

УДК 615.074

РАЗРАБОТКА ИММУНОАНАЛИЗА ПОЛИМИКСИНОВ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ И ЛЕКАРСТВЕННОГО МОНИТОРИНГА

И.А. Гальвидис¹, К.М. Буркин^{1,2}, Ю.А. Суровой^{1,2}, М.А. Буркин¹¹ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия² МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. Полимиксины – декапептидные антибиотики, по механизму антибактериальной активности относятся к мембранным катионным поверхностно-активным соединениям, способны связываться с липидом А – частью липополисахаридов грамотрицательных микроорганизмов, вызывать нарушение проницаемости клеточной стенки и гибель возбудителя. Практически значимые полимиксин В (ПМ) и колистин (КОЛ) структурно схожи (Рис. 1), обладают сходным антимикробным действием и механизмом перекрестной резистентности. В настоящее время эти антибиотики являются препаратами «последнего рубежа» – для терапии септических состояний, вызванных устойчивыми грамотрицательными микроорганизмами, особенно *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* [1]. ПМ является активной формой антибиотика, в отличие от КОЛ, который вводится пациентам в виде пролекарства – КОЛ метансульфоната. Последний гидролизуется *in vivo*, приобретая антибактериальную активность. Учитывая узкий терапевтический диапазон и возможность нейро- и нефротоксических проявлений [2], создание простого и быстрого метода для лекарственного мониторинга urgentных пациентов крайне актуально.

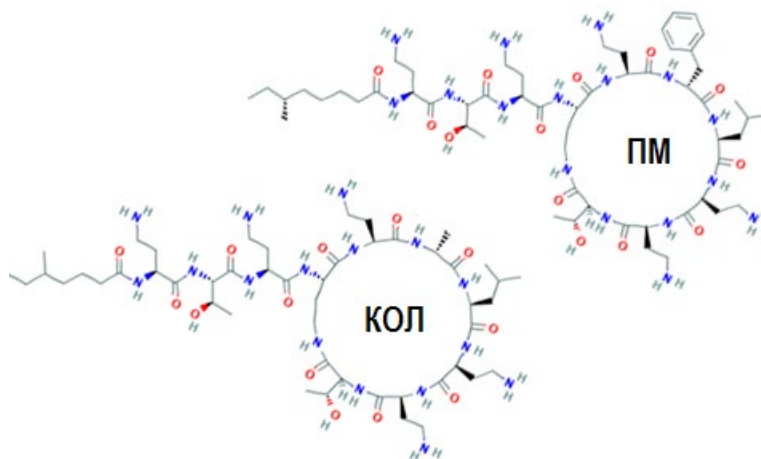


Рисунок 1. Структурные формулы полимиксина В (ПМ) и колистина (КОЛ)

Кроме того, КОЛ используется также для профилактики и лечения инфекций сельскохозяйственных животных и птиц. В качестве мер по борьбе с развитием и распространением устойчивой к антибиотикам патогенной микрофлоры было запрещено использование КОЛ в качестве стимулятора роста, и установлено максимально допустимое его содержание (МДУ) в продуктах животного происхождения в РФ и странах ЕС. Созданию быстрых скрининговых тестов на основе иммуноанализа полимиксинов посвящено крайне ограниченное число работ, а представленные в них методы определения антибиотика характеризовались относительно невысокой чувствительностью с пределом определения 9–30 нг/мл [3, 4].

Настоящая работа посвящена созданию конкурентного иммуоферментного анализа (ИФА), пригодного для количественного определения КОЛ в яйцах и молочных продуктах с МДУ 50 мкг/кг, а также для измерения полимиксинов в сыворотке человека с целью лекарственного мониторинга.

Материалы и методы. Реагенты. ПМ и КОЛ приобретены в AppliChem (Германия). В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), полный адъювант Фрейнда, 1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (ЭДК), периодат натрия и боргидрид натрия (Sigma-Aldrich, США), желатин (ЖЕЛ) (Bio-Rad, США), фосфатно-солевой буфер с 0.05 % твин 20 (ФСБ-Т) и двухкомпонентный раствор субстрата тетраметилбензидаина (ТМБ) Биосервис (Россия), козы антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (АК-ПХ) (Россия).

Образцы молока и яиц были приобретены в торговых точках г. Москвы. Сыворотки крови здоровых доноров и реанимационных пациентов с септической пневмонией были получены в клинической больнице МЕДСИ № 1 г. Москвы.

Приготовление конъюгатов. Для иммунизации животных был приготовлен конъюгат на основе ПМ и БСА в качестве белкового носителя. Активацию карбоксильных групп белка осуществляли ЭДК, которые взаимодействовали с аминами ПМ. Непрореагировавшие ингредиенты удаляли посредством диализа.

Для адсорбции ПМ на 96-луночных планшетах синтезировали конъюгированные антигены на основе ЖЕЛ в качестве носителя. ЖЕЛ окисляли периодатом натрия, диализовали в течение ночи против воды при 4 °С и смешивали с 10-кратным мольным эквивалентом ПМ. Таким образом, ЖЕЛ-ПМ синтезировали путем восстановительного аминирования периодат-окисленного гликопротеина. ЖЕЛ-КОЛ был получен в процессе конъюгации с использованием глутарового альдегида в качестве сшивающего агента. Для стабилизации в растворы образованных конъюгатов добавляли боргидрид натрия, а спустя 1 ч инкубации диализовали против воды в течение 2 суток.

Иммунизация и получение антител. Кроликам подкожно в несколько точек на спине инъецировали 100 мкг БСА-ПМ, эмульгированного в полном адъюванте Фрейнда. Последующие иммунизации теми же дозами осуществляли с месячными интервалами. Иммуноген инъецировали в неполном адъюванте Фрейнда. Антисыворотки, взятые через неделю после бустерных иммунизаций, сравнивали по специфической активности и чувствительности. IgG фракции из наиболее активных препаратов использовали в ИФА в качестве антител.

Процедура ИФА. Конкурентный анализ проводился по классической методике. ЖЕЛ-конъюгаты наносили на полистироловые 96-луночные планшеты Costar и оставляли на ночь при 4° С. Неадсорбированный конъюгат отмывали ФСБ-Т. Последующий конкурентный этап анализа включал взаимодействие с иммобилизованным антигеном рабочего раствора антител в присутствии стандартных растворов антигенов или тестируемого образца. После отмывки связанные с иммобилизованным антигеном антитела детектировали с помощью АК-ПХ (1 ч, 37 °С) и ТМБ-субстратной смесью. Окрашенный продукт, образовавшийся в результате ферментативной реакции, регистрировали при 450 нм на планшетном ридере LisaScan (Erba, Чехия).

Зависимость относительного связывания антител (B/B_0) от концентраций аналита выражали в виде калибровочных кривых. Перекрестную реактивность для каждого представителя рассчитывали, как отношение концентраций 50 %-ного ингибирования IC_{50} ПМ/ IC_{50} аналога. Рабочим диапазоном анализа считали диапазон концентраций IC_{20} - IC_{80} , а предел обнаружения (ПО) был рассчитан как $B_0 - 3 \times SD$.

Результаты и обсуждение. Полимиксины являются низкомолекулярными соединениями, неспособными вызывать иммунный ответ. Для выработки антител ПМ конъюгировали с макромолекулярным носителем. У БСА были активированы карбоксильные группы, которые непосредственно участвовали в связывании со стерически доступными аминок группами ПМ. Полученные в результате иммунизации кроликов поликлональные антитела использовали для создания конкурентного формата ИФА. В качестве твердофазных антигенов синтезировали гетерологичные конъюгаты ПМ и КОЛ с желатиной.

Для измерения терапевтического диапазона концентраций ПМ использовали сорбированный конъюгат ЖЕЛ-КОЛ. Рабочий диапазон анализа составил 4,0 – 212 нг/мл, что позволило анализировать образцы сыворотки человека после их 100-кратного разведения буфером. Чувствительность ИФА, выраженная в концентрации IC_{50} , и предел обнаружения ПМ составили 30,5 и 1,0 нг/мл, соответственно (Рис. 2А). Специфичность анализа распространялась и на КОЛ (95 %), который также мог быть адекватно количественно определен в образцах сыворотки при использовании соответствующей калибровки. С помощью разработанного метода было проведено пробное фармакокинетическое исследование пациентов с грамотрицательным сепсисом. Установленные фармакокинетические профили ПМ для ряда пациентов выявили превышение рекомендуемого суточного уровня этого антибиотика ($AUC_{24} > 100$ мг*ч/л), что обуславливает необходимость индивидуального мониторинга для коррекции дозирования препарата. Разработанный метод пригоден для контроля антибиотикотерапии и в дальнейшем будет использоваться для моделирования фармакокинетики ПМ у разных групп тяжелобольных пациентов [5].

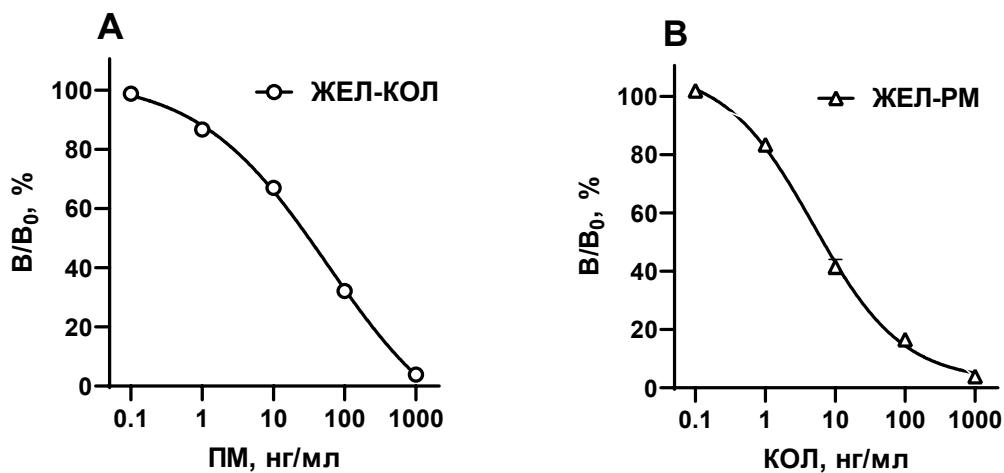


Рисунок 2. Калибровочные кривые ИФА количественного определения полимиксина В в сыворотках больных (А) и колистина (В) для его обнаружения в продуктах питания

Для обнаружения остаточного КОЛ в продуктах животноводства в качестве иммобилизованного антигена использовали гетерологичный конъюгат ЖЕЛ-ПМ, что обеспечило более чувствительное определение аналита ($IC_{50} = 5.7$ нг/мл) и предел определения 0.4 нг/мл (Рис. 2В). Существенное влияние матрикса образцов молока на уровень взаимодействия антител с антигеном было устранено с помощью имитатора матрикса, сухое молоко. Матрикс-эффект разведенного сухого молока соответствовал разведению реальных образцов коровьего молока. Раствор этого реактива использовали для приготовления калибровочных кривых. Благодаря высокой чувствительности анализа содержание КОЛ в молоке и яйцах можно было определять без специальной и трудоемкой предварительной пробоподготовки – посредством простого 10- и 50-кратного разведения соответствующих образцов ФСБ-Т буфером (табл. 1). Разработанная система анализа позволяла регистрировать МДУ КОЛ в молочных продуктах и яйцах, а извлечение аналита составило 89–104 % [6].

Таблица 1. Выявление колистина в образцах молока и яиц при пороговом содержании антибиотика

объекты	Фактор разведения	Концентрация КОЛ, нг/мл		Обнаружено (%)
		введено	найденно	
молоко	10	100	100 ± 8,2*	100 ± 8,2*
		50	47 ± 3,5	94,7 ± 7
		25	26 ± 4	104 ± 12
яйца	50	600	580 ± 77,9	96,7 ± 13
		300	271 ± 27,5	90,6 ± 9,2
		150	133 ± 2,9	88,9 ± 1,9

*Стандартное отклонение ($n = 4$)

Закключение. Получены иммунореагенты и разработана ИФА-система для группового выявления полимиксина В и колистина. Благодаря их близкому распознаванию, 100 % и 95 % соответственно, оба этих циклических пептида могли быть выявлены в биологических жидкостях и других объектах анализа. Подобраны параметры анализа для определения терапевтических концентраций ПМ в сыворотке крови больных. На ограниченном контингенте больных с септическим шоком проведено предварительное фармакокинетическое исследование. Показатели экспозиции ПМ варьировали у пациентов в зависимости от особенностей их состояния и терапии, в связи с чем, проведение терапевтического лекарственного мониторинга ПМ у тяжелых пациентов реанимации с помощью предложенного метода целесообразно для поддержания эффективного уровня лекарственного препарата без токсических проявлений. Дальнейшее исследование фармакокинетики ПМ у разных категорий пациентов позволит персонифицировать и оптимизировать антибиотикотерапию.

Для обеспечения контроля безопасности продуктов питания разработанный метод адаптирован для измерения КОЛ в молоке и куриных яйцах. Благодаря высокой чувствительности теста выявление пороговых уровней этого антибиотика в продуктах питания могло осуществляться без специальной обработки, после простого разведения образцов.

Литература

1. Velkov T, Roberts KD, Nation RL, Thompson PE, Li J. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol.* 2013, 8, 711–24.
2. Tsuji BT, Pogue JM, Zavascki AP, Paul M, Daikos GL, Forrest A, et al. International Consensus Guidelines for the Optimal Use of the Polymyxins: Endorsed by the American College of Clinical Pharmacy (ACCP), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Infectious Diseases Society of America (IDSA), International Society for Anti-infective Pharmacology (ISAP), Society of Critical Care Medicine (SCCM), and Society of Infectious Diseases Pharmacists (SIDP). *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy.* 2019, 39, 10–39.
3. Kitagawa, T., Ohtani, W., Maeno, Y., Fujiwara, K., & Kimura, Y. Sensitive enzyme immunoassay of colistin and its application to detect residual colistin in rainbow trout tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1985, 68(4), 661–664.
4. Suhren, G., & Knappstein, K. Detection of colistin in spiked and incurred milk samples by LC – and ELISA-technique. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529(1–2), 97–101.
5. Burkin Maksim A., Galvidis Inna A., Surovoy Yuri A., Plyushchenko Ivan V., Rodin Igor A., Tsarenko Sergei V. Development of ELISA formats for polymyxin B monitoring in serum of critically ill patients. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 204, 10 September 2021.
6. Galvidis Inna A., Eremin Sergei A., Burkin Maksim A. Development of indirect competitive enzyme-linked immunoassay of colistin for milk and egg analysis. *Food and Agricultural Immunology*. Volume 31, 2020 – Issue 1, 424–434.