

**Гентамицин ИФА**  
*5111GEN[17]04.20*  
Иммуноферментный метод  
для скрининга и количественного определения гентамицина  
в различных пробах



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm в Беларуси  
ОДО "КомПродСервис"  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50  
[www.komprod.com](http://www.komprod.com), [info@komprod.com](mailto:info@komprod.com)



Официальный дистрибьютор  
R-Biopharm в России  
ООО "Неотест"  
+7 (499) 649-02-01  
[info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru), [www.neo-test.ru](http://www.neo-test.ru)

## КРАТКИЕ СВЕДЕНИЯ

Тест-набор для ИФА гентамицина предназначен для конкурентного иммуноферментного анализа концентрации гентамицина в различных пробах. Тест-набор рассчитан на 96 анализов. При выполнении анализа стандартных и исследуемых растворов в повторностях с помощью одной тест-системы можно проанализировать 40 проб. ИФА-набор содержит все реагенты, необходимые для проведения анализа. Реагенты, необходимые для подготовки проб, не входят в состав тест-набора.

Гентамицин принадлежит к группе антибиотиков, содержащих углеводы, и называемых аминогликозиды [1]. Все аминогликозиды являются потенциально токсичными соединениями [2, 3], которые могут повреждать вестибулярные и слуховые функции у человека, а также у животных. Тем не менее, они используются в практике из-за их антибактериальной и противогрибковой активности. Аминогликозиды используются для лечения серьезных инфекций, вызванных грам-отрицательными микроорганизмами. Тем не менее, граница между терапевтической эффективностью и токсичностью узка, поэтому дозировка должна контролироваться. Остатки аминогликозидов могут накапливаться в продуктах животного происхождения по нескольким причинам, таким как преднамеренное и непреднамеренное кормление, чтобы предотвратить инфекции у коров или избежать вспышек заболеваний пищеварительной системы и дыхательных путей у птицы.

В рамках Европейского Союза установлены условные предельные допустимые концентрации аминогликозидов (см. таблицу).

**Таблица 1:** Предельно допустимые концентрации (мг/кг) аминогликозидов.

Аминогликозиды	Почки	Печень	Мышцы	Молоко	Жир	Яйца
Стрептомицин	1.0	0.5	0.5	0.2	0.5	-
Дигидрострептомицин	1.0	0.5	0.5	0.2	0.5	-
Гентамицин	0.75	0.2	0.05	0.1	0.05	-
Неомицин	5.0	0.5	0.5	1.5	0.5	0.5

## 2. ПРИНЦИПЫ ИФА ГЕНТАМИЦИНА

Тест-набор для проведения ИФА включает сенсibilизированный планшет (12 стрипов по 8 лунок в каждом). Антитела, гентамицин, меченный пероксидазой хрена, стандартные растворы либо растворы проб вносятся в лунки планшета. Свободный гентамицин, присутствующий в пробе или градуировочном растворе, и маркированный гентамицин конкурируют за связывание с антителами (конкурентный ИФА).

После инкубации в течение 1 часа несвязанные реагенты удаляются на стадии промывки.

Количество связанного меченого гентамицина визуализируется внесением субстрат/хромогена ( $H_2O_2$ /тетраметилбензидин). Связанный конъюгат превращает бесцветный хромоген в окрашенный продукт.

Реакция окрашивания останавливается внесением серной кислоты. Интенсивность окрашивания измеряется фотометрически при длине волны 450 нм, она обратно пропорциональна концентрации гентамицина в пробе.

### 3. СПЕЦИФИЧНОСТЬ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Для данного тест-набора ИФА используются специфические кроличьи антитела, полученные с помощью гентамицина, конъюгированного с белком.

Перекрестная чувствительность:

гентамицин	100%
сизомицин	25%
неомицин	<0,1%
канамицин	<0,1%
тобрамицин	<0,1%
линкомицин	<0,1%

Предел обнаружения (LOD) определяется при оптимальных условиях.

Матрица	Способ пробоподготовки	Предел обнаружения (LOD), мкг/кг (ppb)	ссβ, мкг/кг (ppb)
Молоко	8.1	0,4	10
Ткани	8.2	12,5	-
Сыворотка/плазма	8.4	2	-
Мед	8.5	5	-
Яйца	8.6	1	-
Моча	8.7	4	-
Корма	8.8	10	-

### 4. УСЛОВИЯ ОБРАЩЕНИЯ И ХРАНЕНИЕ

– Набор реагентов должен храниться в холодильнике (при температуре от +2°C до +8°C) перед использованием и помещаться в холодильник сразу после применения, условия хранения описаны в разделе 9.

– После истечения срока годности невозможно гарантировать приемлемое качество.

- Следует избегать появления конденсата в лунках планшета. Планшет должен быть согрет до температуры окружающей среды перед вскрытием упаковки.
- Компоненты тест-набора должны готовиться непосредственно перед применением, но после доведения до комнатной температуры.
- Раствор субстрат/хромогена может храниться в холодильнике (при температуре от +2°C до +8°C) до окончания срока годности.
- Необходимо избегать любого прямого воздействия света на раствор хромогена.

Следующие показатели могут являться признаком порчи реагентов:

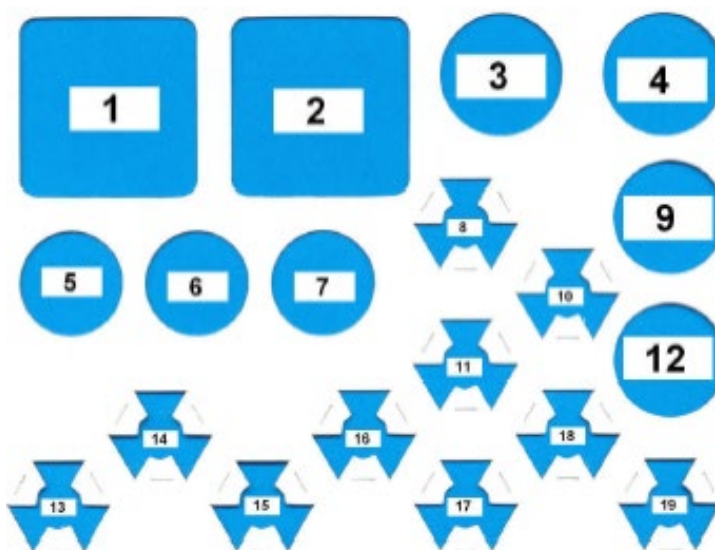
- Голубая окраска раствора хромогена перед внесением в лунки.
- Слабая либо отсутствующая реакция окрашивания нулевого стандартного раствора ( $V_{max}$ ,  $E_{450nm} < 0,8$ ).

## 5. КОМПОНЕНТЫ НАБОРА

### Инструкция

Один запечатанный микротитровальный планшет (12 стрипов по 8 лунок), сенсibilизированный антителами. Планшет готов к использованию.

Позиции реагентов в наборе. Способ приготовления реагентов смотрите в разделе 9.



1. Буфер для разведения (20 мл, готов для применения)
2. Буфер для промывки планшета (30 мл, концентрации 20x)
3. Раствор субстрата (12 мл, готов для применения)

4. **Стоп-реагент** (15 мл, готов для применения)
5. **Конъюгат** (лиофилизат, голубая крышка)
6. **Антитела** (лиофилизат, желтая крышка)
7. не используется
8. **Спайк-раствор с концентрацией 1000 нг/мл** (1 мл)
9. не используется
10. не используется
11. не используется
12. не используется
13. **Нулевой градуировочный раствор** (2 мл, готов для применения)
14. **Градуировочный раствор 1** (1 мл, готов для применения) **0,25 нг/мл**
15. **Градуировочный раствор 2** (1 мл, готов для применения) **0,5 нг/мл**
16. **Градуировочный раствор 3** (1 мл, готов для применения) **1 нг/мл**
17. **Градуировочный раствор 4** (1 мл, готов для применения) **5 нг/мл**
18. **Градуировочный раствор 5** (1 мл, готов для применения) **10 нг/мл**
19. **Градуировочный раствор 6** (1 мл, готов для применения) **50 нг/мл**

## **6. ОБОРУДОВАНИЕ И ТРЕБУЕМЫЕ РЕАГЕНТЫ, НЕ ВХОДЯЩИЕ В СОСТАВ ТЕСТ-НАБОРА**

- Весы и емкости для взвешивания
- Перчатки
- Вытяжной шкаф
- Гомогенизатор (блендер, Ultra Turrax, миксер)
- Центрифуга (2000 x g)
- Воронка
- Автоматизированный промыватель микропланшетов или 8-канальная микропипетка 100 - 300 мкл
- Встряхиватель для микротитровальных планшетов
- Считыватель микротитровальных планшетов с фильтром 450 нм
- Пробирки из силиконизированного стекла или пластиковые пробирки
- Микропипетки 20 - 200 мкл, 100 - 1000 мкл
- Мультипипетка с гребенчатым наконечником на 2,5 мл
- Трихлоруксусная кислота
- Дигидрогенфосфат натрия
- Дигидрогенфосфат калия
- Хлорид калия
- Хлорид натрия
- Твин 80

## 7. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

- Гентамицин является токсичным компонентом. Следует избегать контакта с кожей и ротовой полостью. Не вдыхать.
- Стоп-реагент содержит серную кислоту в концентрации 0,5 М. Не допускать контакта реагента с кожей.
- Избегать контакта биологического материала с кожей и слизистыми.
- Не пипетировать ртом.
- Не допускается есть, пить, курить, хранить или готовить пищу или применять косметику в пределах обозначенной рабочей области.
- Тетраметилбензидин является токсичным при вдыхании, при контакте с кожей и при проглатывании. Поэтому будьте внимательны при работе с субстратом.
- Не используйте компоненты тест-набора после истечения их срока годности и не перемешивайте компоненты из разных партий.
- Каждая лунка используется как оптическая кювета. Поэтому не прикасайтесь к поверхности лунок, не допускайте их повреждения и загрязнения.
- Все компоненты должны быть полностью растворены перед применением. Обращайте особое внимание на субстрат, который имеет тенденцию к кристаллизации при температуре +4°C.
- Оптимальные результаты могут быть получены при строгом соблюдении протокола анализа. Точность и воспроизводимость результатов анализа зависит от точности пипетирования и равномерного промывания лунок.

## 8. ПОДГОТОВКА ПРОБ

### 8.1 Пробы молока

- Обезжирить пробу центрифугированием в течение 10 минут при 4°C и 2000 g
- Удалить верхний жировой слой
- Развести и перемешать пробу обезжиренного молока в 10 раз в буфере для разведения проб\*
- Отрегулировать уровень pH 7,4±0,4
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора на лунку

### 8.2 Пробы тканей

- 5 г гомогенизированной пробы поместить в пластиковую пробирку
- Добавить 20 мл буфера для разведения проб\*
- Гомогенизировать, экстрагировать в течение 30 минут на ротаторе

- Центрифугировать в режиме 10 мин / 4000g / 4°C
- Удалить верхний слой жира
- Развести 50 мкл надосадочного слоя в 450 мкл буфера для разведения проб\*, перемешать на вортексе
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора на лунку

### 8.3 Пробы жира

- 1 г гомогенизированной (расплавленной) пробы поместить в пластиковую пробирку
- Добавить 10 мл буфера для разведения проб\*, нагреть на водяной бане при 70°C в течение 30 минут
- Центрифугировать в режиме 15 мин / 2000g / 4°C
- Удалить верхний слой жира, перенести 1 мл экстракта в новую пластиковую пробирку
- Добавить 4 мл буфера для разведения проб\*, перемешать на вортексе
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора (соответствующего 0,02 г жира/мл) на лунку

### 8.4 Пробы сыворотки /плазмы

- Развести пробу сыворотки крови в 10 раз в буфере для разведения проб\* в пластиковой либо стеклянной силиконизированной пробирке (напр., 50 мкл сыворотки с 450 мкл буфера для разведения)
- Тщательно перемешать на вортексе
- В тесте используют 50 мкл разведенной в 10 раз сыворотки на лунку (в повторностях)

### 8.5 Пробы меда

Мед является сложной матрицей. В связи с этим, при тестировании специфических образцов меда, процедура пробоподготовки должна проходить дополнительную проверку.

- 1 г гомогенизированной пробы поместить в пластиковую пробирку
- Добавить 4 мл буфера для разведения проб\*, тщательно перемешать на вортексе
- Дать отстояться в течение 1 минуты для разделения фаз
- Развести 1 мл прозрачной верхней фазы с 4 мл буфера для разведения проб\*
- Тщательно перемешать на вортексе
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора

### 8.6 Пробы яиц

- 1 мл гомогенизированной пробы яиц поместить в пластиковую пробирку
- Добавить 4 мл буфера для разведения проб\*

- Перемешать на вортексе
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора

### 8.7 Пробы мочи

- Развести пробу мочи в 10 раз в буфере для разведения проб\*
- Проверить уровень pH 7,4±0,4
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора

### 8.8 Пробы кормов

- 1 г гомогенизированной пробы поместить в пластиковую пробирку
- Добавить 5 мл трихлоруксусной кислоты (3%)
- Гомогенизировать в течение 1 минуты,
- Экстрагировать в течение 30 минут на ротаторе
- Центрифугировать в режиме 10 мин / 2000g / 4°C
- Удалить верхний слой жира
- Перенести 100 мкл профильтрованного супернатанта в пластиковую пробирку
- Добавить 900 мкл буфера для разведения проб\*, перемешать на вортексе
- Отрегулировать уровень pH 7,4±0,4
- В тесте использовать 50 мкл полученного раствора

**\*Буфер для разведения проб:** развести в 1 л дистиллированной воды 1.15 г Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0.2 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.2 г KCl; 30 г NaCl; 0.5 мл Твин 80 (pH 7.4 /7.3-7.5/).

## **9. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РЕАГЕНТОВ**

Готовые к использованию градуировочные растворы приготовлены с использованием буфера для разведения. При использовании альтернативной матрицы приготовление градуировочных растворов либо спайков должно осуществляться в соответствующей матрице с использованием спайк-раствора концентрации 1000 нг/мл, входящего в состав тест-набора.

Перед использованием тест-системы доведите температуру всех реагентов до комнатной (20 -25°C). Неиспользуемые реагенты должны быть немедленно помещены в оригинальную упаковку на хранение при +2°C—+8°C. Условия длительного хранения реагентов см. в п. 4 (Условия обращения и хранения)

### Микротитровальный планшет

Неиспользуемые стрипы должны храниться с осушителем в плотно закрытом оригинальном пакете при температуре 2 - 8 °C. Сохраните также рамку для планшета.

### Буфер для промывки



Буфер для промывки поставляется в концентрации 20х. Буфер необходимо приготовить непосредственно перед использованием. На один стрип необходимо 40 мл разведенного раствора (2 мл концентрата буфера + 38 мл дистиллированной воды).

#### Раствор субстрата

Раствор субстрата (готовый к применению) осаждается при температуре +4°C. Бутылочку с ним необходимо довести до комнатной температуры (в темноте) и перемешать содержимое перед внесением в лунки.

#### Спайк-раствор концентрации 1000 нг/мл

Для приготовления стандартных растворов в соответствующей матрице либо для приготовления спайков должен использоваться спайк-раствор концентрации 1000 нг/мл. Спайк-раствор разводится в соответствующей матрице для получения стандартного ряда концентрации 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.25 нг/мл. Также необходимо приготовить нулевого стандартного раствора на основе той же матрицы.

#### Раствор конъюгата

Лиофилизированный конъюгат должен быть восстановлен в 4 мл буфера для разведения. Раствор тщательно перемешать, поместить в темное место. Хранить в темном месте при температуре +2 - +8°C не более одной недели. Для более длительного хранения следует аликвотировать конъюгат и хранить при -20°C.

#### Раствор антител

Лиофилизированные антитела должны быть восстановлены в 4 мл буфера для разведения. Раствор тщательно перемешать, поместить в темное место. Хранить в темном месте при температуре +2 - +8°C не более одной недели. Для более длительного хранения следует аликвотировать антитела и хранить при -20°C.

## **10. ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА**

### Протокол промывки

При ИФА между каждым этапом иммунологической инкубации должны удаляться несвязанные компоненты. Это достигается посредством соответствующей процедуры промывки. Очевидно, что каждая процедура промывания должна проводиться с большой тщательностью для гарантирования хороших результатов повторяемости и воспроизводимости.

В принципе, промывка вручную или с помощью автоматического вошера может осуществляться следующим образом:

### Промывка вручную

1. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.

2. Все лунки заполняют буфером для промывания до края лунки (300 мкл)
3. Этот процесс промывки (этапы 1 и 2) повторяют трижды.
4. Жидкость из лунок выливают путем резкого переворачивания планшета
5. После последнего промывания планшет переворачивают и удаляют остатки жидкости путем энергичного троекратного постукивания рамки с лунками по столу, накрытому листом сухой фильтровальной бумаги.
6. Не допускайте высыхания лунок перед внесением следующего реагента.

#### Промывание с помощью автоматического вошера

При использовании автоматического вошера проверьте, чтобы из всех лунок жидкость удалялась полностью, чтобы раствор для промывания тщательно распределялся, заполняя до края каждую лунку во время каждого цикла промывания. Вошер должен быть запрограммирован на выполнение трех циклов промывки.

#### Протокол анализа

1. Подготовьте пробы в соответствии с разделом 8 (Подготовка проб) и подготовьте реагенты в соответствии с разделом 9 (Подготовка реагентов).
2. Вносят 100 мкл нулевого стандартного раствора в двух повторностях (лунки H1, H2, холостая проба)  
Вносят 50 мкл нулевого стандартного раствора в двух повторностях (лунки A1, A2, макс. опт. плотность).  
Вносят 50 мкл каждого стандартного раствора в двух повторностях (лунки от B1,2 до G1,2, т.е. 50, 10, 5, 1, 0.5 и 0.25 нг/мл).
3. Вносят по 50 мкл каждой пробы в двух повторностях.
4. Вносят по 25 мкл конъюгата во все лунки за исключением H1 и H2.
5. Вносят по 25 мкл раствора антител во все лунки за исключением H1 и H2.
6. Планшет запечатывают и перемешивают в течение нескольких секунд его содержимое (на шейкере для микротитровальных планшетов либо аккуратными круговыми движениями).
7. Планшет инкубируют в течение 1 часа в темноте в холодильнике при температуре от 2 до 8°C.
8. Удаляют раствор из микротитровального планшета и промывают 3 раза буфером для промывания.
9. Вносят по 100 мкл раствора субстрата во все лунки.
10. Тщательно перемешивают и инкубируют планшет в темноте в течение 30 минут при комнатной температуре (20°C - 25°C).
11. Вносят по 100 мкл стоп-реагента во все лунки.
12. Сразу же измеряют оптическую плотность при 450 нм.

## 11. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вычтите среднее значение оптической плотности (ОП) для лунок Н1 и Н2 (бланк) из отдельных значений ОП для лунок, содержащих градуировочные растворы и пробы.

Значения ОП для шести градуировочных растворов и проб (среднее значение двух определений) делят на среднее значение ОП нулевого стандартного раствора (лунки А1 и А2) и умножают на 100. Таким образом, нулевой стандартный раствор принимается за 100% (максимальная оптическая плотность) и другие значения ОП приводятся в процентах от максимальной оптической плотности.

$$\frac{B}{B_{max}} \times 100\% = \% \text{ от максимальной ОП}$$

$B$  – среднее значение ОП тестируемого образца или стандартного раствора,  $B_{max}$  – среднее значение ОП нулевого стандартного раствора.

Градуировочная кривая:

Значения (% от максимальной оптической плотности), вычисленные для стандартных растворов, наносят на график (по оси  $Y$ ) напротив эквивалентной концентрации гентамицина (нг/мл) по логарифмической оси  $X$ .

Альтернатива способ построения калибровочной кривой:

Рассчитанные значения абсорбции стандартов наносят на ось  $Y$ , эквивалентные концентрации аналита наносят на ось  $X$ . Ось  $Y$  является *logit* шкалой, ось  $X$  – логарифмической шкалой.

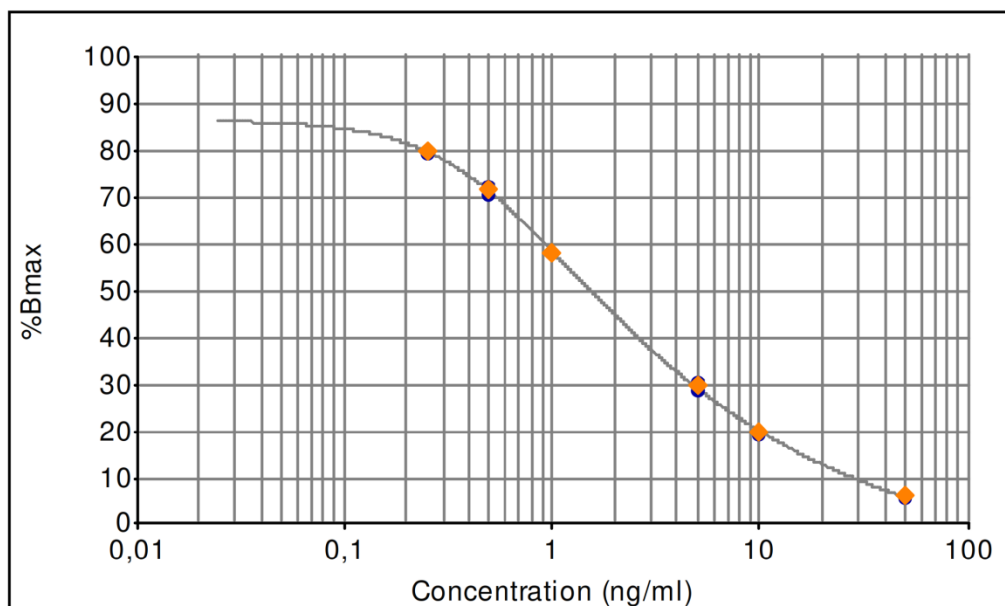


Рисунок 1: Пример калибровочной кривой.

### 8.1. Пробы молока

Количество гентамицина в пробе выражается как эквивалент гентамицина. Эквивалент гентамицина в пробе (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности, может быть получен по калибровочной кривой. Для получения концентрации гентамицина в неразбавленном молоке значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 10.

### 8.2. Пробы тканей

Эквивалент гентамицина в экстракте тканей (нг/мл), соответствующий % от максимальной оптической плотности, может быть получен по калибровочной кривой. Для получения концентрации гентамицина в пробах тканей значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 50.

### 8.3. Пробы жира

Для получения концентрации гентамицина в пробах жира значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 50.

### 8.4. Пробы сыворотки/плазмы

Для получения концентрации гентамицина в пробах сыворотки/плазмы крови значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 10.

### 8.5.1 Пробы меда

Для получения концентрации гентамицина в пробах меда значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 25.

### 8.6. Пробы яиц

Для получения концентрации гентамицина в пробах яиц значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 5.

### 8.7. Пробы мочи

Для получения концентрации гентамицина в пробах мочи значение концентрации гентамицина, полученное по калибровочной кривой, должно быть умножено на 10.

### 8.8. Пробы кормов

Для получения концентрации гентамицина в пробах кормов значение концентрации гентамицина, полученное по градуировочной кривой, должно быть умножено на 50.

Примечание: «положительные» пробы должны быть подтверждены альтернативным (напр. хроматографическим) методом.

## 12. ЛИТЕРАТУРА

1. Berdy J., Aszalos A., Bostian M and McNitt K.L. Handbook of Antibiotic Compounds, Vol. 1, CRC Press Inc. Boca Raton, Florida U.S.A. 1980.
2. Standefer J.C. and Saunder G.C. Enzymeimmunoassay for Gentamicin, Clin. Chem., 24, 1903, 1978.
3. Analysis of Antibiotic Drug Residues in Food Products of Animal Origin., Ed. Vipin K. Agarwal U.S.A. 1992.
4. Commission Regulation 37/2010/EU. Official J. of the European Union, L15 (2010) 1-72.

## 13. ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

Для размещения заказа на тест-набор на гентамицин используйте код набора 5111 GEN.



Техническая поддержка и прием заявок:  
+375 (17) 336-50-54, +7 (499) 704-05-50, +7 (499) 649-02-01  
[info@komprod.com](mailto:info@komprod.com), [support@komprod.com](mailto:support@komprod.com), [info@neo-test.ru](mailto:info@neo-test.ru)