

УДК 619.611:636.06

## РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПРЯМОГО КОНКУРЕНТНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕОМИЦИНА В МОЛОКЕ

© 2011 г. М. А. Буркин, И. А. Гальвидис

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, Москва, 105064  
e-mail: burma68@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.02.2010 г.

В результате иммунизации кроликов неомицином В (НМ), конъюгированным с окисленным периодатом трансферина, были получены поликлональные антитела, на основе которых создан непрямой конкурентный твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). При использовании полимеризованного глутаровым альдегидом (ГА) НМ, желатины-рибостамицин(пи) и желатины-НМ(га) в качестве твердофазных антигенов были разработаны ИФА-системы для количественного определения антибиотика в молоке с различным рабочим диапазоном измерения и пределами определения – 1.0, 0.1 и 0.01 нг/мл, соответственно. Без специальной пробоподготовки максимально допустимый уровень (МДУ) этого антибиотика в молоке, установленный в странах ЕС, мог выявляться в наименее чувствительном варианте при 100-кратном разведении образца. Средний показатель извлечения при анализе молока 1.5–10% жирности составил 111.7% при общем диапазоне 84–125.2%. При анализе 106 проб молока уровень НМ был выше 100 нг/мл в 57 образцах. В 10% случаев остаточное содержание препарата превышало 500 нг/мл. Превышение МДУ было зарегистрировано в 1 случае (1690 нг/мл). Разработанный метод специфичен, не подвержен влиянию со стороны других используемых в ветеринарии аминокликозидов, обладает большим запасом чувствительности и может служить эффективным инструментом определения содержания НМ в молочном сыре.

Неомицин – комплекс аминогликозидных антибиотиков (неомицины А, В, С), продуцируемый *Streptomyces fradiae*, из которых более 90% приходится на неомицин В (НМ) – наиболее активный и практически значимый компонент, а содержание неомицина А (неамин) не превышает 1%. В таком же соотношении эти соединения представлены в коммерческих препаратах антибиотика. Бактерицидная активность неомицина распространяется на грамположительные и грамотрицательные микроорганизмы, находящиеся как в стадии размножения, так и в стадии покоя. К нему чувствительны стафилококки, пневмококки, листерии, эшерихии, сальмонеллы, возбудитель сибирской язвы и др. В ветеринарии НМ используют для лечения и профилактики желудочно-кишечных инфекций, легочных, гнойно-септических и кожных заболеваний. Как и другие аминогликозиды НМ нейро- и нефротоксичен [1]. Для регламентации остаточных количеств антибиотика в продуктах питания, провоцирующих формирование резистентности и селекцию устойчивых к данному препарату микроорганизмов, во многих странах установлен максимально допустимый уровень (МДУ) его содержания в продуктах животного происхождения. Так, в странах ЕС этот показатель, определяемый по маркерному соединению неомицину В, составляет 500 мкг/кг для мяса, жира, печени и яиц, 1500 мкг/кг для моло-

ка и 5000 мкг/кг – для почек [2]. В Российской Федерации нормирование по данному антибиотику не установлено, рекомендуемая экспертами ФАО/ВОЗ остаточная концентрация препарата в молоке не должна превышать 500 мкг/кг [3].

Микробиологические тесты, обычно используемые для выявления антибактериальной активности в объекте и основанные на подавлении роста чувствительной к антибиотику культуры микроорганизма, позволяют регистрировать НМ до 500 мкг/кг. Однако, они длительны, неспецифичны и непригодны в случаях сочетания нескольких антибактериальных препаратов. Аналитические методы, рекомендованные для идентификации этого препарата в продуктах животного происхождения, основаны на ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией или жидкостной хроматографии с пределом определения 100 мкг/кг ([www.emea.europa.eu](http://www.emea.europa.eu); [www.codexalimentarius.net](http://www.codexalimentarius.net)). Трудоемкость и дороговизна хроматографических методов ограничивает их применение для массового анализа образцов. Привлекательность иммуноферментного анализа (ИФА) для определения НМ наряду с простотой, специфичностью и чувствительностью, значительно превышающей вышеупомянутые методы [4–6], обусловлена также удобством его использования для скрининговых исследований.

Цель работы — создание непрямого конкурентного ИФА как простого и удобного метода, пригодного для выполнения скрининговых исследований с целью выявления остаточных количеств НМ в молоке.

### МЕТОДИКА

В работе использовали трисульфат неомицина В (“Huashu Pharmaceutical Corporation”, Китай), сульфаты амикацина (АМ, “Eczacibasi Ilac San ve Tic A.S.”, Турция), канамицина (КМ), сизомицина (СЗМ), гентамицина (ГМ), стрептомицина (СМ), рибостамицина (РС) и апрамицина (АП), трансферин человека (ТР), пероксидазу хрена (КФ 1.11.1.7) и *o*-фенилендиамин, (“Sigma”, США), неамин (неомицин А — НА, “European Pharmacoceia”), сухое молоко (70166, “Fluka”, Швейцария), нетилмицин (НТМ, “Schering-Plough Labo N.B.”, Бельгия), тобрамицин (ТМ, “Lilly France S.A.”, Франция), антисыворотку осла к иммуноглобулинам кролика, бычий сывороточный альбумин (БСА) и желатин (Жел) отечественного производства. Объектом исследования служило молоко (106 образцов) из розничной торговой сети с различным содержанием жира (0.1–35%), произведенное на территории европейской части России и ближайшего зарубежья в 2008–2009 гг.

**Синтез конъюгированных антигенов.** ТР(ну)-НМ × 30, ТР(ну)-НМ × 100. К 3 мл водного раствора, содержащего 20 мг ТР (2 × 130 нмоль), добавляли 17 мг кристаллического периодата натрия (ПИ) и перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин. Окисленный гликопротеин диализовали против 10 мМ ацетатного буфера (рН 5.0) в течение 1 сут при 4°C. Объем полученного диализата делили на 2 равные порции, к которым добавляли 3.6 и 11.8 мг НМ в 1.2 мл 0.05 М карбонат-бикарбонатного буфера, рН 9.5 (КББ), что соответствовало 30- и 100-кратному мольному избытку, и инкубировали при перемешивании в течение 2 ч. Затем в реакционные смеси вносили по 100 мкл раствора боргидрида натрия (2 мг/мл) и перемешивали еще 2 ч. Полученные конъюгаты подвергали исчерпывающему диализу против 0.15 М фосфатного буфера, рН 7.0.

**Поли-НМ-0.3(га), Поли-НМ-1(га), Поли-НМ-3(га).** К трем порциям по 36.4 мг НМ (40 мкмоль) в 1 мл 0.015 М КББ добавляли 53, 160 и 480 мкл 2.5%-ного раствора глутарового альдегида (ГА, 0.3-, 1- и 3-кратные мольные избытки по отношению к НМ) и перемешивали в течение ночи при 4°C. В реакционные смеси, приобретшие желтоватый оттенок, интенсивность которого была пропорциональна количеству внесенного ГА, добавляли 50, 100 и 300 мкл NaBH<sub>4</sub> (4 мг/мл) и перемешивали в течение 2 ч. Не вступившие в реакцию ингредиенты были удалены в результате исчерпывающего диализа при порозности мембраны порядка 12000 Да (“Sigma”,

США). Полученный полимерный антиген разбавляли вдвое глицерином и хранили при –15°C.

**Жел-НМ × 5(га), Жел-НМ × 15(га), Жел-НМ × 25(га).** К водным растворам, содержащим по 4 мг Жел (0.025 мкмоль) в 1 мл, добавляли 22.7, 68.2 и 113.6 мкл (125, 375 и 625 нмоль) раствора НМ (5 мг/мл) 5-, 15- и 25-кратные мольные избытки, соответственно и по 30 мкл свежеприготовленного 2.5%-ного раствора ГА. Через 2 ч перемешивания при комнатной температуре в каждую реакционную смесь вносили по 100 мкл боргидрида натрия в концентрации 1 мг/мл, перемешивали еще 2 ч и подвергали диализу в течение 2 сут против 5 л дистиллированной воды.

**Жел-РС × 30(ну), Жел-РС × 100(ну).** К водному раствору РС, содержащему 4.2 мг в 0.5 мл (9.25 мкмоль), добавляли 4.1 мг NaIO<sub>4</sub> (19 мкмоль) в 1 мл воды и перемешивали 15 мин при комнатной температуре. К водным растворам, содержащим по 4 мг Жел (0.025 мкмоль) в 1 мл, добавляли 30- и 100-кратный мольные избытки окисленного РС (0.75 и 2.5 мкмоль) — 120 и 300 мкл соответственно. Через 1 ч перемешивания при комнатной температуре в каждую реакционную смесь вносили по 100 мкл боргидрида натрия в концентрации 2 мг/мл, и спустя 1 ч диализовали. В диализаты добавляли равный объем глицерина и сохраняли при –15°C в виде растворов с концентрацией 1 мг/мл (по белку).

**Иммунизация и получение антисыворотки.** Кроликам темной масти массой 2.5–3 кг инъецировали подкожно в 10–15 точек области спины эмульгированный в полном адьюванте Фрейнда ТР-НМ × 100(пи) в дозе 100 мкг. Повторные введения иммуногена осуществляли в той же дозе водными растворами. Через 7 сут после каждой повторной инъекции у животных из краевой вены уха отбирали кровь, отделяли сыворотку, добавляли равный объем глицерина и хранили до использования при –15°C.

**Изучение иммунного ответа и оптимизация ИФА.** Развитие иммунного ответа у животного оценивали по взаимодействию антисывороток в непрямом ИФА с адсорбированными на 96-луночных планшетах (“Costar”, США) конъюгированными антигенами. Для этого ячейки заполняли 0.2 мл раствора конъюгата в диапазоне концентраций 0.05–1.5 мкг/мл (1/1000–1/30000 для Поли-НМ(га)) в КББ и инкубировали 16 ч при 4°C. Затем планшеты отмывали 4–5 раз 0.15 М фосфатно-солевым буфером, рН 7.5, содержащим твин 20 (ФСБ-т), и в ячейки вносили по 0.1 мл ФСБ-т и антисыворотку в серийных разведениях в том же буфере с 1% БСА. Через 1 ч инкубации ячейки планшетов вновь отмывали и заполняли 0.2 мл раствора конъюгата антител к IgG кролика с пероксидазой хрена. После 1 ч инкубации и отмывки в ячейки помещали по 0.2 мл субстратного раствора, содержащего 0.4 мг/мл *o*-фенилендиамина и 0.005% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.15 М цитрат-фосфатном буфере, рН 5.0. Через

45 мин ферментативную реакцию останавливали добавлением 50 мкл 4 М серной кислоты и проводили фотометрию при 492 нм.

Соотношения концентраций иммунореагентов, полученные в результате такого “шахматного” титрования и обеспечивающие оптическую плотность реакции в диапазоне от 0.8 до 1.2, использовали в конкурентном анализе.

**Непрямой конкурентный ИФА.** Условия проведения анализа не отличались от описания, приведенного выше. Для иммобилизации на твердой фазе использовали растворы конъюгированных антигенов в подобранных концентрациях. После инкубации и отмывки соответствующие разведения антисыворотки в ФСБ-т, содержащем 1% БСА, вносили в лунки по 0.1 мл вместе с растворами антибиотика (1000–0.1 и 0 нг/мл) в ФСБ-т или образца, разведенного в том же буфере. Завершающие этапы реакции проводили согласно описанной выше процедуре.

Уровень связывания антител в лунках с нулевой концентрацией НМ принимали за 100% и по отношению к этому показателю вычисляли процент связывания антител для каждой концентрации вещества.

Из серии твердофазных антигенов с различной гаптенной нагрузкой для дальнейших исследований отбирали вариант, обеспечивающий наибольшую чувствительность определения НМ.

Перекрестное взаимодействие антител определяли как процентное отношение концентрации НМ к соответствующим концентрациям РС, НА, ГМ, СЗМ, ТМ, КМ, СМ и АП, вызывающим половинное ингибирование связывания ( $IC_{50}$ ). Графическую и статистическую обработку результатов осуществляли по программе Origin 8.0.

**Подготовка образцов и тест на извлечение.** В связи тем, что ингредиенты, входящие в состав молока, оказывали довольно заметно влияние на взаимодействие антител с антигеном, выражающееся в снижении уровня сигнала, так называемый “матрикс-эффект”, для имитации подобных помех нами было использовано сухое молоко. Раствор этого реактива, приготовленный в соответствии с рекомендациями производителя и соответствующий по степени матричного эффекта нормальному молоку, служил средой для приготовления калибровочных растворов.

В шесть различных НМ-негативных по предварительному тестированию образцов молока с 1.5–10%-ным содержанием жира вносили НМ в конечной концентрации 10000, 1000 и 100 нг/мл. При пробоподготовке образцы разводили в 100 раз ФСБ-т, и соответствие содержания антибиотика уровню в 100, 10 и 1 нг/мл определяли с помощью ИФА. По отношению усредненного для различных образцов значения к внесенной концентрации определяли степень извлечения.

Для выяснения влияния температурного воздействия при стерилизации или пастеризации на содержание НМ в молоке ряд образцов с известным содержанием препарата подвергали 5-минутной инкубации в кипящей водяной бане и последующему иммуноферментному тестированию.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Отсутствие характерной картины в УФ-спектре НМ не позволило оценить синтезированный иммуноген спектрофотометрически. Убедительных различий в электрофоретической подвижности между ТР(пи)-НМ  $\times$  30 и ТР(пи)-НМ  $\times$  100, свидетельствующих об увеличении плотности гаптена на носителе получено не было (данные не приведены). Тем не менее, для иммунизации кроликов использовали иммуноген с большим соотношением гаптен/носитель при синтезе – ТР(пи)-НМ  $\times$  100. Периодатный метод, используемый нами для приготовления иммуногена, альтернативный, описанным другими авторами (глутаральдегидному и карбодимидной конденсации) [4, 6], также основывался на реакции между белком и шестью возможными аминогруппами НМ или четырьмя в случае НА. Поэтому расположение гаптена на носителе, как и в указанных работах, могло быть мультивариантным.

Наличие более, чем одной  $NH_2$ -группы в молекуле НМ позволило нам рассмотреть возможность полимеризации молекулы посредством перекрестного сшивания диальдегидом. Причем от соотношения ГА : НМ зависел вид полимера – линейный или разветвленный. Взаимодействие антител с Поли-НМ-0.3(га) было заметно слабее, чем с двумя другими полимерными антигенами. По-видимому, данный препарат имел недостаточную степень полимеризации, и часть олигомеров была элиминирована в ходе диализа. Трехкратный избыток ГА по отношению к НМ в случае Поли-НМ-3(га) должен был приводить к ветвлению полимера и соответственно к большему экранированию детерминант молекулы антибиотика. Однако это незначительно повлияло на эффективность его связывания с антителами. Наилучшими же характеристиками анализа обладал вариант с иммобилизованным Поли-НМ-1(га). Эквимолярное соотношение кросслинкера и НМ является условием для образования скорее линейного полимера, а степень полимеризации ( $n$ ) могла быть представлена формулой:

$$n \geq 12000 \text{ Да/Мм[НМ-ГА]},$$

где 12000 Да – порозность диализной мембраны; Мм[НМ-ГА] – молекулярная масса пентанала НМ – 699. Таким образом, расчетная степень полимеризации –  $n \geq 17$ .

В результате подбора оптимальных концентраций иммунореагентов и конкурентных исследований из серии остальных конъюгатов с различным соотношением реагентов при синтезе были отобра-

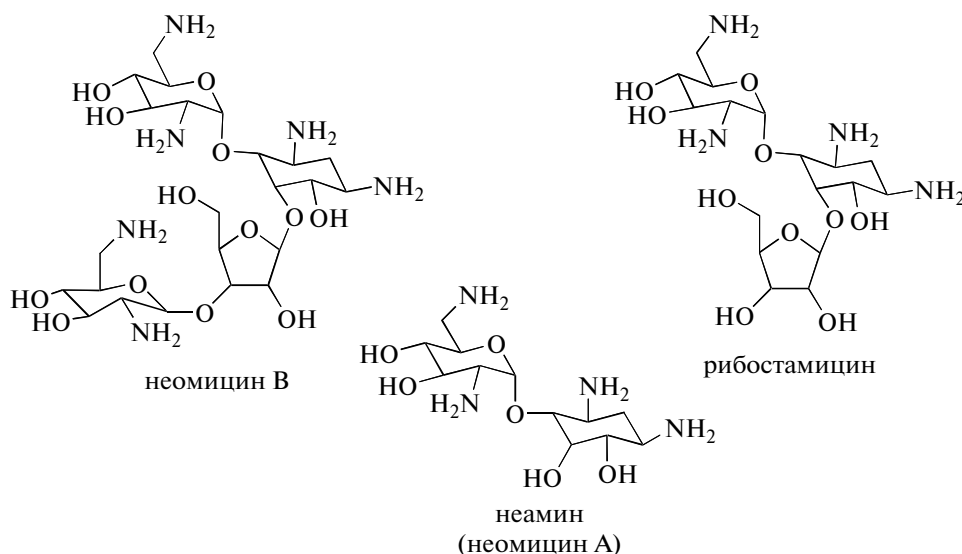


Рис. 1. Химическая структура аминогликозидов группы НМ.

ны твердофазные антигены, обеспечивающие более чувствительное определение НМ. Таковыми оказались Жел-НМ  $\times$  5(га) с наименьшей гаптенной нагрузкой и Жел-РС  $\times$  100(пи). Особенность последнего конъюгата в отличие от предыдущих заключается в гетерологичности гаптена, имеющего три из четырех гликозидных остатков НМ (рис. 1), и строго определенной его ориентации на носителе. Воздействие  $\text{NaIO}_4$  на РС приводило к окислению vicинально расположенных гидроксидов на рибозильном фрагменте молекулы и их последующему взаимодействию с аминогруппами белка.

Анализ динамики иммунного ответа показал, что к третьему взятию крови титр сыворотки возрос, и она могла обеспечивать достаточно высокий уровень чувствительности анализа. Так, рабочее разведение антисыворотки при использовании (га)-конъюгатов соответствовало 1/3000–1/7500. Использование Жел-РС  $\times$  100(пи) требовало более высокой концентрации антител – 1/300–1/500.

Калибровочные кривые иммуноферментных систем анализа, сконструированных на основе подобранных пар иммунореагентов, представлены на рис. 2. Как показано в работе [4], существенное влияние на чувствительность анализа может оказывать структурная гетерологичность (вид гаптена и способ его конъюгирования с носителем) иммобилизованного антигена по сравнению с иммуногеном. Настоящее исследование, использующее альтернативные подходы к созданию иммунореагентов, не является исключением из этого наблюдения. Так предел детекции НМ для варианта Жел-РС  $\times$  100(пи) – ИФА составил 0.1 нг/мл, а рабочий диа-

пазон – 0.1–100 нг/мл, на порядок меньшую чувствительность обеспечивал полимерный антиген (1–1000 нг/мл), а иммобилизованный Жел-НМ  $\times$  5(га) позволял выявлять до 0.01 нг/мл при диапазоне 0.01–10 нг/мл.

Перекрестное взаимодействие различных аминогликозидов с полученными антителами оценивалось по отношению концентраций половинного ингибирования связывания –  $IC_{50}$  (НМ)/ $IC_{50}$  (аминогликозид)  $\times$  100%. В таблице приведены значения, отражающие конкурентоспособность этих препаратов в условиях рассмотренных ИФА-вариантов и свидетельствующие об избирательности анализа в отношении НМ.

Слабое распознавание НА и РС, аналогов, являющихся фрагментами молекулы НМ, в Поли-НМ-1(га)-ИФА и Жел-НМ  $\times$  5(га)-ИФА было, вероятно, следствием блокирования аминогрупп (четырех из шести) неаминовой части НМ в составе иммуногена в результате конъюгирования. Таким образом, основная часть пула антител сыворотки вероятно направлена к фрагменту НМ, отсутствующему у НА и у РС. Использование же твердой фазы с иммобилизованным Жел-РС  $\times$  100(пи), позволило, благодаря определенной ориентации гаптена на носителе, задействовать в реакции только часть антител из пула, которые направлены к фрагменту молекулы, общему для НА, РС и НМ. При этом значительно возросла конкурентоспособность этих соединений, которая достигла 36.2% для НА и 74.1% для РС. По сравнению с двумя предыдущими вариантами ИФА также несколько увеличилось перекрестное взаимодействие и других 2-дезоксистрептаминовых

аминогликозидов – КМ, ТМ и ГМ, СЗМ, однако, его уровень оставался по-прежнему незначительным (не более 0.4%). Таким образом, количественное определение НМ во всех рассмотренных системах анализа было селективным и не подвержено помехам со стороны других используемых в ветеринарной практике аминогликозидных препаратов ГМ, КМ, СМ и АП, активность которых по сравнению с НМ была слабее более, чем в 100 раз. Подобная строгая специфичность антител, т.е. отсутствие перекрестных взаимодействий со структурными аналогами, отмечалась и в других работах [4, 5] и объясняется особенностями дизайна иммуногена, при котором общие для некоторых аминогликозидов детерминанты оказывались экранированными.

В связи с тем, что МДУ НМ в молоке достаточно высок (1500 мкг/кг), а разработанные нами системы позволяли выявлять до 0.01–1 нг/мл, для удобства тестирования образцов молока во всех последующих экспериментах мы использовали менее чувствительный вариант Поли-НМ-1(га)-ИФА. При этом образцы разводили в 100 раз ФСБ-т буфером, при таком разведении МДУ приходился на середину калибровочной кривой (15 нг/мл) и соответствовал 50%-ному связыванию (рис. 2). Таким образом, при данных условиях степень контаминации молока можно было регистрировать в широком диапазоне, как на порядок выше, так и ниже установленного максимального значения. Другие же, более чувствительные варианты могут быть полезными для анализа объектов с ярко выраженным матрикс-эффектом, устранение которого возможно при дополнительном разведении образца.

Тестирование проб с искусственным внесением антибиотика проводилось на образцах с нулевым содержанием НМ по данным предварительной проверки. Кроме того, оценивали необходимость обезжиривания молока как этапа пробоподготовки в экспериментах на молоке 1.5-, 2.5-, 3.2-, 4.0- и 10%-ной жирности. При иммуноферментном те-

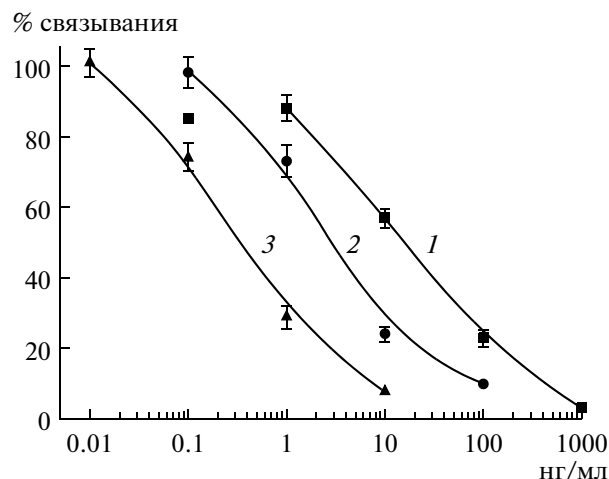


Рис. 2. Калибровочные кривые определения НМ в иммуноферментных системах на основе антител к ТР(пи)-НМ и различных иммобилизованных конъюгатов: 1 – Поли-НМ(га), 2 – Жел-РС(пи), 3 – Жел-НМ(га). Каждая точка представляет среднее значение (n = 3), величина ошибки соответствует стандартному отклонению.

стировании указанных проб молока (n = 6), содержащих 10000, 1000 и 100 нг/мл НМ, существенных различий между образцами с разным содержанием жира выявлено не было. Таким образом, без специальной пробоподготовки при 100-кратном разведении молока независимо от степени его жирности достигнуто 111.7%-ное извлечение анализа при общем диапазоне значений 84–125.2%.

Проверка термостабильности НМ была предпринята из-за использования в исследовании не сырого молока, а прошедшего пастеризацию или стерилизацию. Термическое воздействие в виде 5-минутной инкубации в кипящей водяной бане не отразилось на уровне выявления препарата, то есть иммунохимическая активность НМ не претерпела

Перекрестное взаимодействие антител в различных вариантах ИФА

Иммобилизованный антиген	IC <sub>50</sub> , нг/мл	Относительная перекрестная активность, %								
		НМ	НА	РС	ГМ	СЗМ	ТМ	КМ	СМ	АП
Поли-НМ-1(га)	15.4	100	1.3	3.6	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4	<0.4
Жел-РС × 100(пи)	2.9	100	36.2	74.1	0.1	0.2	0.3	0.4	<0.07	<0.07
Жел-НМ × 5(га)	0.3	100	0.4	0.2	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02

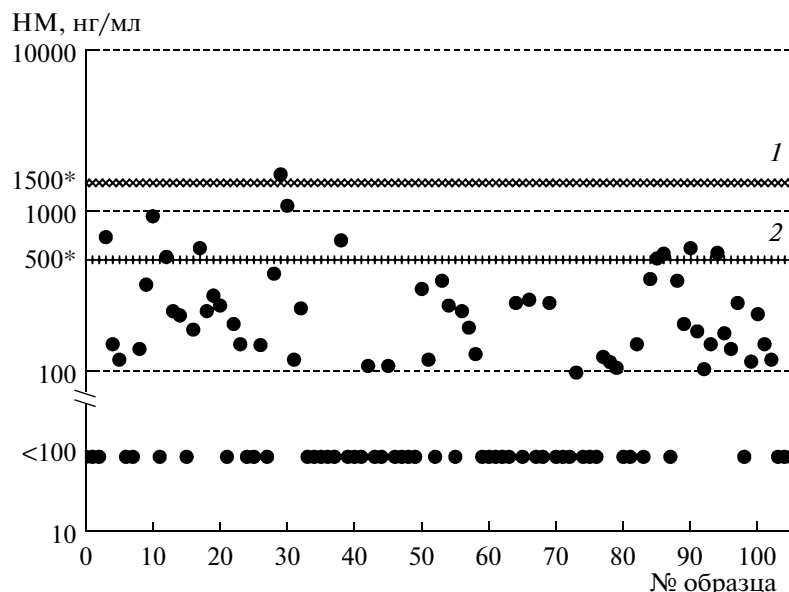


Рис. 3. Содержание НМ в образцах молока по результатам ИФА: 1 – МДУ НМ в молоке, регламентированный в странах ЕС (1500 мкг/кг); 2 – МДУ НМ в молоке, рекомендованный экспертами ФАО/ВОЗ (500 мкг/кг).

изменений. Следовательно, деградации антибиотика в ходе обработки сырого молока не происходило, и проведение иммунохимического определения НМ в молоке осуществимо как до, так и после термообработки.

Значительная выборка образцов ( $n = 106$ ), которая представлена самым разнообразным молоком как по степени содержания жира, термической обработке и другим пищевым критериям, так и по срокам и месту производства, явилась полноценным реальным объектом для оценки актуальности создания теста и проверки его аналитических характеристик. Использование анализа позволило обнаружить НМ более чем в половине образцов (57/106) в концентрациях выше 100 нг/мл (рис. 3). При этом уровень контаминации НМ за исключением единственной пробы (1690 нг/мл) был ниже МДУ, установленного для стран ЕС (1500 мкг/кг). Однако, превышение рекомендуемого ВОЗ порога (500 мкг/кг) [3] отмечалось в 10% случаев (11/106). Немаловажным преимуществом разработанного теста является возможность анализировать подпороговое содержание препарата. Так, в 46 пробах из общей выборки уровень НМ (100–500 нг/мл) оказался ниже чувствительности микробиологического теста.

Таким образом, на основе антител, специфичных к НМ, и ряда антигенов, адсорбированных на полистироловых планшетах, были разработаны иммуноферментные тест-системы для количественного определения антибиотика. Благодаря значительному запасу чувствительности и пределу детекции (до 0.01 нг/мл), сравнимому и даже пре-

восходящему некоторые описанные разработки [4–6] и коммерческие тест-системы [7; [www.biokit.com](http://www.biokit.com)], без специальной пробоподготовки при 100-кратном разведении молока максимально допустимый уровень НМ мог выявляться даже в наименее чувствительном варианте. Исследование контаминации молока этим аминогликозидом с помощью разработанного теста позволило получить первые результаты, которые требуют обратить более пристальное внимание к этой проблеме и могут служить ориентиром для рассмотрения вопроса о введении регламентации НМ в РФ, а предложенный анализ – инструментом для проведения подобных измерений.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ковалёв В.Ф., Волков И.Б., Виолин Б.В. Антибиотики, сульфаниламиды и нитрофураны в ветеринарии. М.: Агропромиздат, 1988. 223 с.
2. Council Regulation (ЕЕС) No. 2377/90 // Official J. European Union 1990. L 224. P. 26–27.
3. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. М.: ФГУП “Интер СЭН”, 2002. 168 с.
4. Chen Y., Shang Y., Wu X., Qi Y., Xiao X. // Food Agric. Immunol. 2007. V. 18. № 2. P. 117–128.
5. Jin Y., Jang J.W., Lee M.H., Han C.H. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 364. № 1–2. P. 260–266.
6. Loomans E.M.G., van Wiltenburg J., Koets M., van Amerongen A. // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. № 3. P. 587–593.
7. Diana F., Paleologo M., Persic L. // Food Addit. Contam. 2007. V. 24. № 12. P. 1345–1352.

## Development and Application of Indirect Competitive Enzyme Immunoassay for Detection of Neomycin in Milk

M. A. Burkin and I. A. Gal'vidis

*Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 105064 Russia*  
*e-mail: burma68@yandex.ru*

Received February 9, 2010

**Abstract**—As a result of immunization of rabbits with neomycin B (NM) conjugated to periodate-oxidized transferrin, polyclonal antibodies were generated and used to develop an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of NM. Several heterologous conjugates, namely, glutaraldehyde (GA)-polymerized NM, gelatin–ribostamycin (sp), and gelatin–NM (ga) were used as coating antigens in different ELISA variants for quantification of NM in milk. These variants were characterized by different dynamic ranges and detection limits of 1.0, 0.1, and 0.01 ng/ml, respectively. Maximum residue level (MRL) of this antibiotic in milk accepted in the EU can be detected without any special pretreatment at a 100-fold sample dilution in the least sensitive assay variant. The mean recovery rate from NM-spiked milk containing 1.5–10% fat was 111.7% and ranged from 84 to 125.2%. We found that 57 of 106 tested milk samples contained NM at concentrations higher than 100 ng/ml. In ten percent of cases (11/106), the residual level of this antibiotic was greater than 500 ng/ml. In one case, the MRL was exceeded (1690 ng/ml). The assay developed in this study is specific shows no cross-reactivity with other veterinary aminoglycosides, has a good sensitivity reserve, and can serve as an effective tool to monitor the NM content in milk stuff.