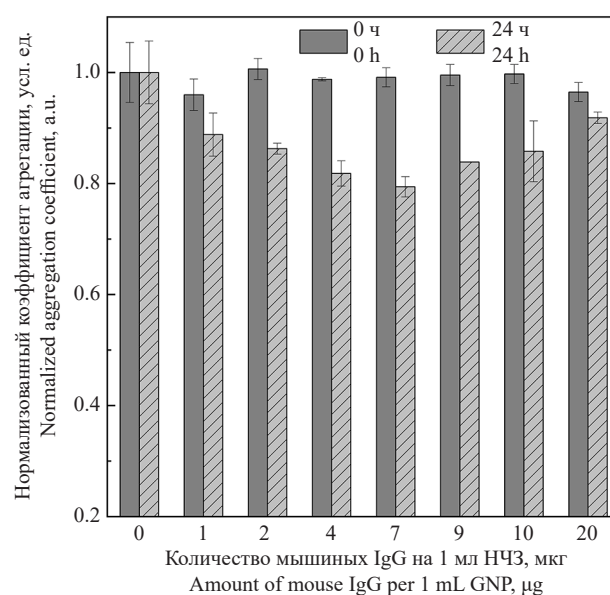


**Рис. 6.** Активность конъюгата НЧЗ–анти-СТР в присутствии и в отсутствии блокирующих иммуноглобулинов (20 мкг/мл)

**Fig. 6.** Activity of the GNP–anti-STR conjugate in the presence and in the absence of blocking immunoglobulins (20 µg/mL)

в анализе (НЧЗ–анти-ТЕТ и НЧЗ–анти-СТР) наблюдалось увеличение интенсивности окрашивания линии тетрациклина при добавлении в образец стрептомицина. Мы предполагаем, что оба этих явления происходят из-за образования агрегатов наночастиц, вызванных кросс-сшивками посредством связывания вторичных антител, несущих одновременно антитела и к стрептомицину, и к тетрациклину. В результате, когда в образце есть стрептомицин, та часть образовавшегося поливалентного конъюгата, которая задерживалась на линии стрептомицина, может перейти на линию тетрациклина.

Для предотвращения агрегации и образования поливалентных агрегатов мы посчитали рациональным блокировать незанятые сайты связывания вторичных антител, для чего использовали неспецифические мышиные иммуноглобулины G. Модельный эксперимент без использования специфических антител к стрептомицину и тетрациклину показал, что зависимость агрегации от количества введенных мышиных антител имела нелинейный характер с выраженным минимумом (рис. 7). В диапазоне концентраций 1–7 мкг/мл наблюдалось увеличение степени агрегации. Это можно объяснить тем, что в низкой концентрации количество сайтов связывания вторичных антител значительно превышает количество мышиных антител, и сами мышиные антитела связывают соседние наночастицы. Начиная с концентрации 9 мкг/мл, возникал стабилизирующий эффект, который можно объяснить тем, что количество мышиных антител



**Рис. 7.** Подбор оптимальной концентрации мышиных иммуноглобулинов для блокировки свободных сайтов связывания вторичных антител конъюгата

**Fig. 7.** Selection of the optimal concentration of mouse immunoglobulins for blocking free binding sites of secondary antibodies of the conjugate

уже сопоставимо с количеством сайтов связывания вторичных антител и предотвращает образование крупных агрегатов. При достижении концентрации 20 мкг/мл некоторая степень агрегации все еще фиксировалась ( $p < 0.05$ ), но мы посчитали ее приемлемой для дальнейшего применения (рис. 7). Выбранную концентрацию использовали для синтеза конъюгатов НЧЗ–анти-ТЕТ и НЧЗ–анти-СТР. Конъюгат НЧЗ–анти-СТР, приготовленный с использованием блокирующих антител в концентрации 20 мкг/мл, сохранил работоспособность спустя 24 ч после приготовления (рис. 6, незаштрихованный столбец). Следующим этапом работы был подбор оптимальных концентраций иммунореагентов тест-системы, чтобы достичь наименьшего предела обнаружения.

## Оптимизация предела обнаружения

Для достижения низкого предела обнаружения применяли известные методические подходы [22], которые заключались в подборе соотношения антитело–метка и концентраций иммунореагентов (табл. 1). Поскольку визуальная интерпретация результата заключается в сравнении яркости тестовых линий с контрольной, то при подборе концентрации иммунореагентов мы стремились к тому, чтобы яркость контрольной линии была значительно ниже.

**Таблица 1.** Подобранный расход иммунореагентов**Table 1.** Selected immunoreagent amounts

Иммунореагент Immunoreagent	Диапазон исследованных концентраций Studied concentration range	Выбранное количество Selected amount	Иммунореагент Immunoreagent	Диапазон исследованных концентраций Studied concentration range	Выбранное количество Selected amount
BCA–TET BSA–TET	0.5–2.0 мг/мл 0.5–2.0 mg/mL	1 мг/мл 1 mg/mL	НЧЗ–анти-IgY GNP–anti-IgY	1–5 мкл 1–5 µL	3.5 мкл 3.5 µL
BCA–СТР BSA–STR	0.1–1.0 мг/мл 0.1–1.0 mg/mL	0.2 мг/мл 0.2 mg/mL	Антитела к тетрациклину Anti-tetracycline antibody	2–9 мкг/мл 2–9 µg/mL	4 мкг/мл 4 µg/mL
НЧЗ–анти-TET Gold nanoparticles (GNP)–anti-TET	10–20 мкл 10–20 µL	20 мкл 20 µL	Антитела к стрептомицину Anti-streptomycin antibody	2–9 мкг/мл 2–9 µg/mL	5 мкг/мл 5 µg/mL
НЧЗ–анти-СТР GNP–anti-STR	10–20 мкл 10–20 µL	20 мкл 20 µL	Мышинные иммуноглобулины Mouse immunoglobulin	0–20 мкг/мл 0–20 µg/mL	20 мкг/мл 20 µg/mL

Предел обнаружения разработанного анализа и сопоставление с некоторыми ранее опубликованными работами приведены в табл. 2 и на рис. 8. Согласно Техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) предельно допустимая

концентрация антибиотиков стрептомицина и тетрациклинов составляет 200 и 10 нг/мл соответственно<sup>2</sup>. Достигнутые пределы обнаружения достаточны для применения тест-системы в соответствии с ТР ТС 033/2013 и находятся на одном уровне с ранее опубликованными работами (табл. 2).

**Таблица 2.** Сравнение разработанного ИХА с опубликованными методами. Инструментальный предел обнаружения (иПО), визуальный предел обнаружения (вПО)\***Table 2.** Comparison of the developed ICA with published methods. Instrumental limit of detection (iLOD), visual limit of detection (vLOD)\*

Антибиотик Antibiotic	Метод определения Detection method	Образец Sample type	иПО, нг/мл iLOD, ng/mL	вПО, нг/мл vLOD, ng/mL	Литература References
Тетрациклины Tetracycline	Флуоресцентный анализ Fluorescence analysis	Вода Water	750	–	[23]
		Буфер Buffer	2.86	–	[24]
	Высокоэффективная жидкостная хроматография High performance liquid chromatography	Молоко Milk	21	–	[25]

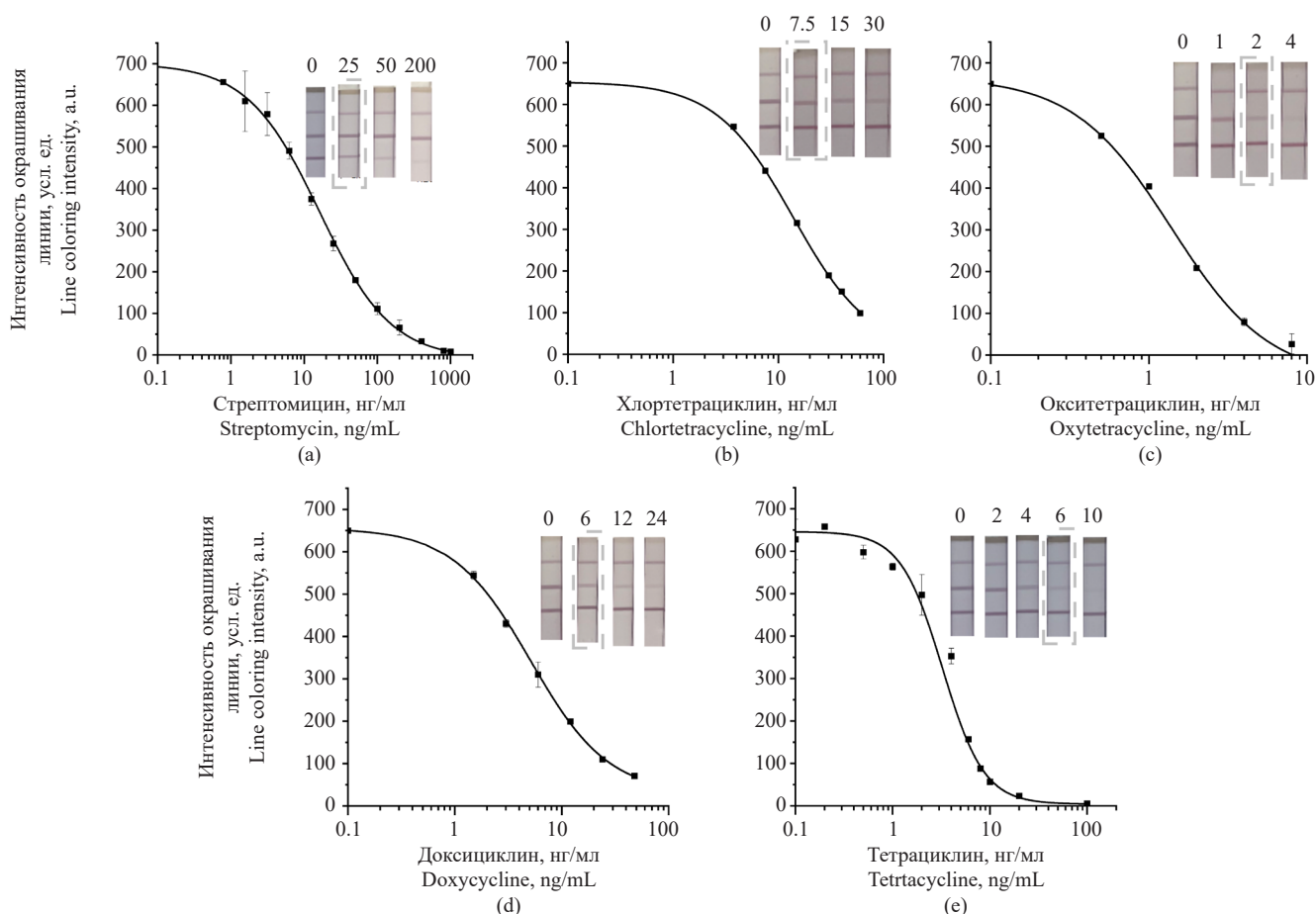
<sup>2</sup> Технический регламент Таможенного союза “О безопасности молока и молочной продукции” (ТР ТС 033/2013) (с изменениями на 23 июня 2023 г.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/499050562>. Дата обращения 14.07.2025. [Technical Regulations of the Customs Union “On the safety of milk and dairy products” (TR CU 033/2013) (as amended on June 23, 2023) (in Russ.). URL: <https://docs.cntd.ru/document/499050562>. Accessed June 14, 2025.]

Таблица 2. Продолжение

Table 2. Continued

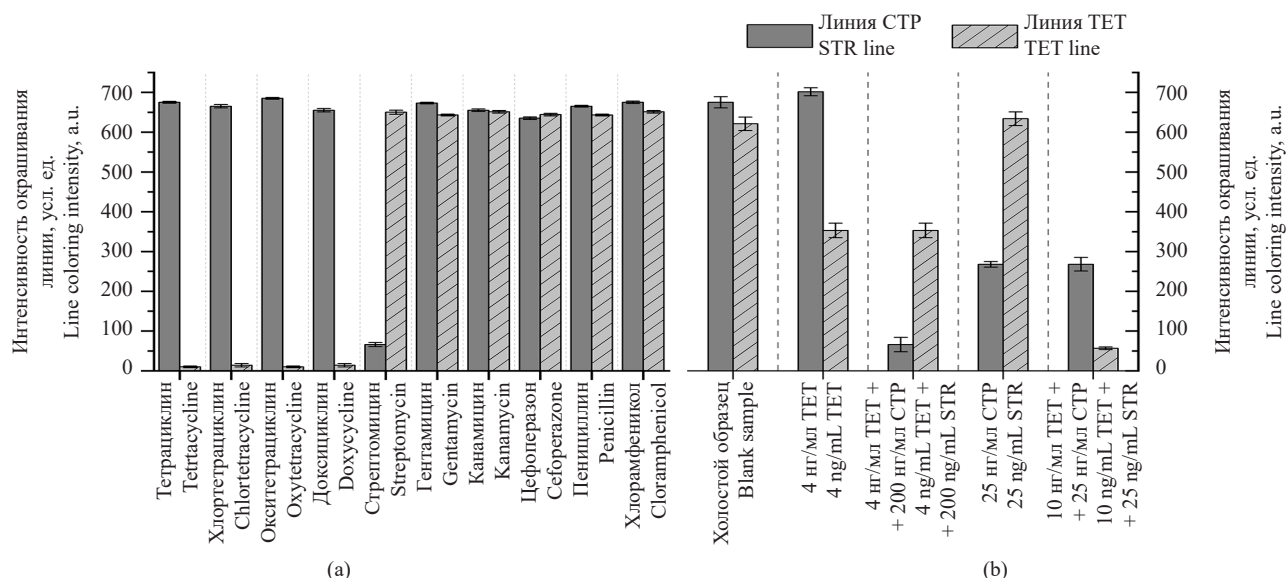
Антибиотик Antibiotic	Метод определения Detection method	Образец Sample type	иПО, нг/мл iLOD, ng/mL	вПО, нг/мл vLOD, ng/mL	Литература References
Тетрациклины Tetracycline	Иммуноферментный анализ Enzyme-linked immunosorbent assay	Молоко Milk	IC <sub>50</sub> = 0.72	–	[26]
	Колориметрический бумажный сенсор с детекцией сигнала при помощи смартфона Colorimetric paper-based sensor with signal detection via smartphone imaging	Молоко Milk	0.5	–	[27]
	ИХА ICA	Человеческая сыворотка Human serum	0.4	11	[28]
		Молоко Milk	–	0.8	[29]
		Молоко Milk	Хлортетрациклин Chlortetracycline		Данная работа This work
			2.15	7.5	
			Окситетрациклин Oxytetracycline		
			0.29	2	
			Доксициклин Doxycycline		
			0.78	6	
			Тетрациклин Tetracycline		
	1.27	4			
Стрептомицин Streptomycin	Поверхностно-усиленное комбинационное рассеяние Surface-enhanced Raman scattering	Молоко Milk	2.13 · 10 <sup>−3</sup>	–	[30]
	Анализ, основанный на агрегации L-гистидин функционализированных НЧЗ Aggregation-based L-histidine functionalized GNP assay	Молоко Milk	0.66	–	[31]
	Электрохимический сенсор Electrochemical sensor	Молоко Milk	0.33 · 10 <sup>−3</sup>	–	[32]
	Разрешенная флуоресценция наночастиц в ИХА Resolved fluorescence of nanoparticles in ICA	Молоко Milk	1.10 нг/г 1.10 ng/g	–	[33]
	ИХА ICA	Молоко Milk	0.4	50	[34]
		Молоко Milk	1.34	25	Данная работа This work

\* Таблица не является исчерпывающим обзором методов и включает только выборочные публикации.  
\* The table does not aim to provide a comprehensive overview and includes only selected examples from the literature.



**Рис. 8.** Градуировочные кривые зависимости интенсивности окрашивания тестовой линии от концентрации стрептомицина и тетрациклинов в молоке и фотографии результатов ИХА определения (а) стрептомицина, (б) хлортетрациклина, (с) окситетрациклина, (д) доксициклина, (е) тетрациклина. Цифры над фотографиями обозначают исследуемую концентрацию соответствующего аналита

**Fig. 8.** Calibration curves showing the dependence of the test line color intensity on the concentration of streptomycin and tetracyclines in milk, and photographs of ICA results for the detection of (a) streptomycin, (b) chlortetracycline, (c) oxytetracycline, (d) doxycycline, and (e) tetracycline. The numbers above the photographs indicate the tested concentration of the corresponding analyte



**Рис. 9.** (а) Проверка кросс-реактивности тест-системы; (б) оценка влияния на сигнал одновременного нахождения тетрациклина и стрептомицина в пробе

**Fig. 9.** (a) Assessment of the test system's cross-reactivity; (b) evaluation of the effect on the signal caused by the simultaneous presence of tetracycline and streptomycin in the sample

Дополнительно была проверена специфичность разработанной тест системы к другим аминогликозидам — гентамицину и канамицину, а также пенициллину и хлорамфениколу. Показано отсутствие статистически достоверного влияния кросс-реагентов в концентрации 1000 нг/мл в молоке на сигнал (рис. 9а). Отсутствие кросс-реактивности с аминогликозидами может объясняться высокой специфичностью антител к стрептомицину и более значительными отличиями в структуре рассматриваемых антибиотиков. Взаимная интерференция стрептомицина и тетрациклина также отсутствовала (рис. 9б).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана тест-система для одновременного обнаружения тетрациклинов и стрептомицина в неразбавленном молоке. Визуальный предел обнаружения стрептомицина, хлортетрациклина, окситетрациклина, доксициклина, тетрациклина, составляет 25, 7.5, 2, 6, 4 нг/мл соответственно. Блокировка свободных центров вторичных антител позволяет повысить стабильность конъюгатов. Разработанная тест-система удовлетворяет нормативным требованиям и может быть рекомендована для практического применения для контроля контаминации молока антибиотиками. Используемые в работе методические подходы одновременного определения группы тетрациклинов и стрептомицина позволяют перейти к созданию тест-системы для одновременного определения трех или четырех групп антибиотиков.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность сотруднику центра коллективного пользования передовой масс-спектрометрии Сколковского института науки и технологий Завьяловой Марии Геннадиевне. Отдельно благодарим компанию ООО «Рapid Био» за предоставление материалов и оборудования для исследования.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Maria Gennadievna Zavalova, a member of the Skoltech Advanced Mass Spectrometry Core Facility at the Skolkovo Institute of Science and Technology. We thank the *Rapid Bio* for providing the materials and equipment for the study.

## Вклад авторов

**И.В. Максин** — концептуальная проработка исследования, интерпретация и графическое представление экспериментальных данных, обработка результатов, написание текста статьи.

**Д.И. Полякова** — подбор параметров иммунохроматографического анализа, обработка результатов.

**В.А. Кесарева** — подбор параметров иммунохроматографического анализа, обработка результатов.

**А.А. Сысцев** — синтез конъюгатов БСА со стрептомицином и тетрациклином.

**В.С. Иванов** — методологическая поддержка исследования, обсуждение результатов.

**Е.И. Симонова** — концептуальная проработка исследования.

**Г.А. Хунтеев** — обсуждение результатов, концептуальная проработка исследования.

**Ю.Г. Кириллова** — концептуальная проработка исследования, написание текста статьи, обсуждение результатов.

## Authors' contributions

**I.V. Maksin** — conceptual development of the study, interpretation and graphical presentation of the experimental data, processing results, and writing the text of the article.

**D.I. Polyakova** — selecting the ICA parameters and processing results.

**V.A. Kesareva** — selecting the ICA parameters and processing results.

**A.A. Sysuev** — synthesis of BSA conjugates with streptomycin and tetracycline.

**V.S. Ivanov** — methodological support for the study and discussion of the results.

**E.I. Simonova** — conceptual development of the study.

**G.A. Khunteev** — discussion of the results and conceptual development of the study.

**Yu.G. Kirillova** — conceptual development of the study, writing the text of the article, and discussion of the results.

## Заявление о конфликте интересов

Авторы И.В. Максин, Д.И. Полякова, В.А. Кесарева, В.С. Иванов, Е.И. Симонова и Г.А. Хунтеев являются сотрудниками компании ООО «Рapid Био» (Москва, Россия), занимающейся разработкой и производством иммунологических тест-систем. Указанная компания осуществляла финансовую поддержку настоящего исследования. Все авторы подтверждают отсутствие иных потенциальных конфликтов интересов.

## Conflict interest declaration

Authors — I.V. Maksin, D.I. Polyakova, V.A. Kesareva, V.S. Ivanov, E.I. Simonova, and G.A. Khunteev — are employees of *Rapid Bio* (Moscow, Russia), a company engaged in the development and production of immunological test systems. This company provided financial support for this study. All authors confirm the absence of other potential conflicts of interest.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lu N., Chen J., Rao Z., Guo B., Xu Y. Recent Advances of Biosensors for Detection of Multiple Antibiotics. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(9):850. <https://doi.org/10.3390/bios13090850>
2. Панфёров В.Г., Сафенкова И.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Способы повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем с колориметрической детекцией (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2021;57(2):107–116. <https://doi.org/10.31857/S0555109921020112>
3. Lu Z.Y., Chan Y.H. The importance of antibody orientation for enhancing sensitivity and selectivity in lateral flow immunoassays. *Sens. Diagnost.* 2024;3(10):1613–1634. <https://doi.org/10.1039/D4SD00206G>
4. Sabzehmeidani M.M., Kazemzad M. Quantum dots based sensitive nanosensors for detection of antibiotics in natural products: A review. *Sci. Total Environ.* 2022;810:151997. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151997>
5. Гендриксон О.Д., Зверева Е.А., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. Разработка подходов для высокочувствительной иммунохроматографической детекции акватоксинов в воде и пищевых продуктах. В сб.: *Балтийский морской форум: материалы X Международного морского форума*. 2022. Т. 4. С. 39–49. <https://elibrary.ru/dctmph>
6. Liu C., Yang L., Zhang W., Li D., Li L., Wang H., Ma Y., Li C. A magnetic nanoparticle-based lateral flow immunochromatography assay for the rapid detection of fluoroquinolones in milk. *Eur. Food Res. Technol.* 2021;247(10):2645–2656. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03820-z>
7. Губайдуллина М.К., Урусов А.Е., Жердев А.В., Чуанлай К., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографические тест-системы с использованием конъюгата антивидовые антитела-коллоидное золото: особенности и возможности на примере определения охратоксина А. *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. 2018;59(2):144–150.
8. Gan S.Y., Tye G.J., Chew A.L., Ng W.K., Lai N.S. Linker-mediated oriented antibody immobilisation strategies for a more efficient immunosensor and diagnostic applications: A review. *Biosens. Bioelectron.: X.* 2023;14:100379. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100379>
9. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Modular Set of Reagents in Lateral Flow Immunoassay: Application for Antibiotic Neomycin Detection in Honey. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(5):498. <https://doi.org/10.3390/bios13050498>
10. Barshevskaya L.V., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Highly Sensitive Lateral Flow Immunodetection of the Insecticide Imidacloprid in Fruits and Berries Reached by Indirect Antibody–Label Coupling. *Foods*. 2025;14(1):25. <https://doi.org/10.3390/foods14010025>
11. Zvereva E.A., Zherdev A.V., Aslamova A.A., Hendrickson O.D., Dzantiev B.B., Eremin S.A. Simple indirect immunochromatographic detection of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fresh juices. *J. Food Compos. Analys.* 2025;140:107236. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107236>
12. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B. Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs. *Food Chem.* 2020;318:126510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126510>

## REFERENCES

1. Lu N., Chen J., Rao Z., Guo B., Xu Y. Recent Advances of Biosensors for Detection of Multiple Antibiotics. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(9):850. <https://doi.org/10.3390/bios13090850>
2. Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., *et al.* Methods for Increasing Sensitivity of Immunochromatographic Test Systems with Colorimetric Detection (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2021;57(2):143–151. <https://doi.org/10.1134/S0003683821020113> [Original Russian Text: Panferov V.G., Safenkova I.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Methods for Increasing Sensitivity of Immunochromatographic Test Systems with Colorimetric Detection (Review). *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2021;57(2):107–116 (in Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0555109921020112> ]
3. Lu Z.Y., Chan Y.H. The importance of antibody orientation for enhancing sensitivity and selectivity in lateral flow immunoassays. *Sens. Diagnost.* 2024;3(10):1613–1634. <https://doi.org/10.1039/D4SD00206G>
4. Sabzehmeidani M.M., Kazemzad M. Quantum dots based sensitive nanosensors for detection of antibiotics in natural products: A review. *Sci. Total Environ.* 2022;810:151997. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151997>
5. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Development of approaches for highly sensitive immunochromatographic detection of aquatic toxins in water and food products. *Baltiyskiy morskoy forum = Baltic Maritime Forum*. 2022. V 4. P. 39–49 (in Russ.). <https://elibrary.ru/dctmph>
6. Liu C., Yang L., Zhang W., Li D., Li L., Wang H., Ma Y., Li C. A magnetic nanoparticle-based lateral flow immunochromatography assay for the rapid detection of fluoroquinolones in milk. *Eur. Food Res. Technol.* 2021;247(10):2645–2656. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03820-z>
7. Gubaidullina M.K., Urusov A.E., Zherdev A.V., *et al.* Immunochromatographic Test Systems using Anti-Species Antibodies–Colloidal Gold Conjugate: Their Features and Benefits on the Example of Ochratoxin A Detection. *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2018;73(2):63–68. <https://doi.org/10.3103/S0027131418020049> [Original Russian Text: Gubaidullina M.K., Urusov A.E., Zherdev A.V., Chuanlai K., Dzantiev B.B. Immunochromatographic Test Systems using Anti-Species Antibodies–Colloidal Gold Conjugate: Their Features and Benefits on the Example of Ochratoxin A Detection. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya*. 2018;59(2):144–150 (in Russ.).]
8. Gan S.Y., Tye G.J., Chew A.L., Ng W.K., Lai N.S. Linker-mediated oriented antibody immobilisation strategies for a more efficient immunosensor and diagnostic applications: A review. *Biosens. Bioelectron.: X.* 2023;14:100379. <https://doi.org/10.1016/j.biosx.2023.100379>
9. Barshevskaya L.V., Sotnikov D.V., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Modular Set of Reagents in Lateral Flow Immunoassay: Application for Antibiotic Neomycin Detection in Honey. *Biosensors (Basel)*. 2023;13(5):498. <https://doi.org/10.3390/bios13050498>
10. Barshevskaya L.V., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Highly Sensitive Lateral Flow Immunodetection of the Insecticide Imidacloprid in Fruits and Berries Reached by Indirect Antibody–Label Coupling. *Foods*. 2025;14(1):25. <https://doi.org/10.3390/foods14010025>

13. Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Design of Multiplex Lateral Flow Tests: A Case Study for Simultaneous Detection of Three Antibiotics. *Biosensors (Basel)*. 2020;10(3):17. <https://doi.org/10.3390/bios10030017>
14. Huong N.T., Huyen H.T., Phong T.Q. Conjugation of tetracycline with carrier proteins and production of its polyclonal antibody for the development of rapid test. *Vietnam J. Sci. Technol.* 2024;62(1):23–34. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/17325>
15. Kumar D., Mutreja I., Sykes P. Seed mediated synthesis of highly mono-dispersed gold nanoparticles in the presence of hydroquinone. *Nanotechnology*. 2016;27(35):355601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/35/355601>
16. Максин И.В., Куандыкова А., Лузянин Т.А., Иванов В.С., Кириллова Ю.Г., Хунтеев Г.А. Повышение чувствительности иммунохроматографического анализа для определения пенициллина в молоке за счет ориентированной иммобилизации пенициллин-связывающего белка на поверхности коллоидного золота. *Журн. аналитической химии*. 2025;80(6):545–557. <https://doi.org/10.31857/S0044450225060021>
17. Uhrovčík J. Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects. *Talanta*. 2014;119:178–180. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.10.061>
18. Presolski S.I., Hong V.P., Finn M.G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2011;3(4):153–162. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148>
19. Буркин М.А., Гальвидис И.А., Кононенко Г.П. Методы санитарного контроля животноводческой продукции. Сообщение VII. Иммуноферментный анализ стрептомицина. *Сельскохозяйственная биология*. 2012;47(6): 109–115. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2012.6.109rus>
20. Bastús N.G., Comenge J., Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir*. 2011;27(17):11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
21. Zherdev A.V., Zvereva E.A., Taranova N.A., Safenkova I.V., Vostrikova N.L., Dzantiev B.B. Immunochromatographic food control tools: New developments and practical prospects. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2024;9(4):280–295. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2024-9-4-280-295>
22. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods*. 2015;7(15):6378–6384. <https://doi.org/10.1039/c5ay00835b>
23. Guo J., Xin J., Wang J., Li Z., Yang J., Yu X., Yan M., Mo J. A high-efficiency and selective fluorescent assay for the detection of tetracyclines. *Sci Rep.* 2024;14(1):22918. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74411-7>
24. Han L., Fan Y.Z., Qing M., Liu S.G., Yang Y.Z., Li N.B., Luo H.Q. Smartphones and Test Paper-Assisted Ratiometric Fluorescent Sensors for Semi-Quantitative and Visual Assay of Tetracycline Based on the Target-Induced Synergistic Effect of Antenna Effect and Inner Filter Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020;12(41):47099–47107. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15482>
25. Moudgil P., Bedi J.S., Aulakh R.S., Gill J.P.S., Kumar A. Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. *Food Anal. Methods*. 2019;12(2):338–346. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1365-0>
11. Zvereva E.A., Zherdev A.V., Aslamova A.A., Hendrickson O.D., Dzantiev B.B., Eremin S.A. Simple indirect immunochromatographic detection of herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fresh juices. *J. Food Compos. Analys.* 2025;140:107236. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2025.107236>
12. Hendrickson O.D., Zvereva E.A., Zherdev A.V., Godjevargova T., Xu C., Dzantiev B.B. Development of a double immunochromatographic test system for simultaneous determination of lincomycin and tylosin antibiotics in foodstuffs. *Food Chem.* 2020;318:126510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126510>
13. Bartosh A.V., Sotnikov D.V., Hendrickson O.D., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Design of Multiplex Lateral Flow Tests: A Case Study for Simultaneous Detection of Three Antibiotics. *Biosensors (Basel)*. 2020;10(3):17. <https://doi.org/10.3390/bios10030017>
14. Huong N.T., Huyen H.T., Phong T.Q. Conjugation of tetracycline with carrier proteins and production of its polyclonal antibody for the development of rapid test. *Vietnam J. Sci. Technol.* 2024;62(1):23–34. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/17325>
15. Kumar D., Mutreja I., Sykes P. Seed mediated synthesis of highly mono-dispersed gold nanoparticles in the presence of hydroquinone. *Nanotechnology*. 2016;27(35):355601. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/35/355601>
16. Maksin I.V., Kuandykova A., Luzyanin T.A., et al. Increasing the Sensitivity of Immunochromatographic Assay for the Determination of Penicillin in Milk by Oriented Immobilization of Penicillin-Binding Protein on the Colloidal Gold Surface. *J. Anal. Chem.* 2025;80(6):1040–1051. <https://doi.org/10.1134/S1061934825700388> [Original Russian Text: Maksin I.V., Kuandykova A., Luzyanin T.A., Ivanov V.S., Kirillova Yu.G., Khunteev G.A. Increasing the Sensitivity of Immunochromatographic Assay for the Determination of Penicillin in Milk by Oriented Immobilization of Penicillin-Binding Protein on the Colloidal Gold Surface. *Zhurnal analiticheskoi khimii*. 2025;80(6): 545–557. <https://doi.org/10.31857/S0044450225060021> ]
17. Uhrovčík J. Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects. *Talanta*. 2014;119:178–180. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.10.061>
18. Presolski S.I., Hong V.P., Finn M.G. Copper-Catalyzed Azide–Alkyne Click Chemistry for Bioconjugation. *Curr. Protoc. Chem. Biol.* 2011;3(4):153–162. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch110148>
19. Burkin M.A., Gal'vidis I.A., Kononenko G.P. Methods for sanitary surveillance of livestock production. VII. Enzymoimmunoassay of streptomycin. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya = Agricultural Biology*. 2012;47(6):109–115. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2012.6.109eng>
20. Bastús N.G., Comenge J., Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus Ostwald ripening. *Langmuir*. 2011;27(17):11098–11105. <https://doi.org/10.1021/la201938u>
21. Zherdev A.V., Zvereva E.A., Taranova N.A., Safenkova I.V., Vostrikova N.L., Dzantiev B.B. Immunochromatographic food control tools: New developments and practical prospects. *Theory and Practice of Meat Processing*. 2024;9(4):280–295. <https://doi.org/10.21323/2414-438X-2024-9-4-280-295>
22. Zvereva E.A., Byzova N.A., Sveshnikov P.G., Zherdev A.V., Dzantiev B.B. Cut-off on demand: adjustment of the threshold level of an immunochromatographic assay for chloramphenicol. *Anal. Methods*. 2015;7(15):6378–6384. <https://doi.org/10.1039/c5ay00835b>

26. Chen Y., Kong D., Liu L., Song S., Kuang H., Xu C. Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody. *Food Anal. Methods*. 2016;9(4): 905–914. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0262-z>
27. Wang X., Li J., Jian D., Zhang Y., Shan Y., Wang S., Liu F. Paper-based antibiotic sensor (PAS) relying on colorimetric indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative tetracycline and chloramphenicol detection. *Sens. Actuators B: Chem.* 2021;329:129173. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129173>
28. Berlina A.N., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Development of Immunochromatographic Assay for Determination of Tetracycline in Human Serum. *Antibiotics*. 2018;7(4):99. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040099>
29. Tian Y., Bu T., Zhang M., Sun X., Jia P., Wang Q., Liu Y., Bai F., Zhao S., Wang L. Metal-polydopamine framework based lateral flow assay for high sensitive detection of tetracycline in food samples. *Food Chem.* 2021;339:127854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127854>
30. Wang X., Chen C., Waterhouse G.I.N., Qiao X., Xu Z. Ultra-sensitive detection of streptomycin in foods using a novel SERS switch sensor fabricated by AuNRs array and DNA hydrogel embedded with DNAzyme. *Food Chem.* 2022;393:133413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133413>
31. Shinde S.K., Kim D.Y., Saratale R.G., Kadam A.A., Saratale G.D., Syed A., Bahkali A.H., Ghodake G.S. Histidine Functionalized Gold Nanoparticles for Screening Aminoglycosides and Nanomolar Level Detection of Streptomycin in Water, Milk, and Whey. *Chemosensors*. 2021;9(12):358. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120358>
32. Roushani M., Ghanbari K. An electrochemical aptasensor for streptomycin based on covalent attachment of the aptamer onto a mesoporous silica thin film-coated gold electrode. *Microchim. Acta*. 2019;186(2):115. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3191-x>
33. Jiang J., Luo P., Liang J., Shen X., Lei H., Li X. A highly sensitive and quantitative time resolved fluorescent microspheres lateral flow immunoassay for streptomycin and dihydrostreptomycin in milk, honey, muscle, liver, and kidney. *Anal. Chim. Acta*. 2022;1192:339360. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339360>
34. Zhou J., Nie W., Chen Y., Yang C., Gong L., Zhang C., Chen Q., He L., Feng X. Quadruplex gold immunochromatographic assay for four families of antibiotic residues in milk. *Food Chem.* 2018;256:304–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.002>
23. Guo J., Xin J., Wang J., Li Z., Yang J., Yu X., Yan M., Mo J. A high-efficiency and selective fluorescent assay for the detection of tetracyclines. *Sci Rep*. 2024;14(1):22918. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-74411-7>
24. Han L., Fan Y.Z., Qing M., Liu S.G., Yang Y.Z., Li N.B., Luo H.Q. Smartphones and Test Paper-Assisted Ratiometric Fluorescent Sensors for Semi-Quantitative and Visual Assay of Tetracycline Based on the Target-Induced Synergistic Effect of Antenna Effect and Inner Filter Effect. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2020;12(41):47099–47107. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c15482>
25. Moudgil P., Bedi J.S., Aulakh R.S., Gill J.P.S., Kumar A. Validation of HPLC Multi-residue Method for Determination of Fluoroquinolones, Tetracycline, Sulphonamides and Chloramphenicol Residues in Bovine Milk. *Food Anal. Methods*. 2019;12(2):338–346. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1365-0>
26. Chen Y., Kong D., Liu L., Song S., Kuang H., Xu C. Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody. *Food Anal. Methods*. 2016;9(4): 905–914. <https://doi.org/10.1007/s12161-015-0262-z>
27. Wang X., Li J., Jian D., Zhang Y., Shan Y., Wang S., Liu F. Paper-based antibiotic sensor (PAS) relying on colorimetric indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative tetracycline and chloramphenicol detection. *Sens. Actuators B: Chem.* 2021;329:129173. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.129173>
28. Berlina A.N., Bartosh A.V., Zherdev A.V., Xu C., Dzantiev B.B. Development of Immunochromatographic Assay for Determination of Tetracycline in Human Serum. *Antibiotics*. 2018;7(4):99. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7040099>
29. Tian Y., Bu T., Zhang M., Sun X., Jia P., Wang Q., Liu Y., Bai F., Zhao S., Wang L. Metal-polydopamine framework based lateral flow assay for high sensitive detection of tetracycline in food samples. *Food Chem.* 2021;339:127854. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127854>
30. Wang X., Chen C., Waterhouse G.I.N., Qiao X., Xu Z. Ultra-sensitive detection of streptomycin in foods using a novel SERS switch sensor fabricated by AuNRs array and DNA hydrogel embedded with DNAzyme. *Food Chem.* 2022;393:133413. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133413>
31. Shinde S.K., Kim D.Y., Saratale R.G., Kadam A.A., Saratale G.D., Syed A., Bahkali A.H., Ghodake G.S. Histidine Functionalized Gold Nanoparticles for Screening Aminoglycosides and Nanomolar Level Detection of Streptomycin in Water, Milk, and Whey. *Chemosensors*. 2021;9(12):358. <https://doi.org/10.3390/chemosensors9120358>
32. Roushani M., Ghanbari K. An electrochemical aptasensor for streptomycin based on covalent attachment of the aptamer onto a mesoporous silica thin film-coated gold electrode. *Microchim. Acta*. 2019;186(2):115. <https://doi.org/10.1007/s00604-018-3191-x>
33. Jiang J., Luo P., Liang J., Shen X., Lei H., Li X. A highly sensitive and quantitative time resolved fluorescent microspheres lateral flow immunoassay for streptomycin and dihydrostreptomycin in milk, honey, muscle, liver, and kidney. *Anal. Chim. Acta*. 2022;1192:339360. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339360>
34. Zhou J., Nie W., Chen Y., Yang C., Gong L., Zhang C., Chen Q., He L., Feng X. Quadruplex gold immunochromatographic assay for four families of antibiotic residues in milk. *Food Chem.* 2018;256:304–310. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.002>



## Об авторах

**Максин Иван Владимирович**, аспирант, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78); ученый-исследователь, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: maxinivanv@gmail.com. SPIN-код РИНЦ 1550-5855, <https://orcid.org/0009-0007-9730-1465>

**Полякова Дарья Ивановна**, студент, Институт фармации и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) (117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6); лаборант, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: dpolyakova@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0009-0007-8354-6883>

**Кесарева Виктория Александровна**, студент, Институт фармации и биотехнологии, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) (117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6); лаборант, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: vkesareva@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6544-4057>

**Сысуев Александр Анатольевич**, ассистент, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: sysuev@mirea.ru. <https://orcid.org/0009-0007-8233-4221>

**Иванов Владислав Сергеевич**, ведущий ученый-исследователь, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: vivanov@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1025-2714>

**Симонова Евгения Игоревна**, аспирант, Департамент ветеринарной медицины, Аграрно-технологический институт, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН) (117198, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6); директор по проектам, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: simonova1999@yandex.ru. Scopus Author ID 57222665772, SPIN-код РИНЦ 9612-6527, <https://orcid.org/0000-0001-7798-3859>

**Хунтеев Герман Анатольевич**, к.м.н., директор по науке, ООО «Рapid Био» (121205, Россия, Москва, Большой бульвар, д. 42, стр. 1). E-mail: gk@drdbiotech.ru. Scopus Author ID 7801430884, ResearcherID AAC-4456-2019, SPIN-код РИНЦ 6573-5340, <https://orcid.org/0000-0001-8182-1836>

**Кириллова Юлия Геннадьевна**, к.х.н., доцент, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: dryulets@mail.ru. Scopus Author ID 9332799900, ResearcherID F-5697-2016, SPIN-код РИНЦ 7949-6038, <https://orcid.org/0000-0002-0988-8515>

## About the Authors

**Ivan V. Maksin**, Postgraduate Student, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia); Research Scientist, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: maxinivanv@gmail.com. RSCI SPIN-code 1550-5855, <https://orcid.org/0009-0007-9730-1465>

**Darya I. Polyakova**, Student, Institute of Pharmacy and Biotechnology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (6, Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117198, Russia); Laboratory Assistant, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: dpolyakova@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0009-0007-8354-6883>

**Viktoriya A. Kesareva**, Student, Institute of Pharmacy and Biotechnology, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (6, Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117198, Russia); Laboratory Assistant, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: vkesareva@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0000-0001-6544-4057>

**Alexander A. Sysuev**, Assistant, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: sysuev@mirea.ru. <https://orcid.org/0009-0007-8233-4221>

**Vladislav S. Ivanov**, Leading Research Scientist, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: vivanov@drdbiotech.ru. <https://orcid.org/0000-0003-1025-2714>

**Evgeniya I. Simonova**, Postgraduate Student, Department of Veterinary Medicine, Agro-Technological Institute, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University) (6, Miklukho-Maklaya ul., Moscow, 117198, Russia); Project Director, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: simonova1999@yandex.ru. Scopus Author ID 57222665772, RSCI SPIN-code 9612-6527, <https://orcid.org/0000-0001-7798-3859>

**German A. Khunteev**, Can. Sci. (Med.), Director of Science, Rapid Bio, (42/1, Bol'shoi bul., Moscow, 121205, Russia). E-mail: gk@drdbiotech.ru. Scopus Author ID 7801430884, ResearcherID AAC-4456-2019, RSCI SPIN-code 6573-5340, <https://orcid.org/0000-0001-8182-1836>

**Yulia G. Kirillova**, Can. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: dryulets@mail.ru. Scopus Author ID 9332799900, ResearcherID F-5697-2016, RSCI SPIN-code 7949-6038, <https://orcid.org/0000-0002-0988-8515>