Ж.В. Жнакина¹, К.Ю. Кузнецова^{1,2}
J.V. Jnacina¹, K.Yu. Kuznetsova^{1,2}

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ОБ ОПТИМИЗАЦИИ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО СОХРАНЕНИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОК С АНТИТЕЛАМИ К *ECHINOCOCCUS SPP.* И *TOXOCARA SPP.* В УСЛОВИЯХ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР

EXPERIMENTAL DATA ON OPTIMIZATION OF LONG-TERM STORAGE TECHNOLOGIES OF ANTIBODIES TO *ECHINOCOCCUS SPP.* AND *TOXOCARA SPP.* IN THE BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH PARASITIC DISEASES AT LOW TEMPERATURES

¹ ФГАОУ ВО Первый московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский университет) Минздрава России

² ФБУЗ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России.

¹ Federal STATE Autonomous educational institution of First Moscow state medical University I. M. Sechenov (Sechenov University) of the Ministry of health of Russia

² FBUZ «Center for strategic planning and management of biomedical health risks» of the Ministry of health of Russia.

Получены данные о высокой криопротекторной активности 10% р-ра глицерина, применение которого в 2 раза улучшает сроки и качество хранения диагностических сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* и к *Toxocara spp.* при температуре -20°C, не регламентированные в действующих нормативно- методических документах. Применение 10% р-ра глицерина и 0,01 тиомерсала оптимально для длительного хранения диагностических сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* и к *Toxocara spp.* в условиях лабораторной службы практического здравоохранения.

Ключевые слова: коллекция сывороток, сохранность антител, криоконсервация.

The data on the high cryoprotective activity of 10% p-RA glycerin, the use of which 2 times improves the timing and quality of storage of diagnostic sera with antibodies to *Echinococcus spp.* and to *Toxocara spp.* at T - 20°C, than without it according to regulatory documents. The use of 10% glycerol and 0.01 thiomersal is optimal for long-term storage of diagnostic sera with antibodies to *Echinococcus spp.* and to *Toxocara spp.* in the conditions of laboratory service of practical health care.

Key words: serum collection, antibody preservation, cryopreservation.

Введение

В последнее время отмечается интенсивный рост заболеваемости ларвальными гельминтозами в мире и в Российской Федерации. Высокий уровень распространенности возбудителей тканевых и просветных гельминтов в природных биоценозах и свободное их проникновение в синантропные условия обуславливает высокий уровень пораженности населения [1, 3, 4, 5].

Для оценки медико-биологических рисков здоровья населения, проживающего на эндемичных территориях, проводятся серозидемиологические и диагностические исследования с применением иммуно-ферментного анализа (ИФА). Контроль эффективности лечения и прогноза развития ларвальных паразитозов также основан на сравнительных данных исследований сыворотки больного при медицинском наблюдении. В лабораторной практике при постановке ИФА параллельные исследования сывороток позволяют оценить рост/снижение диагностических антител в анализируемых образцах в пределах чувствительности методики [2]. Поэтому воз-

возможность длительного хранения диагностических сывороток в практике серологических лабораторий востребована в рамках осуществляемых мер контроля качества диагностики и оказываемых медицинских услуг в здравоохранении.

Научное обоснование технологий и управления процессами сохранения функциональной активности сывороток при формировании паспортизованных и стандартизованных коллекций определены задачами стратегии развития здравоохранения Российской Федерации в рамках реконструкции Национального Банка сывороток [9]. В Правилах ведения преаналитического этапа клинических лабораторных исследований (ГОСТ Р 53079.4-2008) для стабилизации аналитов в пробах крови (сыворотки) установлены требования к срокам хранения сывороток крови: не более 4 часов - при комнатной температуре; 4 дня – при температуре холодильника(+4°), и до одного года –замораживание при -20°С, дополнительно указывается в методических указаниях хранение при -40°С без указания срока хранения («длительном хранении») [6].

Известно, что активность антител сывороток крови при длительном их хранении снижается за счет необратимых изменений физико-химического состояния и утраты функциональных свойств [7, 10]. Последующие исследования подтвердили, что при умеренной температуре в образцах крови происходят окисление и протеолитическая деградация белков, при этом степень их выраженности возрастает с повышением температуры.

При температуре +4°С длительное хранение сывороток приводит к потере активности, в первую очередь, иммуноглобулинов класса М (Ig М) [13, 15]. Наиболее широко применяются технологии длительного хранения сывороток *in vitro* при низких и ультранизких температурах замораживания. По данным Tucker M.J., Liebermann J. (2007), с понижением температуры от -37°С до -130°С происходит кристаллизация внеклеточной жидкости и адсорбированной воды вокруг белков в виде гелеобразных структур. Rall и Fahy (1985) считают, что при достижении такого стеклоподобного состояния останавливаются процессы химической и физической деградации объекта [13, 15, 17, 18].

Наиболее продуктивно холодовые технологии применяются при производстве банка крови, биологических препаратов из плазмы крови [14], а также в репродуктивной медицине – для криоконсервации гамет, эмбрионов, фрагментов тканей [8]. Бругеллер и Майер (1980) показали, что добавление в среду для замораживания криопротекторов предотвращают развитие терминальных криоповреждений в биосистемах за счет образования водородных связей между молекулами воды и уменьшения температуры замерзания аналитов [12].

Н.А. Максимов (1948) описал криозащитное свойство у многоатомного спирта глицерина [16]. Благодаря наличию ОН-радикала, глицерин образует водородные связи с молекулами воды, растворяется в ней в любых соотношениях, что определяет его высокую криопротекторную активность.

В то же время немногочисленные данные о влиянии глицерина на функциональную стабильность антител при их длительном нахождении в условиях низких температур, зависимости формирующихся эффектов от концентрации глицерина, времени и температуры совместной инкубации, что послужило обоснованием направления и цели научного поиска.

Цель исследования

Оптимизация технологии длительного хранения функциональной активности сывороток с антител к *Echinococcus spp.* и *Toxocara spp.* в условиях низких температур.

Материалы и методы

Проведены параллельные исследования образцов сыворотки крови больных эхинококкозом и токсокарозом, заложенных на хранение в условиях жидкого азота, при -40°С и при -20°С. Пробы крови отбирались в вакутейнеры по 3-4 мл в соответствии с МУ 3.2.1173-02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней» п. 2.1. Результаты постановки сравнивались с архивными значениями соответствующих образцов.

Исследования проведены в три этапа.

I этап. Исследование 96 образцов сыворотки крови с антителами к *Toxocara spp.* случайно выбранных из депозитария ИМПитМ им. Е.И.Марциновского для оценки их сохранности. Сыворотки хранились при температуре - 40°C без использования криопротекторов.

II этап. Были сформированы две группы исследований: 1 группа – из 75 образцов сыворотки с антителами к *Echinococcus spp.* и 75 образцов - к *Toxocara spp.* без добавления химических веществ (контрольная); 2 группа – из 150 образцов сыворотки с применением 10% раствора глицерина.

III этап. Проведены параллельные исследования 144 проб сывороток крови с антителами к *Echinococcus spp.*, заложенных на хранение в условиях жидкого азота (-196°C), - 40°C и -20°C. Было сформировано 6 групп: 1- контрольная (без добавления консерванта); 2, 3, 4 - с растворами глицерина 10%; 50%; 70%; 5 – 0,01% р-р тиомерсала (мертиолят натрия); 6 – композиция из 50% р-ра глицерина и 0,01% р-ра тиомерсала.

Применен метод иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-реагентов Вектор-бест Эхинококкоз-IgG-ИФА – Бест и Вектор-бест Токсокароз-IgG-ИФА – Бест (производство Россия).

Репрезентативность выборки с расчетом коэффициента корреляции Пирсона для непараметрических данных(r) оценена при $P<0,05$.

Результаты и обсуждение

На I этапе испытаний показатель сохранности образцов сыворотки с антителами к *Toxocara spp.*, соответствующим исходными значениями диагностических уровней, составил от 10% до 55% в обратной зависимости от сроков хранения (рис. 1). Полученные результаты были в пределах прогностических параметров и по срокам хранения соответствовали действующим регламентам, «до года» [6].

Рисунок 1. Доля сохранных диагностических сывороток крови с антителами к *Toxocara spp.* в зависимости от сроков хранения при -40°C без консерванта (2005-2016 гг).

Таким образом, сохранность диагностических антител в регламентированных условиях, при температуре замораживания - 40°C без добавления стабилизаторов, составляет не более 55% в течение одного года. В связи с чем, была выполнена работа по оптимизации условий и качества хранения диагностических сывороток больных ларвальными гельминтозами.

Второй этап. Исследования включали подбор и применение разных температурных режимов замораживания диагностических сывороток с антителами к *Toxocara spp.* и *Echinococcus spp.* в группе без добавления стабилизаторов и во второй группе – при добавлении 10% раствора глицерина при одинаковых условиях холодового воздействия в течение одного года. Получены статистически значимые различия по анализируемым показателям длительности хранения и значениях общей сохранности функциональной активности испытуемых образцов в зависимости от условий экспериментальных испытаний. Коэффициент корреляции Пирсона: 0.79.

В первой (контрольной группе) получены данные сопоставимые с результатами первого этапа испытаний с невысокими сроками сохранности диагностических сывороток, до года. Однако, доленое содержание образцов с сохранной функциональной активностью антител находилось в прямой зависимости от параметров температуры замораживания. Так, в группе без применения криопротектора (10% р-ра глицерина) при $t -196^{\circ}\text{C}$ сохранность антительной активности испытуемых образцов превышала показатели в этой группе при $t -20^{\circ}\text{C}$ почти в 2 раза, при $t -40^{\circ}\text{C}$ - на 10%. (рис.2).

Рисунок 2. Показатели сохранности диагностических сывороток с антителами к *Toxocara spp.* и *Echinococcus spp.* при разных температурных режимах с применением и без применения 10% раствора глицерина.

Таким образом, криогенное замораживание без применения консервантов в 2 раза больше улучшает сохранность диагностических сывороток по сравнению с другими регламентированными температурами замораживания.

Во второй испытуемой группе применялся 10% р-р глицерина в качестве криопротектора для изучения сохранности диагностических сывороток в разных температурах замораживания -20°C , -40°C , -196°C при применении криоконсервантов. Полученные данные имели значимые статистические различия с данными первой группы (коэффициент корреляции Пирсона: 0.91) и отличались незначительными различиями внутригрупповых показателей сохранности испытуемых сывороток (коэффициент корреляции Пирсона: 0.51). Получены данные о разных уровнях сохранности сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* и к *Toxocara spp.* в равных испытательных условиях. Стандартное отклонение для токсокароза 14,37, для эхинококкоза 13,32. (рис.3).

Рисунок 3. Показатели сохранности диагностических сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* и к *Toxocara spp.* в равных экспериментальных условиях.

Таким образом получены данные, подтверждающие высокую степень сохранности антител диагностических сывороток при их хранении с применением консерванта, 10% р-ра глицерина, при котором показатели превышали аналогичные в контрольной группе в 2 раза при $t -20^{\circ}\text{C}$; 1,2 раза – при $t -40$ и -196°C .

Также показано, что сохранность диагностических сывороток выше в 2 раза при температуре хранения $t -196^{\circ}\text{C}$ без применения криоконсерванта и при $t -20^{\circ}\text{C}$ – при применении 10% р-ра глицерина, что является наиболее оптимальным условием для хранения диагностических сывороток в практической службе здравоохранения и не регламентирован действующими НД.

Учитывая медико-биологические особенности развития эхинококкоза и высокий уровень пораженности населения, на третьем этапе проводились исследования на панели криоконсерванов из 6 вариантов криопротекторов с целью подбора оптимальных условий хранения сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* (рис.4)

Рисунок 4. Степени сохранности антительной активности сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* при применении разных видов, концентраций и сочетанного использования криоконсервантов.

Сравнительные данные показателей сохранности диагностических уровней испытуемых образцов с применением 10% р-ра глицерина значительно превышают среднеарифметические

значения полученных показателей в двух других его концентрациях (50%, 70% р-ах) и характеризуются высокой степенью их сохранности, от 50 до 70%.

При $t -20^{\circ}\text{C}$ 0,01% р-р тиомерсала проявил высокую криопротекторную активность, обеспечившей сохранность диагностических значений до 67% образцов сывороток, что можно рассматривать как альтернативный консервант для применения в практической службе лабораторного дела.

Выводы

Получены новые данные о применении консервантов для длительного хранения диагностических сывороток, не регламентированные действующими нормативно-методическими документами.

Впервые экспериментально подтверждена высокая криопротекторная активность 10% р-ра глицерина и 0,01% - тиомерсала в серологических исследованиях сывороток больных паразитарными болезнями. Их применение в 2 раза улучшает сроки и качество хранения диагностических сывороток с антителами к *Echinococcus spp.* и к *Toxocara spp.* при температуре -20°C и оптимально в условиях лабораторной службы практического здравоохранения.

Применение криопротекторов позволит создать коллекцию сывороток больных паразитарными болезнями в рамках Банка сывороток и для проведения внутрилабораторного контроля повторяемости ИФА в параллельной постановке и для сличительной оценки состояния больных после лечения при динамическом их наблюдении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов М.М. Тканевые гельминтозы у взрослых и детей (эпидемиология, клиника, диагностика, лечение профилактика), 2004; http://медпортал.com/anatomiya-59_patologicheskaya/paraziticheskie-prosteyschie.html [Antonov M.M. Tissue helminthiasis in adults and children (epidemiology, clinic, diagnosis, treatment, prevention), 2004 http://медпортал.com/anatomiya-59_patologicheskaya/paraziticheskie-prosteyschie.html - in Russian].
2. Жнакина Ж.В., Кузнецова К.Ю., Мания Т.Р., Сергиев В.П. Изменение диагностической характеристики антител к *Cysticercus cellulosae* в коллекционных образцах сыворотки крови в зависимости от сроков хранения в условиях глубокого замораживания. Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2017. № 1. С. 27-29. [Zhnačina J. V., Kuznetsov K. Y., T. R. Mania, Sergiev V. P. Change of the diagnostic features of antibodies to cysticercus cellulosae in the collection blood serum samples depending on storage time in the deep freeze/Medical Parasitology and parasitic diseases. 2017. No. 1. S. 27-29. - in Russian].
3. Кеннеди К. Экологическая паразитология. – М.: Мир, 1978. – 230 с. [Kennedy K. Ecological Parasitology. – М.: Mir, 1978. – 230 p. -in Russian].
4. Кинг А.Б., Прейгель С.И. Взаимодействие хозяин паразит как фактор эволюции генетической рекомендации // Генетика. – 1988. – т. XXIV. – №6. – С. 1113. [King A. B., Preygel S. I. Interaction of the host, the parasite as a factor of evolution of genetic advice // Genetics. – 1988. – Т. XXIV. – No. 6. – S. 1113. - in Russian].
5. Кузнецова В.Д., Азева Л.Н., Ренов С.Г., Агафонов Г.В. О случаях заболевания токсокарозом на Свердловской железной дороге // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2002. – №1. – С. 52-53 [Kuznetsov V. D., Ateva L. N., Reniv S. G., Agafonov G. V. On the cases of toxocariasis of the Sverdlovsk railway // Medical Parasitology and parasitic diseases. – 2002. – No. 1. – P. 52-53 - in Russian].

6. Методические указания МУ 3.2.1173-02. Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных заболеваний. Минздрав России. Москва 2003 [Methodical instructions MU 3.2.1173-02. Serological methods of laboratory diagnosis of parasitic diseases. The Ministry Of Health Of Russia. Moscow 2003 - in Russian].
7. *Поletaева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Красовская Н.Н.* Оптимизация серологической диагностики эхинококкоза цистного (однокамерного). Медицинская паразитология и паразитарные болезни. - 2010. - №1.- С.14-17 [*Poletaeva OG, Starkova TV, Kovrova Ye.A., Krasovskaya N.N.* Optimization of serological diagnostics of cystic echinococcosis (single chamber). Medical parasitology and parasitic diseases.-2010.-№1C.14-17 - in Russian].
8. *Русанов В.Н., Скобелев Л.И.* «Фракционирование белков плазмы в производстве препаратов крови». - М.: Медицина, 1983, стр.49-83 [*Rusanov, V. N., Skobelev, L.I.* «Fractionation of plasma proteins in the manufacture of blood products». - М.: Medicine, 1983, pp. 49-83 - in Russian].
9. *Семенов Т.А.* Роль банка сывороток крови в системе биологической безопасности страны» Журнал Вестник Росздравнадзора Москва №3 2010 с.55-58, [https://ru.wikisource.org/wiki/Semenenko T. A. The role of the Bank of blood serum in the system of biological security of the country](https://ru.wikisource.org/wiki/Semenenko_T._A._The_role_of_the_Bank_of_blood_serum_in_the_system_of_biological_security_of_the_country) in Vestnik Roszdravnadzor Moscow No. 3 2010 pp. 55-58, <https://ru.wikisource.org/wiki/> - in Russian].
10. *Сергиев В.П., Кузнецова К.Ю.* Современные проблемы в сфере паразитарных болезней и их терапии. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. -2014. -№ 1.-С.12-15[*Sergiev V. P., Kuznetsova, Y. K.* Modern problems in the field of parasitic diseases and their therapy. Infectious diseases: news, opinions, training. -2014. - No. 1.-S. 12-15 - in Russian].
11. *Чардт Т.* Радиоиммунологические методы, М.: Мир, 1981, стр.48.[*Chardt T.*, Radioimmunoassay methods, М.: Mir, 1981, p. 48- in Russian]
12. *Bruggeller P., Mayer E.* (1980). Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. Nature 288, 569–571 [*Bruggeller P., Mayer E.* (1980). Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. Nature 288, 569–571 - in Russian].
13. *Isachenko V., Alabart J.L., Dattena M., Cappai P., Nawroth F., Isachenko E., Cocero M.J., Olivera J., Roche A., Accardo C., Folch J.* (2003). New technology for vitrification and field (microscope-free) thawing and transfer of the small ruminant embryos. Theriogenology 59, 1209–1218.
14. *Tucker M.J., Liebermann J.* (2007). Vitrification in ART. Informa UK Ltd. 322 p.
15. *Rall W.F., Fahy G.M.* (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196°C by vitrification. Nature 313, 573–575.
16. *Gottstein B, Tschudi K, Eckert J, Ammann R.* Em2-ELISA for the follow-up of alveolar echinococcosis after complete surgical resection of liver lesions. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989 May-Jun;83(3):389–393.
17. *Auer H, Picher O, Aspöck H.* Combined application of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and indirect haemagglutination test (IHA) as a useful tool for the diagnosis and post-operative surveillance of human alveolar and cystic echinococcosis Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A. 1988 Nov; 270(1-2):313-25.
18. *Edwards R.* Immunoassays Essential Data. NETRIA, St Bartholomew's Hospital, London, UK
19. *Burbon R.H., van Knippenberg P.H.* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, volume 6, part 2.

Поступила 01.12.18