

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 573.6.086; 577.18; 577.151.33; 612.017.1

© Коллектив авторов

ТВЕРДОФАЗНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ХЛОРАМФЕНИКОЛА В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

А.Ю.КОЛОСОВА, Ж.В.САМСОНОВА, А.Н.БЛИНЦОВ*, А.М.ЕГОРОВ

Кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы, факс (095)939-27-42;

*Кафедра физиологии растений биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова,
119899, Москва, Воробьевы горы, факс (095)939-43-09

Разработан и оптимизирован метод твердофазного иммуноферментного анализа для количественного определения хлорамфеникола в диапазоне концентраций 10-1000 нг/мл в сыворотке крови человека, разведенной в 100 раз. Изучено сорбционное поведение конъюгата хлорамфеникола с овальбумином на поверхности полистироловых планшетов, исследованы различные режимы проведения реакции конкуренции и подобраны условия анализа для определения антибиотика в сыворотке крови человека. Изучена специфичность и проверена стабильность аналитической системы. Предел обнаружения метода - 1 нг/мл. Время анализа - не более трех часов. Коэффициент вариации результатов анализа не превышает 12%.

Ключевые слова: антибиотикотерапия, лекарственный мониторинг, хлорамфеникол, иммуноферментный анализ

ВВЕДЕНИЕ. Хлорамфеникол (ХАФ) или левомецетин - антибиотик, широкого спектра действия, обладающий высокой клинической эффективностью в лечении ряда тяжелых инфекций. Терапевтический диапазон этого антибиотика достаточно узок и составляет 10-25 мкг/мл в сыворотке крови. При превышении концентрации 25 мкг/мл ХАФ оказывает токсическое действие (гематологическая токсичность) [1], что делает потенциально опасным его безконтрольное применение. В целях оптимизации терапии необходимо проведение клинического мониторинга антибиотика в связи с индивидуальными различиями в его фармакокинетике.

В настоящее время для определения ХАФ используют ряд методов. В их числе микробиологические методы, которые являются сравнительно простыми и дешевыми, однако, отличаются недостаточной специфичностью и воспроизводимостью результатов [2]. Хроматографические методы [3], в частности ВЭЖХ, позволяют определять отдельно как ХАФ, так и его метаболиты, но только в случае ограниченного объема анализов. Для скрининговых целей используются в основном методы иммунохимического анализа, обеспечивающие высокие чувствительность, специфичность и точность. Для определения ХАФ, в частности, применяются радиоиммунологический анализ (РИА) [4,5], методы, основанные на использовании различных стриповых тестов [6]. Кроме того, широкое распространение именно для целей лекарственного мониторинга приобрел поляризационный флуороиммуноанализ (ПФИА), на основе которого выпускают наборы реагентов и специализированные анализаторы (например, "Abbott", США) [7]. Применение методов РИА, однако,

ограничено в связи с необходимостью работы с радиоактивными изотопами, а для ПФИА требуется дорогостоящее оборудование. В связи с этим в настоящее время для осуществления лекарственного мониторинга и антибиотикотерапии предпочтение отдается методам твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) [8-10], которые являются высокочувствительными, специфичными, точными, относительно дешевыми, не требующими сложной пробоподготовки и инструментальной базы.

Целью настоящей работы является разработка метода анализа для количественного определения ХАФ в сыворотке крови человека. В основу метода был положен принцип твердофазного конкурентного ИФА [11]. На первом этапе происходит конкуренция свободного (определяемого) и предварительно иммобилизованного на твердой фазе антигена за центры связывания специфических антител. После отделения несвязавшихся реагентов количество антител, прореагировавших с иммобилизованным антигеном, определяют с помощью антивидовых антител, меченых пероксидазой хрена (Ат-ПХ). Количество определяемого антибиотика обратно пропорционально регистрируемой оптической плотности продукта ферментативной реакции.

МЕТОДИКА В работе использованы биохимические и химические реагенты фирмы "Sigma", серная кислота и неорганические соли марки о.с.ч. (Реахим, Россия). В работе использовали буферы: КБ - 0,01М Na-карбонатный буфер, ФБ - 0,01М К-фосфатный (рН, 7,4); ФБС - 0,01М К-фосфатный, содержащий 0,15М NaCl (рН, 7,4), ТФБ - ФБС, содержащий 0,1% Твин-20; АБ - 0,01М Na-ацетатный буфер рН 5,0, ЦБ - 0,1М Na-цитратныйбуфер (рН 5,0). Стандартные растворы левомицетина готовили путем разбавления раствора антибиотика в метаноле (1 мг/мл) до конечных концентраций 15; 30; 60; 125; 250; 500 нг/мл в ТФБ или растворе нормальной человеческой сыворотки в различных разведениях.

Кроличья антисыворотка против хлорамфеникола и конъюгат овальбумин-хлорамфеникол (ОВА-ХАФ) были любезно предоставлены нам кандидатом химических наук Ааком О.В. (ВНИТИАФ г.Санкт-Петербург).

Тестирование поликлональных антисывороток против хлорамфеникола. Титрование антисывороток последовательным двукратным разведением в ТФБ проводили на полистироловых планшетах ("Biohit", Финляндия) с предварительно сорбированным антигеном (100 мкл, 1 мкг/мл в КБ, 2 часа при 37°C). В качестве контроля использовали сыворотку неиммунизированного животного. После инкубации (37°C, 1 час) планшет промывали (4x300 мкл ФБ) и добавляли в лунки 100 мкл раствора Ат-ПХ в ТФБ (разведение 1:10000). После инкубации (37°C, 1 час) отмывали несвязавшиеся реагенты (4x300 мкл ТФБ) и добавляли по 100 мкл свежеприготовленного субстратного раствора (4 мг о-фенилендиамина и 4 мкл 30% H₂O₂ на 10 мл ЦБ). Через 5-7 мин. реакцию останавливали добавлением в лунки планшета по 50 мкл 4М H₂SO₄ и измеряли оптическую плотность при 490 нм на спектрофотометре для 96-ти луночных планшетов ("Molecular Devices", США).

Иммуноглобулиновую фракцию антисыворотки (IgG) выделяли двукратным осаждением насыщенным раствором сульфата аммония [11].

Проведение конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа. В каждую лунку полистиролового планшета вносили по 100 мкл раствора конъюгата ХАФ-ОВА в ФБ в концентрации 100 нг/мл. После инкубации (2 часа при 37°C) раствор удаляли и промывали лунки (4x300 мкл ФБ). Планшеты высушивали при комнатной температуре и хранили при 4°C. В лунки планшета с сорбированным антигеном вносили по 50 мкл стандартных растворов левомицетина и анализируемых образцов; и затем по 50 мкл раствора IgG-фракции антител против левомицетина в ТФБ в разведении 1/2000. После инкубации (1,5 часа при 37°C) раствор удаляли, промывали лунки ТФБ (4x300 мкл) и вносили по 100 мкл раствора Ат-ПХ в разведении 1/10000 в ТФБ. Дальнейшие стадии проводили как и при тестировании антител.

Специфичность анализа определяли, анализируя стандартные растворы близкородственных хлорамфениколу соединений и антибиотиков других групп. Процент перекрестного реагирования определяли по формуле: $(C_1/C_2) \cdot 100$, % где C_1 - концентрация хлорамфеникола, соответствующая 50%-му сигналу оптической плотности в отсутствие определяемого антигена, C_2 - концентрация перекрестнореагирующего вещества при тех же условиях.

Предел обнаружения определяли согласно рекомендациям IUPAC [12].

Тест на открытие (метод "введено-найдено"): готовили три стандартных раствора известной концентрации в нормальной человеческой сыворотке и анализировали. По результатам анализа рассчитывали процент открытия, используя отношение найденной концентрации к рассчитанной.

Тест на линейность: готовили четыре стандартных раствора антибиотика путем разбавления стандарта, содержащего 500 нг/мл в 2, 4, 8 и 16 раз и анализировали. По результатам анализа вычисляли процент открытия, используя отношение найденной концентрации к рассчитанной.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Первоочередными задачами в ходе разработки метода твердофазного ИФА является получение и изучение свойств иммуноспецифических реагентов. Поликлональные антисыворотки против ХАФ были протестированы и для дальнейших исследований была отобрана антисыворотка с наилучшими иммунохимическими характеристиками (50%-ый титр - 1/4000).

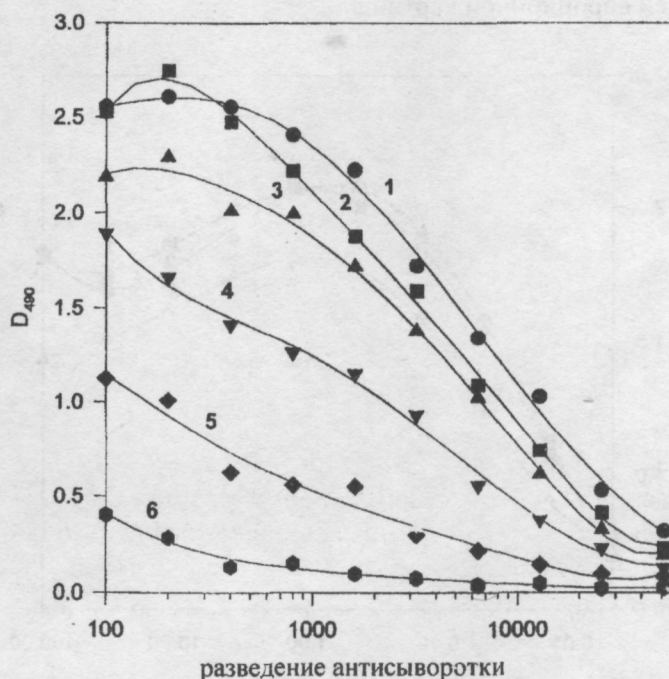


Рисунок 1.

Кривые титрования антисыворотки против ХАФ при различных концентрациях ОВА-ХАФ, сорбированного на твердой фазе: 1 - 450 нг/мл, 2 - 225 нг/мл, 3 - 112,5 нг/мл, 4 - 28 нг/мл, 5 - 7 нг/мл, 6 - ФБС (рН 7,4). По оси абсцисс - разведение антисыворотки, по оси ординат - оптическая плотность при 490 нм.

Разработка метода ИФА включала в себя несколько основных этапов. Одним из важнейших являлся подбор оптимальных концентраций реагентов и условий проведения анализа, которые позволяли бы достоверно определять концентрацию ХАФ в достаточно узком терапевтическом диапазоне. Для выбора оптимальных концентраций антител и

конъюгата ОВА-ХАФ использовали так называемое шахматное титрование этих реагентов в отсутствие определяемого антигена. На рис.1 приведены кривые титрования антисыворотки против ХАФ для различных концентраций антигена (конъюгат ОВА-ХАФ), сорбированного на твердой фазе. При выборе концентраций реагентов руководствовались тем принципом, что точка, соответствующая оптимальной для анализа концентрации реагентов, должна лежать на кривой титрования в диапазоне, близком к 50%-му связыванию антигена с антителами, так как в данном случае будет наблюдаться максимальная чувствительность анализа [13]. Помимо этого, значение оптической плотности должно лежать в пределах 1-1,5 оптических единиц. Таким образом, оптимальная концентрация конъюгата ОВА-ХАФ лежала в пределах 50-200 нг/мл, а оптимальное для анализа разведение антисыворотки - 1/1000-1/5000.

В ходе дальнейшей работы было изучено сорбционное поведение конъюгатов ОВА-ХАФ на поверхности полистироловых планшетов в буферных системах различной природы и pH и при различных температурных режимах. Максимальная сорбционная способность конъюгата была достигнута при использовании ФБС (pH 7,4) в диапазоне концентраций 0,5-1 мкг/мл (рис.2). Дальнейшее увеличение концентрации конъюгата ОВА-ХАФ привело к уменьшению оптической плотности, что, по-видимому, связано с образованием белкового полислия на поверхности полистироловых планшетов. Область максимального насыщения поверхности конъюгатом на кривой сорбции ОВА-ХАФ в КБ (pH 9,6) была незначительно смещена в диапазон больших концентраций белка. И лишь при использовании АБ (pH 5,0) наблюдалось значительное снижение сорбции конъюгата при сохранении общей сорбционной картины.

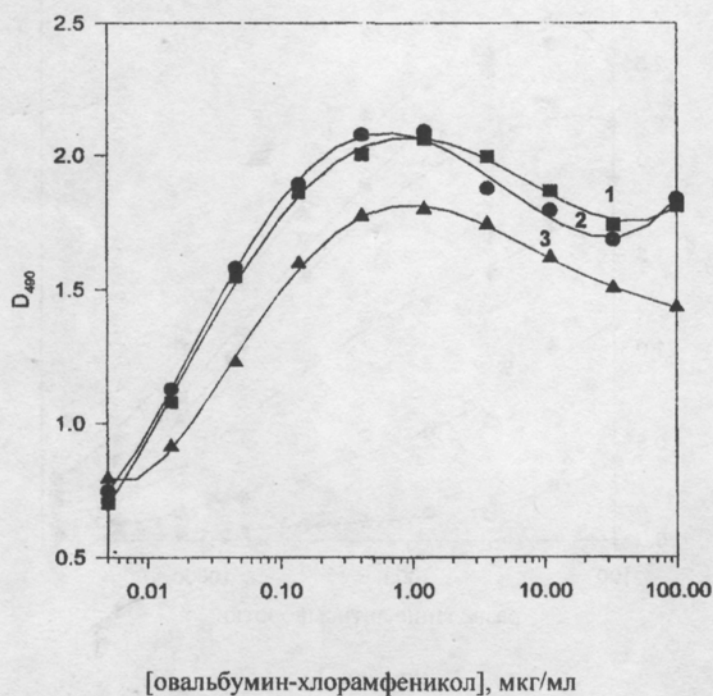


Рисунок 2.

Сорбция конъюгата ОВА-ХАФ на поверхности полистироловых планшетов при использовании буферов с различным pH. Условия сорбции: 37°C, 2 часа, 1 - ФБС pH 7,4, 2 - КБ pH 9,3, 3 - АБ pH 5,0. По оси абсцисс - концентрация конъюгата, мкг/мл, по оси ординат - оптическая плотность при 490 нм.

Режимы проведения сорбции конъюгата ОВА-ХАФ на полистироловых планшетах (2 часа при 37°C и 15 часов при 4°C) не оказывали влияние на сорбционное

поведение конъюгат. Только лишь во втором случае наблюдали незначительное уменьшение оптической плотности. Изучение калибровочных зависимостей, полученных при использовании данных буферных систем показало, что калибровочная кривая, характеризующуюся наибольшей чувствительностью в необходимом диапазоне концентраций ХАФ, была получена при применении ФБС (рН 7,4).

Для выбора оптимальной для анализа концентрации иммобилизованного на планшете антигена был получен ряд калибровочных кривых (рис.3). При последовательном увеличении концентрации антигена (ОВА-ХАФ) на твердой фазе от 25 до 500 нг/мл наклон калибровочной кривой также увеличивается, достигая максимума, приблизительно соответствующего области максимального насыщения на кривой сорбционной зависимости антигена (рис.2). При дальнейшем увеличении концентрации конъюгата ОВА-ХАФ наблюдается резкое уменьшение наклона калибровочной кривой вплоть до полного ее стирания (рис.3, кривые 5 и 6). Данные факты могут служить косвенным подтверждением образования полислоя конъюгата ОВА-ХАФ. Таким образом, для дальнейших исследований в качестве оптимального был выбран следующий режим сорбции конъюгата ОВА-ХАФ: 2 часа при 37°C, 100 нг/мл в ФБС (рН 7,4). Оптимальная концентрация IgG фракции антител в анализе была достигнута при их разведении 1/2000.

На следующем этапе работы было изучено влияние температуры и времени проведения стадии конкуренции на вид калибровочных кривых ИФА ХАФ. При

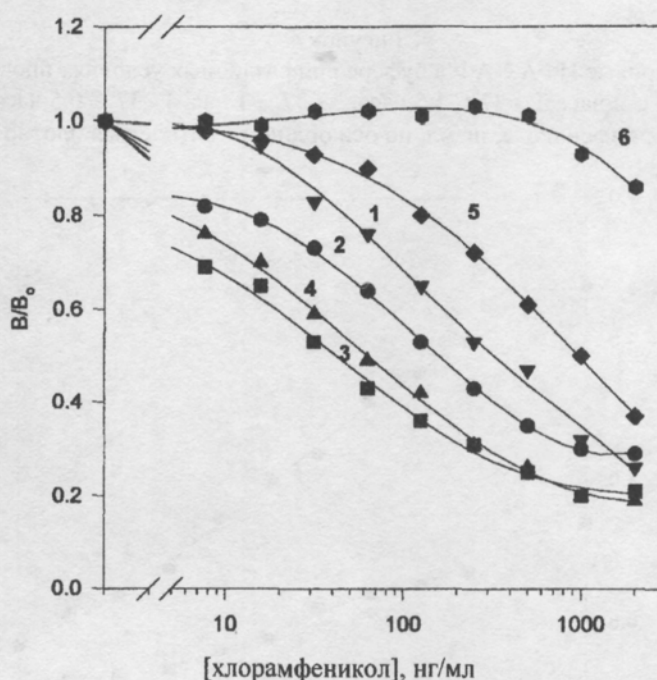


Рисунок 3.

Влияние концентрации конъюгата ОВА-ХАФ, сорбированного на твердой фазе, на характер калибровочных кривых ИФА ХАФ в буфере. Концентрация конъюгата ОВА-ХАФ: 1 - 25 нг/мл, 2 - 50 нг/мл, 3 - 100 нг/мл, 4 - 500 нг/мл, 5 - 1000 нг/мл, 6 - 5000 нг/мл. По оси абсцисс - концентрация хлорамфеникола, нг/мл, по оси ординат - значение (В/В₀), где В - оптическая плотность продукта ферментативной реакции в растворе антибиотика стандартной концентрации, В₀ - оптическая плотность продукта ферментативной реакции в растворе с концентрацией антибиотика 0 нг/мл.

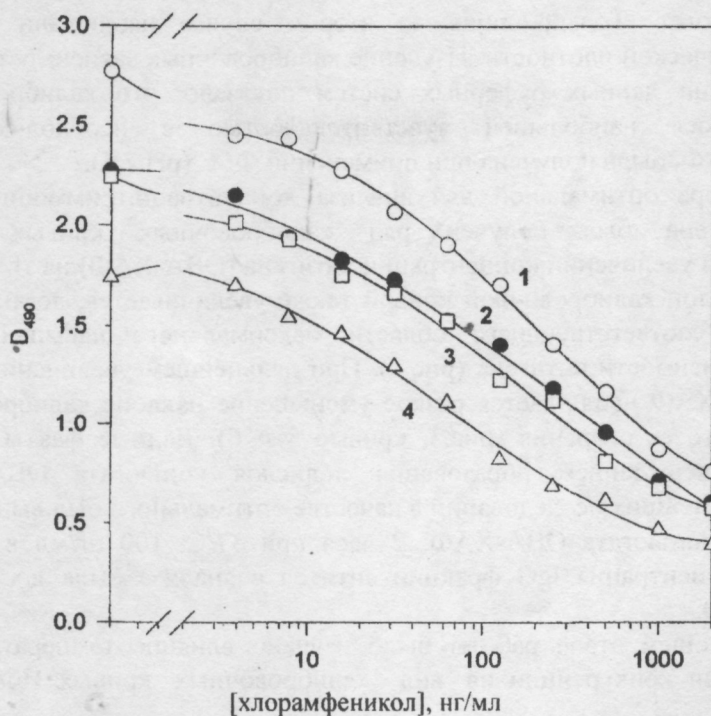


Рисунок 4.

Калибровочные кривые ИФА ХАФ в буфере при различных условиях проведения реакции конкуренции: 1 - 37°C 2 часа, 2 - 37°C 1,5 часа, 3 - 37°C 1 час, 4 - 37°C 0,5 часа. По оси абсцисс - концентрация хлорамфеникола, нг/мл, по оси ординат - оптическая плотность при 490 нм.

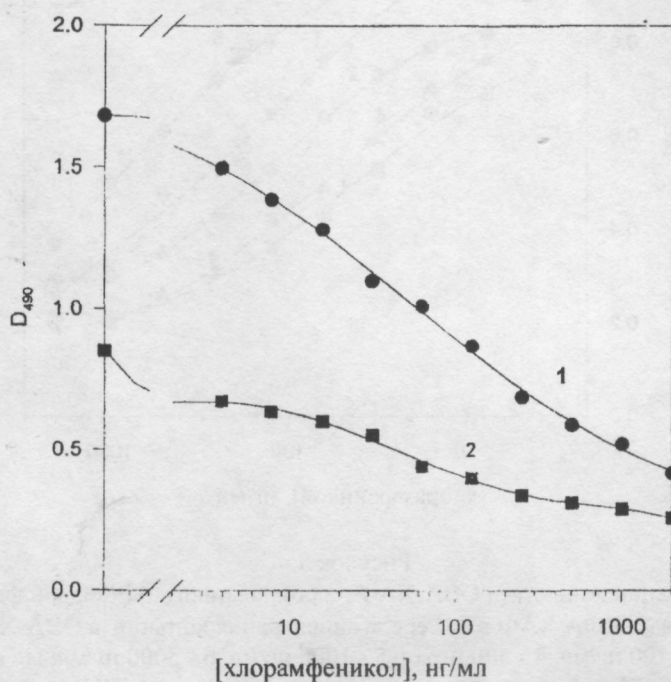


Рисунок 5.

Калибровочные кривые ИФА ХАФ в буфере при использовании конъюгатов антивидовых антител (1) и белка А стафилококка (2) с пероксидазой хрена. По оси абсцисс - концентрация хлорамфеникола, нг/мл, по оси ординат - оптическая плотность при 490 нм.

проведении реакции конкуренции при 37°C время реакции не оказывало значительного влияния на вид калибровочных кривых ИФА ХАФ (рис.4), что может свидетельствовать о быстром достижении системой состояния равновесия. В качестве оптимального было выбрано время 1,5 часа, как достаточное для установления в системе близкого к равновесию состояния. Кроме того, при проведении реакции в течение меньшего времени (0,5 часа и 1 час) наблюдалось ухудшение воспроизводимости результатов анализа. Изменение не только временного, но и температурного режима стадии конкуренции (15 часов при 4°C, 2 часа при 20°C и 1,5 часа при 37°C) лишь незначительно повлияло на вид калибровочных кривых ИФА ХАФ. Поэтому нами был выбран режим проведения реакции конкуренции при 37°C, 1,5 часа как требующий минимальных временных затрат и обеспечивающий получение калибровочной зависимости, характеризующейся хорошей чувствительностью и воспроизводимостью анализа.

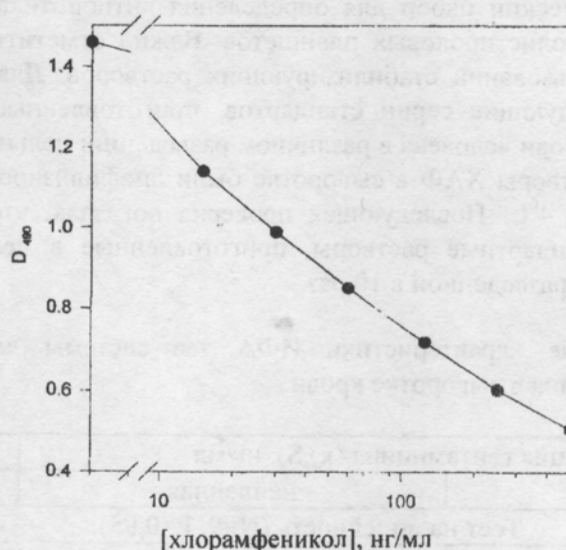


Рисунок 6.

Калибровочная кривая ИФА ХАФ в сыворотке крови человека. По оси абсцисс - концентрация хлорамфеникола, нг/мл, по оси ординат - значение оптической плотности при 490 нм.

При разработке ИФА ХАФ в качестве меченого реагента использовали конъюгаты антивидовых антител и белка А стафилококка с ПХ (рис.5). Предпочтение было отдано конъюгату Ат-ПХ, так как при его использовании была получена калибровочная кривая большей чувствительности в терапевтическом диапазоне концентраций ХАФ.

Разработанный метод характеризуется высокой специфичностью к ХАФ. Перекрестная реактивность для антибиотиков других групп (аминогликозиды, тетрациклины, пенициллины, макролидные антибиотики) составила менее 1%. Среди соединений, родственных по структуре ХАФ (эфедрин и его производные, амфетамин, метамфетамин и др.) только для сукцината натрия ХАФ перекрестная реактивность составила 24%.

После оптимизации условий проведения анализа в буферном растворе была проведена оптимизация ИФА для определения ХАФ в сыворотке крови человека. При изучении влияния компонентов образца (сыворотка крови человека) на результаты анализа было показано, что разведение сыворотки в 100 раз позволяет практически полностью нивелировать влияние матрикса на проводимые измерения. На рис.6 приведена калибровочная кривая разработанного твердофазного конкурентного ИФА

хлорамфеникола в сыворотке крови человека, позволяющая определять концентрацию ХАФ в диапазоне 10-1000 нг/мл.

В таблице приведены аналитические характеристики разработанной тест-системы. Данный метод характеризуется хорошей воспроизводимостью и достоверностью результатов, что было подтверждено тестами на линейность и открытие (коэффициент вариации не превышал 12%). Предел обнаружения метода составил 1 нг/мл ХАФ.

Важной характеристикой тест-системы является ее стабильность, т.е. способность сохранять свои характеристики в течение длительного времени. Калибровочные кривые, полученные с использованием свежесорбированного планшета и планшета, с засорбированным конъюгатом ОВА-ХАФ, хранившегося 8 месяцев при 4°C, были практически идентичны. Полученные результаты свидетельствуют о стабильности белкового конъюгата ОВА-ХАФ, сорбированного на полистироле, что позволяет производить диагностический набор для определения антибиотика на основе заранее сенсibilизированных полистироловых планшетов. Важно отметить, что при этом нет необходимости в использовании стабилизирующих растворов. Для определения ХАФ были исследованы следующие серии стандартов, приготовленные с использованием донорской сыворотки крови человека в разном разведении: цельной, 1:10, 1:20, 1:100, 1:200. Стандартные растворы ХАФ в сыворотке были лиофилизированы и хранились в течение 8 месяцев при 4°C. Последующая проверка показала, что стабильными при хранении являются стандартные растворы, приготовленные в цельной человеческой сыворотке и сыворотке, разведенной в 10 раз.

Таблица. Аналитические характеристики ИФА тест-системы для количественного определения левомицетина в сыворотке крови.

Концентрация гентамицина ($\bar{x} \pm S$), нг/мл		Открытие, %
рассчитанная	найденная	
Тест на линейность (N=9, P=0,95):		
31,25	30 \pm 4	96 \pm 7
62,5	60 \pm 5	97 \pm 8
125	123 \pm 11	98 \pm 9
250	238 \pm 15	94 \pm 6
Тест на открытие (N=9, P=0,95):		
50	46 \pm 4	92 \pm 8
100	98 \pm 5	100 \pm 9
300	306 \pm 10	102 \pm 3

Примечание: S - стандартное отклонение.

Таким образом в ходе проведенных исследований:

- отработаны и оптимизированы условия сорбции конъюгата ОВА-ХАФ на поверхности полистироловых планшетов, исследованы различные режимы проведения реакции конкуренции, изучена специфичность анализа и стабильность реагентов;

- разработана и оптимизирована иммуноферментная тест-система для количественного определения хлорамфеникола в сыворотке крови. Предел обнаружения метода - 1 нг/мл хлорамфеникола. Диапазон определяемых концентраций составляет 10-1000 нг/мл хлорамфеникола в сыворотке, разведенной в 100 раз. Время анализа - не более трех часов. Коэффициент вариации результатов анализа не превышает 12%.

Работа была выполнена в рамках ФЦНТП России "Разработка и внедрение мониторинга антибиотикотерапии и лекарственной устойчивости микроорганизмов".

ЛИТЕРАТУРА

1. Харкевич Д.А. (1987) Фармакология. М: Медицина.
2. Bannatyne R.M., Cheung R. (1979) Antimicrob.Ag.Chemother. **16** 43-45.
3. Allen E.H. (1985) J.Assoc.Off.Anal.Chem. **68**. 990-999.
4. Arnold D., Somogyi A. (1985) J.Assoc.Off.Anal.Chem. **68**. 984-990.
5. Scherk F., Agthe O. (1986) Arch.Lebensmittelhyg. **37**. 146.
6. Nouws J.F.M., Reek F., Aerts M.M.L., Baakman M., Laurensen J. (1987) Arch.Lebensmittelhyg. **38**. 9.
7. Бекбергенов Б.М., Житников В.Г. (1988) Антибиотики и химиотерапия, **33**, N1, 72-76.
8. Van der Water C., Haagsma N., van Kooten P.J.S., van Eden W. (1987) Z.Lebensm.Unters.Forsch. **185**. 202.
9. Campbell G.S., Mageau R.P., Schwab B., Johnston R.W. (1984) Antimicrob.Agents Chemother, **25**, 205.
10. Martlbauer E., Terplan G. (1987) Arch.Lebensmittelhyg, **38**, 3.
11. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. (1991). Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа..
12. Long G.L., Winefordner J.D. (1983) Anal. Chem., **55**, 712A-724A.
13. Chard T. An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques. (1990). In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. (Burdon R.H., van Knippenberg P.H. Eds.) Elsevier: Amsterdam - New York - Oxford. **6**. Part II.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY OF CHLORAMPHENIKOL IN HUMAN BLOOD SERUM

A.YU.KOLOSOVA, J.V.SAMSONOVA, A.N.BLINTSOV*, A.M.EGOROV

Division of Chemical Enzymology, Department of Chemistry, M.V.Lomonosov Moscow State University, 119899, Moscow, Vorobiovy Hills, fax (095)939-27-42;

*Division of Plant Physiology, Department of Biology, M.V.Lomonosov Moscow State University, 119899, Moscow, Vorobiovy Hills, fax (095)939-43-09

The method of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of chloramphenicol (CAP) in human blood serum was developed. Peculiarities of the adsorption on the microtitre plates surface of CAP-ovalbumin conjugate were investigated. Different conditions of competition stage of the analysis were studied. Conditions providing CAP monitoring in human blood serum in the clinical range were optimized. Matrix effect on the assay results was studied. The specificity of the analytical system was investigated and the reagents stability was examined. The method developed permits CAP concentration to be determined in human blood serum, diluted 1/100, in the linear range from 10 to 1000 ng/ml. The assay is characterized by high sensitivity (1 ng/mL) and good reproducibility (CV < 12%), assay time is about 3 hours.

Key words: drug monitoring, antibiotic therapy, chloramphenicol, enzyme immunoassay