

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Жнакина Жанна Вячеславовна

**Сохранность антител к *Echinococcus granulosus* и *Toxocara canis* в
сыворотке крови больных паразитарными болезнями в условиях
длительного хранения**

03.02.11- Паразитология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Кузнецова Камаля Юнис кызы

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Заболеваемость населения РФ эхинококкозом и токсокарозом.....	13
1.2. История становления и современные представления о криоконсервации.....	16
1.3. Систематизация и механизм действия основных групп широко применяемых в медицинской практике криопротекторов.....	19
1.4. Особенности формирования и применения коллекций биологического материала в мире и в Российской Федерации	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ	28
2.1. Методы исследований.....	28
2.2. Схема экспериментальных исследований.....	28
2.3. Реактивы, тест - наборы, оборудование, использованные в работе....	29
2.4. Объем, направления и результаты исследований.....	31
2.5. Оценка результатов.....	35
2.6. Статистическая обработка результатов исследования.....	36
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЯ СОХРАННОСТИ АНТИТЕЛ К <i>E.GRANULOSUS</i> И <i>T.CANIS</i> В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПАРАЗИТАРНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ.....	39
3.1. Исследование сохранности образцов сыворотки крови с антителами к <i>S.cellulosae</i> и <i>T.canis</i> в коллекции ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им.И.М.Сеченова.....	39
3.2. Определение сохранности образцов сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> с применением разных концентраций глицерина.....	44

3.3.	Разработка двух- и многокомпонентных стабилизирующих составов для оптимизации условий хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i>	55
3.3.1	Определение эффективности действия двухкомпонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин».....	55
3.3.2	Определение эффективности действия состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» на базе стабилизирующего состава «глицерин + пектин».....	64
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ		76
ВЫВОДЫ.....		83
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....		85
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....		86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		88
ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....		103
ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....		104

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования.

Совершенствование медицинских технологий хранения биологического материала является одним из направлений развития здравоохранения в стране, что определено Концепцией долгосрочного социально-экономического развития здравоохранения на период до 2020 года и Федеральной целевой программой Национальной системы биологической и химической безопасности Российской Федерации.

В настоящее время длительное хранение диагностических сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням проводится в условиях морозильников со сменой температуры от -20° до -40°C и регламентируется нормативно-методическими документами [16, 63]. При этом согласно современным представлениям, после 6 месяцев хранения без использования специальных стабилизирующих добавок в образцах сыворотки наступают необратимые изменения их физико-химического состояния, в результате падает концентрация диагностических антител [83]. Однако в медицинской практике востребованы технологические приёмы, требующие продления сроков сохранения исходного уровня антител, для использования образцов сыворотки больных в более отдаленные периоды времени. Так, например, серологический контроль уровней диагностических антител и прогноз развития заболевания у больных эхинококкозом в период диспансерного наблюдения составляет 1 раз в год в течение 5 лет и часто проводится с применением метода постановки «парных сывороток». Этот метод используется в специализированных лабораториях для обеспечения точности полученных результатов. Суть его в том, что при проведении сравнительных анализов используют сохраненные образцы сыворотки от одного пациента в разные периоды заболевания [51, 52].

Достижение более длительных сроков хранения диагностических сывороток также актуализировано целями создания паспортизированных коллекций

Национального Банка Сывороток как компонента глобальной системы мониторинга, контроля и прогноза социально значимых паразитарных болезней [58, 59, 60].

Научные подходы управления процессами длительного хранения биологических материалов описаны в таких высокотехнологичных областях медицины как, трансплантация органов и тканей, репродукция и лечение бесплодия, трансфузиология. Наиболее широко внедрены в практику методы, связанные с применением низких и ультранизких температур, за счет которых удается сохранить физиологические и аналитические свойства образцов разных по структуре биологических материалов [17, 40, 65, 91].

Известно, что использование ультранизких температур применительно к сыворотке крови приводит к снижению концентрации диагностических иммуноглобулинов [24, 46]. Однако применение химических стабилизаторов предотвращает денатурацию белков сыворотки крови за счет понижения точки заморозки в криогенной среде [13, 18, 37, 41]. По данным литературы, описано более 120 химических соединений, использующихся в качестве перспективных криопротекторов. При этом использование эффективного стабилизатора и способа длительного хранения биоматериала зависит от специфических характеристик исследуемых объектов [1, 55].

Данные литературы, а также востребованность в практике лабораторной медицины сохранения диагностических сывороток крови пациентов с тканевыми паразитогами без потери активности антител позволили сформулировать цель и направления нашего научного исследования по совершенствованию технологических способов продления сроков их хранения.

Степень научной разработанности темы

В научной литературе достаточно широко освещено применение разных по типу и составу криопротективных добавок в зависимости от целей практического применения биообразцов. Так, например, для стабилизации биологических объектов используют углеводную смесь дисахаридов, олигосахаридов и

полисахаридов, гидролизированный белок и соль карбоновой кислоты (патент RU2573324); плазмы крови - углеводы в составе сахарозы и глюкозы (патент A01N1/02 и патент A61K35/16). Однако в патентном поиске не удалось обнаружить данные об эффективном использовании криоконсервантов для хранения образцов сыворотки крови с антителами к возбудителям тканевых паразитозов.

В нормативно-методических документах регламентируется хранение сывороток только в условиях электрических морозильников без применения стабилизаторов. Так, согласно национальным стандартам лабораторных технологий стабильность для IgG в сыворотке крови без применения химических добавок сохраняется в течение 8 мес. при температуре 4° - 8°C и при -20°C; стабильность IgM - 4 месяца при температуре 4° - 8°C и 6 месяцев при -20°C (ГОСТ Р 53079.4 2008). В то же время в методических указаниях «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней» регламентируется хранение биообразцов до 6 дней при температуре 2° - 4°C; более 2-х недель при -20°C; более года при -40°C. Разночтение сроков хранения в разных нормативных документах, а также отсутствие стандартных условий хранения образцов диагностических сывороток крови, в том числе с антителами к тканевым паразитарным болезням предопределили цель и задачи научного поиска в рамках выполненной работы.

Цель диссертационной работы:

Разработка методики криоконсервации для длительного хранения сывороток, содержащих антитела к *Echinococcus granulosus* и *Toxocara canis*.

Задачи исследования:

1. Провести исследования по определению степени сохранности образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитам на примере *T.canis* с длительными сроками хранения в коллекции ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова.

2. Дать сравнительную оценку сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* в регламентных условиях хранения (-20°, -40°C) и при криоконсервации с применением глицерина.

3. Сравнить показатели сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при применении моно-консерванта - глицерина, и двухкомпонентного стабилизирующего состава в условиях длительной криоконсервации.

4. Разработать новый технологический способ длительного хранения сывороток крови к *E.granulosus* и *T.canis*, позволяющий оптимизировать условия и продлить сроки хранения, без потери активности антител.

Научная новизна

Впервые экспериментальным путём доказано, что криоконсервация с применением стабилизирующих веществ является надёжным альтернативным способом длительного хранения образцов сыворотки крови позволяющим сохранить исходные уровни антител к *E.granulosus* и *T.canis*.

Впервые показана низкая, не более 55%, сохранность коллекционных образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis*, в условиях длительного хранения по регламентам действующих нормативных документов

Впервые были получены данные, подтверждающие высокую эффективность применения 10% раствора глицерина и стабилизирующих составов на основе его низких концентраций, при длительном хранении образцов диагностических сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням, которые не учтены в регламентирующих документах.

Подобраны оригинальные двух- и многокомпонентные стабилизирующие составы, применение которых обеспечивает надёжность и высокую эффективность длительного хранения биообразцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* в низкотемпературных условиях.

Разработан новый способ длительного хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням, позволяющий

использовать метод «парных сывороток» для постановки Иммуноферментного анализа (ИФА), что обеспечивает эффективный серологический мониторинг на протяжении всего периода медицинских наблюдений за больными.

Практическая значимость и внедрение результатов исследования

Получены новые сведения о возможности использования технологии криоконсервации для улучшения качества и сроков хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням по сравнению с регламентными условиями их хранения.

Разработан оригинальный многокомпонентный стабилизирующий состав, позволяющий одинаково успешно применять его для хранения образцов диагностических сывороток крови больных эхинококкозом и токсокарозом в низкотемпературном морозильнике при -20° и -40°C , а также при их криоконсервации.

Новый способ стабилизации сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням позволяет стандартизировать процедуры хранения паспортизированных сывороток для функционирования вновь созданного Национального Банка Сывороток.

Результаты исследований использованы при подготовке нормативного документа: Методы контроля биологических и микробиологических факторов МУК 4.2.3533-18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней. Методические указания» (приложение 1).

Получен патент: «Способ хранения сывороток крови с антителами к возбудителям паразитарных болезней» №2704134 (приложение 2).

Материалы диссертационной работы включены в образовательную программу ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) в тематический цикл усовершенствования специалистов клинико-диагностических лабораторий учреждений здравоохранения.

Положения, выносимые на защиту:

1. Существующие регламентные условия и способы хранения образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитарным болезням не обеспечивают эффективную их сохранность и, соответственно, возможность применения метода «парных сывороток» для сравнения изменений диагностических параметров сыворотки крови на протяжении всего периода медицинского наблюдения.
2. Применение низких концентраций глицерина повышает сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при длительном хранении в низкотемпературных условиях при -20°, -40°C и криогенной среде при -196°C.
3. Оптимизация условий хранения образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* с применением разработанного стабилизирующего состава в сочетании с низкотемпературным замораживанием и криоконсервацией позволяет снизить долю диагностических сывороток крови с потерей исходных уровней антител.

Апробация работы

Основные положения и результаты диссертационной работы доложены на 12 научно-практических конференциях, конгрессах и форумах:

-III Международный форум по экологии человека и гигиене окружающей среды «Современные проблемы оценки, прогноза и управления экологическими рисками здоровью населения и окружающей среды, пути их рационального решения», 13-14 декабря 2018 г., Москва

-VII Всероссийская научно - практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Инновационные подходы в решении медико-биологических проблем здоровья населения» с международным участием, 25-26 октября 2018 г., Москва

-IV Российский конгресс лабораторной медицины, 3-5 октября 2018г., Москва

-Международный Форум Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды на тему: «Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия антропогенно детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения» ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровья» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 14-15 декабря 2017 г., Москва

-III Российский конгресс лабораторной медицины 11-13 октября 2017г., Москва

-IV Форум регионов Беларуси и России. Дни белорусской науки. Секция «Медицина и фармация», 27 июня в 2017 году, Москва

-IX Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием 27-29 марта 2017 году, Москва

-Международный медицинский форум «Вузовская наука. Инновации» 6-7 февраля 2017 г., Москва

-X научно-практическая конференция «Молодой ученый: вызовы и перспективы» 16 мая 2016 г., Москва

-VI Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье. Гигиена и экология урбанизированных территорий», посвященной 85-летию ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС ИМ. А.Н. Сысина» Минздрава России 13-14 сентября 2016 г., Москва

-II Российский конгресс лабораторной медицины 12-14 октября 2016 г., Москва

-VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием 30 марта-1 апреля 2015 г., Москва

Личный вклад

Автором проведен анализ отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме. Поставлены цели, задачи, составлена схема исследования, по которой самостоятельно выполнена вся экспериментальная работа. Обобщены

и статистически обработаны результаты исследований, сформулированы положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации по выполненной работе.

Соответствие темы диссертации паспорту научной специальности.

Задачи и научные положения диссертации, выносимые на защиту, соответствуют формуле специальности 03.02.11 - «паразитология». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования паспорта специальности 03.02.11 - «паразитология», конкретно пунктам 8, 9.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, включенных в перечень ВАК Российской Федерации и Scopus. Опубликовано 4 статьи в других научных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 104 страницах компьютерной верстки и состоит из введения, обзора литературы, материалов, методов и объема исследований, 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложений. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей, 4 рисунками. Библиография включает 127 литературных источников (из них 82 отечественных, 45 зарубежных работ).

Благодарности

Выражаю искреннюю признательность за оказанную помощь и содействие на всех этапах выполнения диссертационной работы: научному руководителю, доценту МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) Кузнецовой К.Ю.;

Выражаю благодарность коллективу Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И.Марциновского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет за экспертную помощь, а также доктору медицинских наук,

профессору, ведущему научному сотруднику Центра стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Минздрава России Жолдаковой З. И.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Заболеваемость населения РФ эхинококкозом и токсокарозом

Высокий уровень распространенности тканевых и просветных гельминтов и свободное их проникновение в среду обитания человека обуславливает высокий уровень пораженности населения паразитарными болезнями и приобретает социально-экономическое значение в стране. Проведение серо-эпидемиологического мониторинга помогает обеспечить непрерывный процесс объективной оценки состояния эпидемиологического благополучия населения и районирование территорий по интенсивности распространения паразитарных заболеваний [51, 62, 68, 81].

Эхинококкоз. По последним оценкам ВОЗ, эхинококкоз ежегодно приводит к потере около 3 миллионов лет жизни больных, скорректированных на инвалидность по индексу ДАЛИ [11]. Цистный эхинококкоз распространен во всем мире и обнаруживается на всех континентах, а для отдельных регионов России определяется как краевая патология [11, 61, 76]. В эндемичных районах страны показатели заболеваемости людей превышают 50 случаев на 100 тыс. населения (2018 г.). За 10-летний период наблюдений (с 2005 по 2015 гг.) показатель заболеваемости эхинококкозом населения страны возрос более, чем в 3 раза, с 0,1 до 0,3 на 100 тыс. населения. В 2015 году в России гидатидозный эхинококкоз был зарегистрирован в 63 субъектах РФ, в том числе стабильно - на территориях Приволжского и Северо-Кавказского федеральных округов [21, 47]. Показатель выявляемости эхинококкоза преимущественно связан с качеством диагностической работы и значительным увеличением трудовой миграции из эндемичных по данному заболеванию стран ближнего зарубежья (Казахстан, Узбекистан, Туркменистан), где значительно осложнилась эпидемиологическая ситуация [32-38, 113]. Такая ситуация характерна для Курганской области, граничащей с высоко эндемичной по эхинококкозу Республикой Казахстан [27-

31, 71].

Прогноз эпидемиологической ситуации по эхинококкозу на территориях с высоким уровнем циркуляции возбудителя в окружающей среде также основан на анализе данных сероэпидемиологического мониторинга.[62, 81, 82]. В очагах эхинококкоза напряженность эпидемического процесса оценивается по уровню зараженности населения и наличию иммунной прослойки, характеризующих интенсивность циркуляции возбудителя на данной территории [3, 51, 52, 77].

В клиническом аспекте, серологический мониторинг динамики количественного нарастания или снижения диагностических антител проводится в отношении больных с установленным диагнозом. Согласно стандартам медицинской помощи, серологический мониторинг послеоперационного состояния больных эхинококкозом проводится ежегодно с обязательным контролем уровней антител, что имеет прогностическое значение и позволяет выявлять рецидивы заболевания на ранних стадиях [4, 68].

Токсокароз. По данным официальной статистики, в Российской Федерации с 1991 г. отмечен значительный рост заболеваемости токсокарозом населения – от 0,03 (1991 г.) до 2,19 на 100 тыс. населения (2014 г.), что в значительной степени связано с введением в реестр медицинского наблюдения регистрируемых случаев заболевания токсокарозом населения [80]. Высокие уровни пораженности токсокарозом стабильно отмечаются на отдельных территориях страны. Таких как Уральский ФО и Сибирский ФО заболеваемость, в которых связана с высокой (до 30%) обсемененностью возбудителем объектов окружающей среды [22, 76, 79]. На Юге России высокий уровень заболеваемости токсокарозом регистрируется у жителей Ростовской, Астраханской, Волгоградской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, республик Калмыкия, Карачаево-Черкессия и Адыгея. Среднемноголетний показатель заболеваемости на данных территориях с 2004 по 2014 год составил от 0,56 до 1,95 на 100 тыс. населения, при этом среди заболевших преобладают дети - 83,2% (2015 г.). На рост заболеваемости в Краснодарском крае, в частности, оказало произошедшее стихийное бедствие с

подтоплением территории, что привело к высокой контаминации яйцами токсокар почвы и воды поверхностных водоемов [21, 76]. В Москве доля серопозитивных к токсокарозу взрослых в возрастной группе 50-59 лет составляет 30%, детей в возрасте 4 - 6 лет - около 12%, из них с выраженными дермато - аллергическими проблемами - 3,3% детей [21].

При токсокарозе серологическое исследование является единственно доступным методом, позволяющим верифицировать диагноз [2].

Клиническая картина тканевых паразитозов достаточно полиморфна и мало специфична. Выявление специфических антител помогает врачу поставить окончательный клинический диагноз и определяет целенаправленность медицинского обследования [11, 38, 70]. Согласно результатам сероэпидемиологических обследований населения, проводимых референс-центром по мониторингу за ларвальными гельминтозами Российской Федерации (2015 г.) с использованием метода «парных сывороток» показатель выявляемости серопозитивных лиц составил 76,6%, при этом при применении традиционного однократного применения серодиагностики показатель выявляемости не превышал 23,4% [21]. Принцип метода «парных сывороток» основан на повторном исследовании сывороток от одного больного, взятых в разные периоды болезни, для определения точности качественных изменений их состояния за период наблюдения [51, 52].

Таким образом, несмотря на клиническую и социальную значимость эхинококкоза и токсокароза в стране, существуют ограничения эффективного сероэпидемиологического мониторинга этих заболеваний, связанные с не отработанной технологией длительного хранения биообразцов.

1.2. История становления и современные представления о криоконсервации

История криоконсервации берет начало с 1737 года, когда А. Бюфон и Д. Гамель одними из первых установили, что причиной гибели клетки при замораживании является кристаллизация льда, приводящая к ее разрыву. Однако позже авторы пришли к выводу, что повреждение живых систем при их замораживании обусловлено химическими и физико-химическими изменениями, сопровождающими процесс кристаллизации. К. Мюллер-Тургау (1886 г.) установил, что лед в растениях вначале образуется в межклетном пространстве, что приводит к обезвоживанию клетки в первый период замораживания. Практически в то же время Х. Молиш (1897 г.) в опытах по замораживанию получил результаты, аналогичные данным К. Мюллер-Тургау и подтвердил эксперименты, положившие начало теории обезвоживания. Процесс вымораживания воды в живых существах изучался также русским физиком и энтомологом П. И. Бахметьевым (1912 г.). Большой вклад в изучение процессов кристаллизации при глубоком охлаждении биообъектов внес Б. Люйе (1940 - 1960 гг.), который детально исследовал микроструктуру кристаллов льда, образующихся при различных условиях замораживания чистой воды и растворов хлорида натрия, глюкозы, глицерина, яичного альбумина и желатина. В зависимости от концентрации растворов, способа приготовления, скорости охлаждения форма кристаллов сильно варьировала. Автор выявил, что характер и степень повреждения биологического материала зависит от формы кристаллов льда, в частности, от наличия в них острых и напряженных граней. В начале 50-х г. прошлого столетия Дж. Лавлоком была создана одна из первых научно обоснованных теорий криоповреждений. На основании опытов по замораживанию эритроцитов он пришел к выводу, что ведущей причиной их гемолиза является повреждение мембраны, образованной из липопротеидных комплексов [5, 7, 78, 100].

В период времени, охватывающий 1900—1940 гг., появились наблюдения, свидетельствующие, что наряду с гибелью клеток в результате развития в них процесса кристаллизации они могут повреждаться в зоне температур до фазового перехода воды в лед, т. е. вблизи 0°C. Летальность быстрого снижения температуры до 0°C отмечалась при охлаждении спермий, клеток низших и высших растений. В тоже время медленное снижение температуры до 0°C оказалось безвредным для указанных выше клеток [91, 65]. Дальнейшее углубление представлений о температурном шоке клеток нашло отражение в работах А. М. Белоуса и В. А. Бондаренко (1980 - 1990 гг.), показавших роль фазовых переходов липидов и белков цитоскелета в механизме его развития и предупреждения [7]. В настоящее время метод консервации крови и ее компонентов при низких и ультранизких температурах служит базовым способом их длительного хранения вне организма человека [117, 40].

История исследований по криоконсервации характеризуется определенной периодизацией развития. Так, для начального периода, до 50-х годов прошлого столетия, развивалось эмпирическое трактование роли низкотемпературных факторов в повреждении клеток и их защите, а в последующие десятилетия предпринимались попытки разработать способы криоконсервации большинства видов клеток и тканей животных и человека на основе научно обоснованных данных [5, 78]. Исторически, еще в 1776 г. Спаланцани предпринял первые попытки сохранения ценных клеток человека (сперматозоидов) с использованием низких температур, а широкое применение метода в современных технологиях произошло сравнительно недавно с применением криоконсервированных гамет, эмбрионов и фрагментов тканей в репродуктивной медицине [57, 101].

Согласно современным представлениям, снижение концентрации антител сывороток крови при длительном их хранении в низких температурах связано с их гидролизом, разрушением дисульфидных или пептидных связей и образованием димеров и олигомеров молекул [100]. В образцах сыворотки наступают необратимые изменения физико-химического состояния, в результате

антитела утрачивают свои функциональные свойства [100]. Принято считать, что стабильность нативной структуры клетки определяют гидрофобное взаимодействие неполярных групп, приводящее к возникновению и образованию внутри- и межмолекулярных водородных связей [46]. При этом снижение внешней температуры усиливает образование водородных связей [110]. В результате этих разнонаправленных факторов происходит перестановка расположения цепей в белковой глобуле, так и агрегация белковых молекул, что в той или иной степени приводит к падению активности белка [114, 116]. По мнению Вонг Дзуан (2015 г.) успешное охлаждение биологического материала зависит от оптимальной скорости охлаждения с учетом вида биообъекта и криопротектора, его концентрации и природы, состава среды и методов оттаивания [10]. По данным Фалько О.В., Землянских Н.Г. (2013) после замораживания сыворотки плацентарной крови человека до -20°C и -196°C с ее последующим оттаиванием происходило увеличение количества диамид-индуцированных агрегатных белковых комплексов, что было следствием повышения доступности сульфгидрильных групп к окисляющему действию диамида и свидетельствовало о конформационных изменениях белков [72]. Также Фалько О.В. (2017) изучалось замораживание СПКЧ до -196°C и дальнейшее хранение в жидком азоте в течение 12 месяцев. В результате чего распределение белков по молекулярным массам не изменялось, тогда как, хранение при -20°C свыше 6 месяцев вызывало увеличение содержания белков с молекулярной массой (м.м.) 65 кДа и снижение содержания белков с м.м. 40, 27 и 5 кДа, что объяснялось агрегацией белковых молекул криоконсервированной СПКЧ [73]. В зависимости от режимов низкотемпературного хранения происходили изменения параметров флюоресценции криоконсервированной СПКЧ. Замораживание СПКЧ до -196°C не изменило форму спектров флюоресценции белков и положение их максимумов, однако привело к увеличению интенсивности собственной флюоресценции, которое в процессе дальнейшего хранения в течение 12 месяцев дополнительно не изменялось [73]. Замораживание СПКЧ до -20°C с

последующим оттаиванием не влияло на форму спектров, положение их максимумов и интенсивность флуоресценции. Хранение СПКЧ при -20°C свыше 6 месяцев вызывало изменение интенсивности флуоресценции белков и формы спектров, что свидетельствовало об окислении части аминокислотных остатков [73].

Таким образом, анализ научной литературы показал наличие широкой теоретической базы успешного использования криоконсервации для повышения сроков хранения различных биологических объектов.

1.3. Систематизация и механизм действия основных групп широко применяемых в медицинской практике криопротекторов

Повреждающее действие на клеточные структуры при холодовой адаптации в цикле замораживания-оттаивания связано с эффектами, вызванными обезвоживанием, образованием вне- и внутриклеточных кристаллов льда [18, 37, 41]. Применение разных по виду и составу криозащитных добавок уменьшает интенсивность адаптационного процесса, снижает уровень клеточного метаболизма, что делает клетки менее восприимчивыми к повреждениям при замораживании [18, 37, 41].

Н.А.Максимов (1908, 1913 гг.) первым развил учение о криопротекторах – защитных веществах, способных предотвращать развитие терминальных криоповреждений в живых биосистемах на этапах их низкотемпературного консервирования и впервые применил глицерин, который с 1950-х годов стал использоваться для криоконсервирования спермы и клеток крови [42, 43]. В 1916 г. Ф. Рус и Д.Р.Турнер впервые доказали возможность сохранения крови в течение нескольких дней после донации при добавлении к ней глюкозо-цитратных консервирующих растворов [49].

Известные в научной литературе и на практике способы стабилизации функциональных белковых молекул объединены в три основные группы: 1)

направленное изменение первичной структуры белковой молекулы с использованием приемов сайт-направленного мутагенеза; 2) ковалентная химическая модификация белковой молекулы; 3) использование модифицирующих добавок, изменяющих конформацию или гидратную оболочку белковой молекулы при ее нахождении в водном растворе [37].

В историческом аспекте следует отметить работы J. Lovelock (1954 г.), который одним из первых предложил различать криопротекторы по способности проникать через плазматическую мембрану клеток и выделил эндоцеллюлярные криопротекторы, проникающие в клетки (КПК), и экзоцеллюлярные криопротекторы, непроникающие в клетки (КНК) [106]. Н.С. Пушкарь и соавт. (1978) добавили к двум названным третью группу - криопротекторы смешанного действия (КСД), проявляющую одновременно эффекты КПК и КНК [37]. Н. Maryman (1971 г.) установил, что эффектом КПК из низкомолекулярных обладают: глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилацетамид (ДМАЦ), α -пропиленгликоль (1,2-ПГ), этиленгликоль (ЭГ) и др., у которых молекулярная масса (м.м.) до 101 кДа [5, 37, 108].

К настоящему времени в качестве перспективных криопротекторов апробировано больше 120 веществ, принадлежащих к разным классам химических соединений [55]. Это спирты (этиленгликоль, глицерин и др.), амиды (диметилацетамид, мочевины и др.), оксиды (диметилсульфоксид и др.), углеводы (глюкоза, сахароза и др.), искусственные полимеры (поливинилпирролидон, оксиэтилированный крахмал и др.), неорганические соли (натрий хлорид и калий хлорид, натрий цитрат и натрий фосфат трехзамещенный и др.) [41, 55]. Приведенный список не исчерпывает весь перечень и типы классов химических соединений, в которых могут встретиться вещества, обладающие криозащитными свойствами [1, 55]. Криопротекторы разной химической природы не имеют определенных границ по молекулярной массе и уровню токсичности [41, 55]. Высокая холодоограждающая активность обнаруживается как у низкомолекулярных, так и у высокомолекулярных химических веществ [42].

Для систематизации имеющихся многокомпонентных хладоограждающих растворов, а также создания новых криопротекторов с реставрирующими добавками, Е.П.Сведенцов (1979 г.) предложил оригинальную классификацию гемоконсервантов, которая учитывает устоявшиеся названия криопротекторов и их свойства, описанные и обоснованные Н.С. Пушкарем (1954 г.), J. Lovelock (1978), Н. Мегуман (1971 г.) и другими исследователями, в то же время вещества отличающиеся по характеру состава, количеству, в том числе, выделенные в IV класс криоконсервантов [37, 55, 106, 108].

В мировой практике применения технологий длительного хранения клеток крови при сверхнизких температурах широко используются защитные среды, содержащие глицерин, который способствует созданию водородных связей с молекулами воды и препятствует их организации в лед [41, 42, 46]. При замораживании биоматериала дегидратация приводит к пространственному сближению макромолекул и модификации активных SH- групп, глицерин в качестве осмотически деформирующего агента препятствует жесткой дегидратации молекул связанной воды белка и тем самым - критическому сближению макромолекул [46]. Также благодаря коллигативному эффекту глицерин препятствует формированию молекулярной решётки льда, стабилизирует гидратную структуру вокруг белков, предупреждая тем самым возможность их криоденатурации в процессе замораживания [42]. При вымораживании свободной и частично связанной воды из биомacroмолекул глицерин связывается с гидрофильными участками белков и формирует защитную оболочку вокруг белка [46]. Формирование такой оболочки способствует стабилизации гидратных решеток белков за счет перехода молекул свободной воды в связанное состояние [46].

Американская ассоциация банков крови рекомендует применять глицерин в низкой или высокой концентрации для консервирования КЭ замораживанием [9]. Технологию с использованием низкой концентрации глицерина, преимущественно используют в биохранилищах с жидким азотом (-196°C), с

высокой конечной концентрацией криопротектора - при замораживании биообразцов КЭ в электроморозильниках при -80°C . Отмечен опыт успешного переливания размороженных эритроцитов, хранившихся 21 год при -196°C [124].

Впервые низкотемпературное консервирование суспензии ЯККМ под защитой глицерина осуществили Barness D.W., Loutit I.F. (1955 г.), применив двухэтапное замораживание [55]. В нашей стране глицерин является разрешенным к применению криопротектором для ЯККМ. В сообщениях Федотенкова А.Г. и соавт. (1974 г.) отмечают, что при криоконсервировании костного мозга в растворе ЦОЛИПК-1 с добавлением 20% раствора глицерина и катионной сыворотки сохраняется до 85 % жизнеспособных клеток [74]. Технология двухэтапного (двухступенчатого) замораживания ГСК признана наиболее щадящим режимом низкотемпературного консервирования [74]. Pegg D.E. (1997 г.), подводя итоги собственных исследований костного мозга при двухэтапном режиме замораживания, хранении при -196°C и медленном оттаивании миелоидной ткани, сделал вывод о сравнимой клинической эффективности трансплантации свежееизготовленного (нативного) материала и криоконсервированного под защитой глицерина. Холодный А.Я. и соавт. (1984 г.) использовали трансфузии посмертного костного мозга, криоконсервированного под защитой 15 % раствора глицерина, для купирования гипоплазии кроветворения после химиотерапии у больных раком шейки матки [75]. Однако применение глицерина в более широких масштабах ограничено необходимостью удаления этого криопротектора из деконсервированных клеток, что ведет к дополнительным их повреждениям [42]. Эти обстоятельства предопределили интерес к поискам веществ, усиливающих криозащитные функции глицерина в малых концентрациях.

Совершенствование методов криоконсервирования КДК и ЯККМ с целью поддержания энергетического обмена в размороженных клетках, уменьшения токсичности и побочных воздействий, а также направленное на усиление репаративных процессов в клеточной суспензии после замораживания-

оттаивания, позволило создать рецептуры многокомпонентных сред, в состав которых, наряду с криопротекторами, были введены «реставрирующие» добавки: углеводы, белки плазмы, биологически активные соединения, соли, противомикробные препараты, антиоксиданты и другие вещества [42, 53, 55].

Во многих работах подчёркивается зависимость сохранности клеток от скорости проникновения криопротектора внутрь биообъекта, молекулярной массы и видовой принадлежности клеток [25, 37, 64, 102]. Так, белковые компоненты сыворотки являются защитной средой для специфических антител, однако они не обеспечивают полного сохранения активности антител [37, 44, 108]. Известные стабилизирующие составы для консервирования препаратов положительных сывороток крови включают углеводы, например, сахарозу и глюкозу, пептидные и/или смесь пептидных и углеводных компонентов [10, 13, 25, 67]. Однако такие стабилизаторы не обеспечивают длительное хранение препаратов, а также, не сохраняют исходные параметры сыворотки в ИФА. Никольченко А.Ю. (1997) описывает хорошие результаты при использовании 10% глицерина для криоконсервации белков сыворотки крови [46].

Из данных литературы известно, что некоторые пектины могут влиять на процессы кристаллизации растворов криопротекторов и их смеси с клетками. Например, яблочный пектин в присутствии гидрофильных веществ, таких как глицерин, создает стойкую гелеобразную структуру и тем самым повышает осмолярность смеси, что сопровождается понижением температуры замерзания раствора [20].

В условиях хранения в закрытом флаконе при постоянных рН и температуре основным повреждающим фактором для молекул иммуноглобулинов являются также перекисные радикалы. Применение антиоксидантов направлено на ограничение развития окислительных процессов и увеличение сохранности антител. Например, витамин С может окисляться различными видами веществ, которые могут быть вовлечены в заболевания человека [122, 127]. Соответствующие виды химических соединений, которые получают электроны и

восстанавливаются витамином С подразделяют на несколько классов: 1) соединения с неспаренными электронами (радикалами), такими как связанные с кислородом радикалы (супероксид, гидроксильный радикал, пероксильные радикалы), серные радикалы и азот-кислородные радикалы [115]. За исключением серных радикалов, эти соединения иногда называют активными формами кислорода и активными нитрогенами; 2) соединения, которые являются реакционноспособными, но не являются радикалами, включая хлорноватистую кислоту, нитрозамины и другие нитрозамещающие соединения, соединения, связанные с азотистой кислотой, и озон; 3) соединения, которые образуются в результате реакции с любым из первых двух классов, а затем реагируют с витамином С; 4) реакции, опосредованные переходным металлом, с участием железа и меди [115].

На сохранность биообразцов сывороток значительно влияет бактериальное загрязнение на этапах получения, транспортировки и хранения. Наиболее апробированным и эффективным бактериостатическим веществом является тиомерсал (мертиолят -торговая марка Eli Lilly and Company), также известный под наименованием тимеросал, который относится к классу ртутьорганических соединений с выраженным антисептическим и противогрибковым действием. Тиомерсал широко применяется в фармацевтической промышленности в составе вакцин и других инъекционных биопрепаратов с 1930-х годов [86]. Эффективная доза тиомерсала содержит 49,6% ртути (Hg), при этом была доказана эффективность в концентрациях от 0,001% до 0,01% в отношении широкого спектра патогенов. В вакцинах, рекомендованных для прививания детей, концентрация тиомерсала варьирует от 0,005% до 0,01% (12,5 мкг Hg до 25 мкг Hg на дозу 0,5 мл) [86].

Таким образом, описанные в научной литературе способы использования технологий глубокого замораживания совместно с криозащитными соединениями разного типа, позволили определить направления нашего поиска по разработке оптимальных условий длительного хранения диагностических сывороток с

антителами к тканевым паразитарным болезням в криогенной среде.

1.4. Особенности формирования и применения коллекций биологического материала в мире и в Российской Федерации

Коллекции биологических материалов - от образцов тканей до целых организмов - являются ровесниками научной биологии и восходят, по меньшей мере, к XVII в. [93, 103, 119, 120]. Можно вспомнить роль, которую сыграли гербарии в структуре «естественной истории». Однако более целенаправленные работы по созданию упорядоченных по единым принципам, потенциально комплементарных собраний биоматериала, включающих целые организмы, органы, образцы тканей, культуры клеток для хранения в банках микро- и макроэкологических природных и биологических ресурсов стали предметом широкого теоретического обсуждения в 90-е гг. 20 века [8, 93, 104, 105].

Анализ зарубежной литературы последних тридцати лет позволяет констатировать достаточно устойчивую тенденцию увязывать технологии хранения в хранилищах биообразцов с наличием двух обязательных компонентов, которые составляют концептуальное ядро термина «биобанк»: 1) наличие двух взаимосвязанных типов сохраняемого материала – биологических образцов и соответствующих им информационных данных, включающих всю доступную фенотипическую, социометрическую и генотипическую информацию образца (история болезни, результаты клинических, инструментальных и лабораторных исследований); 2) наличие потребительских запросов разных типов биообразцов для исследовательских целей и коммерческих предложений (разработки с использованием биоматериала, применение биоматериала в испытаниях) [89, 98, 99]. Наличие устойчивого спроса на качественные стандартизированные коллекции различных видов биологического материала со стороны растущего числа хорошо финансируемых исследовательских проектов в области биотехнологий, эпидемиологии, фармакологии и др. способствовало

формированию новой индустрии – «биобанкинга», структурной основой которого является биобанк [85, 89, 90, 111]. Более того, созданные банки естественных биоресурсов используются базовой системой глобального мониторинга по контролю сохранности природного биоразнообразия и факторов-риска, изменяющих их инфраструктуру на популяционном уровне, и являются важным аспектом построения эффективной системы биологической защиты [94, 121, 123]. Концепция биологической безопасности предусматривает предотвращение потенциальных и реальных биологических угроз на разных уровнях биориска [6, 48, 123]. Для реализации поставленных задач реконструкция Национального Банка сывороток крови (НБС) явилась стратегическим направлением здравоохранения в России и в мире [39, 58, 120, 126]. Согласно распоряжению Правительства Российской Федерации с 2009 года воссоздан Национальный Банк сывороток, одной из приоритетных функций которого является создание глобальной системы мониторинга инфекционной и паразитарной заболеваемости, контроля и прогноза развития эпидемического процесса [6, 48, 54, 121]. Решение поставленных задач сопровождается функционированием НБС по созданию биобанка паспортизированных коллекций биообразцов, систематизация которых позволяет отслеживать и оценить состояние популяционного иммунитета населения и рассчитать угрозы возникновения и распространения социально значимых и опасных инфекционных и паразитарных заболеваний на отдельных территориях [56, 69, 88, 97]. Стандартизированные образцы сыворотки крови населения постоянно пополняют коллекции Центров по контролю заболеваемости в США, Франции, Германии, Дании, Испании, Швейцарии, Италии, Португалии и в других странах [59, 60, 92, 125]. В настоящее время создана глобальная сеть мониторинга биобезопасности с использованием информационных ресурсов НБС 26 стран-участников, насчитывающая более 20 ассоциированных членов, в том числе из России [12, 95, 107, 112].

В рамках функционирования НБС необходима инвентаризация коллекции сывороток ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им.

И.М.Сеченова, которая насчитывает около десяти тысяч образцов сыворотки, охарактеризованных по наличию антител к антигенам разных возбудителей паразитарных болезней. На протяжении многих лет коллекция является научно-прикладной базой для разработки отечественных медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) [19, 66]. По данным отдельных выборочных исследований сохранность исходных параметров сыворотки снижается с течением времени в связи с не соответствующими современным представлениям условиями хранения [23, 26, 83, 84].

Таким образом, в рамках воссозданного НБС Российской Федерации актуально создание коллекции образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитарными болезнями для сероэпидемиологического мониторинга.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Методы исследований

Для выполнения поставленных задач был использован комплекс аналитических, экспериментальных, серологических и статистических методов, которые обеспечивали реализацию и оценку результатов экспериментальных исследований.

Экспериментальные исследования проведены с использованием образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus*, *T.canis* и *Cysticercus cellulosae*, хранящихся в коллекции ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова. Образцы хранились в микропробирках типа «Эппендорф» по 1.0 мл. Замораживание образцов проводилось по двухступенчатой схеме, при температурах -20° и -40°С.

Исходно образцы проб крови отбирались в вакутейнеры по 3-4 мл без добавления каких-либо наполнителей, в соответствии с действующими методическими указаниями [63].

2.2. Схема экспериментальных исследований

Работы проводились поэтапно. С анализом достигнутых результатов определялся план последующих серий экспериментальных исследований.

I этап. Проведены исследования сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis*, которые хранились в низкотемпературных условиях при -40°С без использования стабилизаторов и криоконсервантов.

II этап. Экспериментальным путем определён криопротективный эффект разных концентраций раствора глицерина при длительном (один год) хранении образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при -20°, -40°С и, как альтернативный способ, при -196°С.

III этап. Экспериментальным путем созданы многокомпонентные стабилизирующие составы путем подбора действующих компонентов и их эффективных концентраций при длительном хранении (один год) в разных температурах замораживания.

2.3. Реактивы, тест - наборы, оборудование, использованные в работе

В экспериментальной работе использованы оборудование, материалы, реактивы для проведения метода ИФА, регламентированные в методических указаниях МУ 3.2.1173-02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней». Применялись тест-системы Токсокарроз-IgG-ИФА – Бест (производство Вектор-бест Россия), Эхинококк-IgG-ИФА – Бест (производство Вектор-бест Россия), а также *Taenia solium* IgG для исследования сывороток с антителами к *S.cellulosae* (производство R-Biopharm AG Германия). Иммуноферментный анализ проводился в соответствии со стандартным протоколом анализа, изложенным в паспорте-инструкции тест-систем, содержащем также информацию о порядке сбора и подготовки образцов к исследованию, описание принципа постановки метода и о мерах безопасности при работе с биообразцами. Применяемые тест-системы на момент проведения исследований по условиям и срокам хранения соответствовали комплектности поставки и контрольным параметрам качества.

Воспроизводимость результатов при измерении концентрации антител к тканевым паразитозам в параллельной постановке на разных сериях тест-систем одного производителя в ходе экспериментальных работ была подтверждена и составила 97% (табл. 2.3.1).

Таблица 2.3.1.

Контроль воспроизводимости диагностических тест - систем

		Общее количество	Совпадение значения (с учетом общей лабораторной ошибки)	Изменение значения
<i>E.granulosus</i>	Серия 165	30	29	1
	Серия 174	30		
<i>T.canis</i>	Серия 274	30	29	1
	Серия 281	30		

Для стабилизирующего состава в качестве компонентов были использованы промышленные химические соединения: глицерин ч.д.а. (ГОСТ 6259-75) [14], аскорбиновая кислота, тиомерсал (тимеросал мертиолят натрия, орто-этилртутьтиосалицилат натрия, $C_9H_9HgNaO_2S$), высокоэтерифицированный яблочный пектин. Все растворы стерилизовали автоклавированием при 1,2 атм в стеклянных флаконах на 250 мл. Стерильные препараты хранили при комнатной температуре в темном помещении до 2 месяцев

Фотометрические измерения оптической плотности в лунках планшета проведены на автоматическом ИФА - анализаторе Titertek Multiskan фирмы Flow Laboratories, представляющем собой одноканальный фотометр с волновым диапазоном 340-750 нм для выполнения анализа по конечной точке. Учет результатов производился при длине волны 450 нм. Для криогенной консервации образцов сыворотки крови использовали дюары фирмы ОАО «НПО ГЕЛИЙМАШ» вместимостью 25 л (производство Россия). Образцы сыворотки крови замораживали в пробирках для криоконсервации фирмы NUNC с внешней резьбой объемом 1.0 мл.

2.4. Объем, направления и результаты исследований

Всего исследован 771 образец сыворотки крови, выполнено 7198 исследований. Направления, объекты, показатели и объем исследований представлены в таблице 2.4.1.

Таблица 2.4.1.

Направления, объекты, показатели и объем исследований

Направления	Объекты	Показатели	Объем
1. Исследование коллекционных образцов сыворотки крови с антителами к <i>C.cellulosae</i> и <i>T.canis</i> с длительными сроками хранения в коллекции ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова	Коллекционные образцы сыворотки крови с антителами к <i>C.cellulosae</i> и <i>T.canis</i>	Сохранность сыворотки крови с антителами к <i>C.cellulosae</i> и <i>T.canis</i> в коллекционных образцах сыворотки крови со сроками хранения свыше 10 лет.	305 образцов сыворотки крови с антителами к <i>C. cellulosae</i> - 53 образца; к <i>T.canis</i> -252 образца постановка проб в дубликатах х2= 610 исследований
2. Экспериментальный подбор эффективных концентраций глицерина и наиболее оптимальных температурных режимов длительного хранения образцов сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i>	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> .	Сохранность сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> с применением 10% глицерина в разных температурных условиях: -20°, -40°,-196°C	230 образцов сыворотки крови , из них - с антителами к <i>E.granulosus</i> без криопротекторов - 55 образцов с криопротекторами - 60 образцов; - с антителами к <i>T.canis</i> без криопротекторов - 55 образцов , с криопротекторами - 60 образцов исследования после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2 = 1380 исследований
	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> .	Эффективность разных концентраций глицерина для хранения сывороток с антителами к <i>T.canis</i> в разных температурных условиях: -20°,-40°,-196°C	12 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> Исследования с 11 концентрациями глицерина и в контроле без консерванта после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2= 864 исследования

Продолжение таблицы 2.4.1.

3. Экспериментальный подбор композиции стабилизирующего состава и оценка его эффективности для длительного хранения сывороток крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> .	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> .	Эффективность разных концентраций пектина для хранения сывороток с антителами к <i>T.canis</i> в разных температурных условиях: -20°, -40°, -196°C	12 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> Исследования с 5 концентрациями пектина и в контроле без него после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2= 432 исследования
		Эффективность разных концентраций двухкомпонентного состава «пектин + глицерин» для хранения сывороток с антителами к <i>T.canis</i> в разных температурных условиях: -20°, -40°, -196°C	12 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> исследования по 5 параметрам композиции консерванта и в контроле без него после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2 = 432 исследования
		Эффективность разных концентраций состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» на основе состава «глицерин + пектин» для хранения сывороток с антителами к <i>T.canis</i> в разных температурных условиях: -20°, -40°, -196°C	12 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> Исследования основы пектин + глицерин с 12 концентрациями аскорбиновой кислоты и тиомерсала и в контроле без консерванта после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2 = 936 исследований
	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> .	Эффективность разных концентраций стабилизирующего состава для хранения сывороток с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> . в разных температурных условиях: -20°, -40°, -196°C	80 образцов сыворотки крови с антителами к <i>E.granulosus</i> и <i>T.canis</i> Исследовали по 3 параметрам стабилизирующего состава и в контроле без консерванта после хранения при -20°, -40°, -196°C в параллельной постановке в двух лунках х2 = 1920 исследований

Продолжение таблицы 2.4.1.

4. Расчёт систематической погрешности в условиях повторяемости (смещение)	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> и <i>E.granulosus</i>	Погрешность результатов измерений	48 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T. canis</i> и <i>E. granulosus</i> в параллельной постановке в 8 лунках = 384 исследования
5. Расчёт воспроизводимости результатов исследования сывороток крови с антителами к <i>T.canis</i> и <i>E.granulosus</i> в двух сериях тест-систем.	Образцы сыворотки крови с антителами к <i>T.canis</i> и <i>E.granulosus</i>	Воспроизводимость результатов измерений на разных сериях тест-систем.	60 образцов сыворотки крови с антителами к <i>T. canis</i> и <i>E. granulosus</i> в параллельной постановке в двух сериях в 2 лунках х2 = 240 исследований
Всего исследован 771 образец сыворотки крови, выполнено 7198 исследований			

2.5. Оценка результатов

Сыворотки крови выбирались случайно из ряда коллекционных образцов с положительными результатами к *E.granulosus* со значением от 30 до 100 АЕ и к *T.canis* со значением ИП от 2,81 до 11,60 (титр от 1:400 до 1:3200). Также предварительно были проведены исследования сохранности образцов сыворотки с антителами к *C.cellulosae*, хранящихся в коллекции института со значением ИП от 1,1 до 3,5.

Сравнение результатов тестирования индивидуальных образцов было произведено с учетом неопределенности измерения, учитывающей возможные погрешности на этапах взятия, подготовки и проведения исследований проб, включая отбор порций проб, калибровки стандартных образцов, технических свойств оборудования, а также физических параметров производственной среды. Суммарная лабораторная ошибка (TE) рассчитывалась из составляющей систематической погрешности в условиях повторяемости (смещение) (B) и случайной составляющей погрешности (SD) по формуле Brooks Z. (2002) [87]:

$$TE = (B) + 2SD$$

или

$$\%TE = (\%B) + 2CV\%,$$

где CV – коэффициент вариации, B – смещение, SD – случайное составляющее погрешности.

Значение коэффициента вариации для планшетного анализа регламентировано ГОСТ Р 51352-99 и составляет не более 8% [15].

Лабораторная составляющая систематической погрешности в условиях повторяемости (смещение) в наших опытах составила 2,61%. Согласно инструкции по применению тест - наборов производитель закладывает величину расчетной суммарной лабораторной ошибки - 15%. В наших экспериментах TE составила с учетом диапазона коэффициента вариации $13,6 \pm 4\%$, и статистически не отличалась от заданных производителем на всех этапах экспериментальных

работ.

Оценка результатов экспериментальных исследований проводилась методом ИФА. Учету и исследованию ИФА не подлежали и отбраковывались образцы сыворотки с механическими повреждениями пробирки в процессе замораживания (их было до 25%); образцы, при визуальной оценке имеющие выраженное помутнение и/или выпадение осадка. Количество образцов сыворотки с сохранными исходными параметрами антител оценивали в долях от общего количества образцов в эксперименте и выражали как показатель сохранности (%). Изменением исходных параметров образцов считалось отклонение уровней антител сывороток крови на величину большую суммарной лабораторной ошибки ($13,6 \pm 4\%$), в том числе серонегативность.

Для удобства исследования диапазона эффективности концентраций стабилизирующих добавок рассчитывали среднее арифметическое значение (М), этого диапазона: $M = \Sigma(V) / n$

где V – это значения показателей всех концентраций внутри диапазона;

n - число исследуемых значений.

2.6. Статистическая обработка результатов исследования

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление, корректировка, систематизация исходной информации и визуализация полученных результатов осуществлялись в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Статистический анализ проводился с использованием программы IBM SPSS Statistics v.23 (разработчик - IBM Corporation) [45].

Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона, позволяющего оценить значимость различий между фактическим количеством исходов или качественных характеристик выборки, попадающих в

каждую категорию, и теоретическим количеством, которое можно ожидать в изучаемых группах при справедливости нулевой гипотезы [109].

Вначале рассчитывалось ожидаемое количество наблюдений в каждой из ячеек таблицы сопряженности при условии справедливости нулевой гипотезы об отсутствии взаимосвязи. Для этого перемножались суммы рядов и столбцов (маргинальных итогов) с последующим делением полученного произведения на общее число наблюдений. Затем рассчитывалось значение критерия χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

где i – номер строки (от 1 до r), j – номер столбца (от 1 до c) O_{ij} – фактическое количество наблюдений в ячейке ij , E_{ij} – ожидаемое число наблюдений в ячейке ij .

Значение критерия χ^2 сравнивалось с критическими значениями для $(r - 1) \times (c - 1)$ числа степеней свободы. В том случае, если полученное значение критерия χ^2 превышало критическое, делался вывод о наличии статистической взаимосвязи между изучаемым фактором риска и исходом при соответствующем уровне значимости [118].

Построение прогностической модели риска определенного исхода выполнялось при помощи метода бинарной логистической регрессии. Выбор метода обусловлен тем, что зависимая переменная является дихотомической, а независимые переменные характеризуют как категориальные, так и количественные признаки. Прогностическая модель имеет следующее математическое выражение:

$$P = \frac{1}{1 + e^{-z}},$$

$$z = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n,$$

где p - вероятность возникновения изучаемого исхода, $x_1...x_n$ - значения факторов риска, измеренные в номинальной, порядковой или количественной шкале, $a_1...a_n$ - коэффициенты регрессии.

Отбор независимых переменных производился методом пошаговой прямой селекции с использованием в качестве критерия исключения статистики Вальда. Статистическая значимость полученной модели определялась с помощью критерия χ^2 .

Мерой определенности, указывающей на ту часть дисперсии, которая может быть объяснена с помощью логистической регрессии, в нашем исследовании служил показатель Найджелкерка [117].

Критерий достоверности результатов оценивался по $P(\chi^2 \text{ Пирсона}) \leq 0,05$.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЯ СОХРАННОСТИ АНТИТЕЛ К *E.GRANULOSUS* И *T.CANIS* В ОБРАЗЦАХ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ПАРАЗИТАРНЫМИ БОЛЕЗНЯМИ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ

3.1. Исследование сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *C.cellulosae* и *T.canis* в коллекции ИМПТ и ТЗ им Е.И Марциновского Первого МГМУ им.И.М.Сеченова

Предварительно для оценки эффективности регламентированных режимов хранения исследовали сохранность исходных параметров сывороток крови с антителами к *C.cellulosae*, хранящихся в коллекции института на протяжении 10 и более лет (табл. 3.1.1).

Таблица 3.1.1.

Результаты исследования диагностических сывороток крови с антителами к *C.cellulosae*, хранящихся в коллекции института на протяжении 10 и более лет

Год	Всего	Результат	
		Сохранение параметров	Изменение параметров
Более 10 лет	6	2	4
2006-2007	12	5	7
2008-2009	12	5	7
2010-2011	12	3	9
2012-2013	11	6	5

Результаты оценивали сравнением показателей, полученных при постановке ИФА с архивными показателями этих сывороток из электронной базы данных ИМПТ и ТЗ им Е.И.Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова (Сеченовский

университет).

Для проведения исследований случайно формировалась выборка из образцов сыворотки крови с различными уровнями антител, после чего каждый образец был тестирован методом ИФА. Близость точных значений результатов анализа каждого биообразца оценивалась с учетом неопределенности измерений, а для определения «количественного совпадения» или оценки зависимости рядов данных использовался критерий $P(\chi^2 \text{ Пирсона}) \leq 0,05$.

За 10 лет хранения около 70% образцов сыворотки крови с антителами к *S.cellulosae* утратили свои исходные уровни антител. При этом после первого года хранения (2012-2013 гг.) доля сохранных образцов сыворотки крови не превышала 55%.

Показатель сохранности образцов сыворотки крови, заложенных на хранение в 2010-2011 гг., отличается от других показателей резким снижением до 25%, что, по нашему мнению, могло быть связано с отключением электроэнергии. В связи с этим результаты сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *S.cellulosae* по срокам хранения не имели статистически значимых различий $P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,162$.

Без учёта данных 2010-2011 гг., полученные результаты имеют линейную зависимость между параметрами сохранности и сроками хранения: с увеличением сроков хранения уменьшается доля сывороток крови с сохранным уровнем антител.

В рамках работы провели аналогичные исследования сывороток крови с антителами к *T.canis* (табл. 3.1.2).

Таблица 3.1.2.

Результат исследования сывороток крови с антителами к *T.canis*, хранящихся в коллекции института на протяжении 10 и более лет

Год	Всего	Результат		
		Сохранение параметров	Изменение параметров	Отбраковка
2005	36	4	29	3
2006	36	7	25	4
2012	36	14	22	0
2013	36	14	20	2
2014	36	16	18	2
2015	36	18	16	2
2016	36	20	16	0

Между параметрами сохранности и сроками хранения в этой группе исследований также наблюдалась линейная зависимость (рис. 3.1.1).

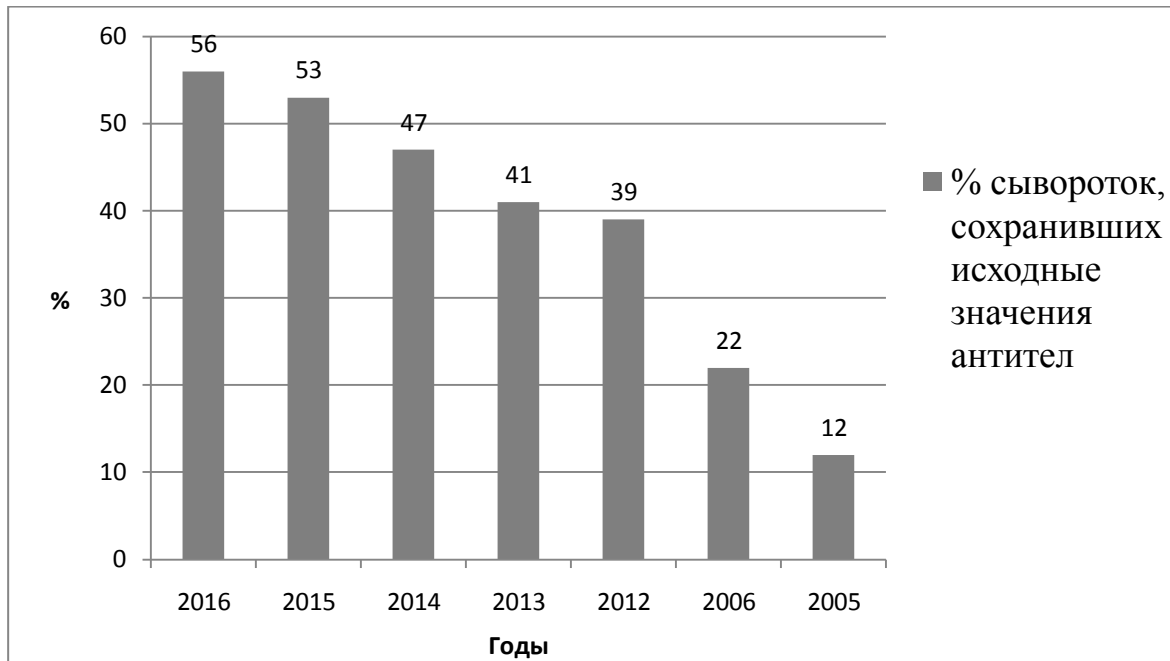


Рисунок 3.1.1. Показатель сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis* в зависимости от сроков хранения

Как видно из рисунка, с 2005 года исходный уровень антител утратили 90% сывороток крови с антителами к *T.canis* в период хранения (12 лет). В течение первого года хранения доля сохраненных образцов сыворотки крови не превышала 56%.

Для определения возможных сроков хранения провели парное сравнение результатов тестов сгруппированных по годам хранения образцов сыворотки крови (табл.3.1.3).

Таблица 3.1.3.

Парное сравнение показателя сохранности в зависимости от сроков хранения образцов сыворотки крови

Годы	Доля сохранных образцов (показатель сохранности)	P (критерий χ^2 Пирсона)
2005-2006	12%-22%	0,206
2006-2012	22%-39%	0,125
2006-2013	22%-41%	0,077
2006-2014	22%-47%	0,026
2005-2013	12%-41%	0,003
2012-2016	39%-56%	0,099

Статистически значимое отличие показателя сохранности получены при сравнении испытуемых образцов сыворотки крови в группах от 2006 г. и 2014 г (P (χ^2 Пирсона) =0,026) и 2005 г. и 2013 г.(P (χ^2 Пирсона) =0,003). При сравнении других групп значимых отличий не наблюдалось: 2005 г. и 2006 г (P (χ^2 Пирсона) =0,206); 2006 г. и 2012 г (P (χ^2 Пирсона) =0,125); 2006 г. и 2013 г (P (χ^2 Пирсона) =0,077); 2012 г. и 2013 г (P (χ^2 Пирсона) =0,099)

Таким образом, без применения криопротекторов и стабилизирующих веществ 90% коллекционных образцов сыворотки крови не сохранили исходный уровень антител к *T.canis* после хранения более 10 лет, 44% - после одного года в условиях, регламентированных в нормативно-методических документах. При этом статистически значимые различия параметров сохранности сывороток крови с антителами к *T. canis* получены при сравнении испытуемых образцов сыворотки после 8 лет хранения.

3.2 Определение сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* с применением разных концентраций глицерина

Экспериментальные испытания длительного хранения образцов диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при применении разных концентраций глицерина в температурных режимах: -20°C, -40°C и впервые в условиях жидкого азота проводились с учетом данных литературы об его использовании в качестве криопротектора клеток крови в концентрации от 20% до 70% в зависимости от методов замораживания [73, 78]. Наши исследования были начаты с применения раствора глицерина в концентрации 10%, так как эту концентрацию успешно применяли для криоконсервации белков сыворотки крови (Никольченко А.Ю., 1997), но научных и литературных данных его эффективности применительно к образцам сыворотки с антителами к тканевым паразитарным болезням не найдено.

Для проведения исследований случайно формировалась выборка из образцов сыворотки крови с различными уровнями антител, после чего каждый образец был тестирован методом ИФА. Близость точных значений результатов анализа каждого биообразца также как и на первом этапе исследования оценивалась с учетом неопределенности измерений, а для определения «количественного совпадения» или оценки зависимости рядов данных использовался критерий $P (\chi^2 \text{ Пирсона}) \leq 0,05$ (табл. 3.2.1).

Таблица 3.2.1.

Результат исследования диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* после длительного хранения (один год) с применением 10% р-ра глицерина

Температура		-20°C					-40°C					-196°C				
Образцы	Наличие консерванта	Количественное распределение сывороток в зависимости от полученного результата														
		Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
Сыворотки с антителами к <i>E. granulosus</i>	10% глицерин	60	33	10	12	5	60	37	15	5	3	60	38	9	7	6
	Контроль (без глицерина)	55	17	22	12	4	55	27	22	5	1	55	29	18	4	4
Сыворотки с антителами к <i>T.canis</i>	10% глицерин	60	34	13	8	5	60	36	7	11	6	60	39	13	3	5
	Контроль (без глицерина)	55	15	29	5	6	55	28	22	4	1	55	27	19	3	6

Были сформированы группы испытаний образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*: 1) без добавления криоконсервантов (контрольная) и 2) с добавлением 10% р-ра глицерина (рис. 3.2.1).

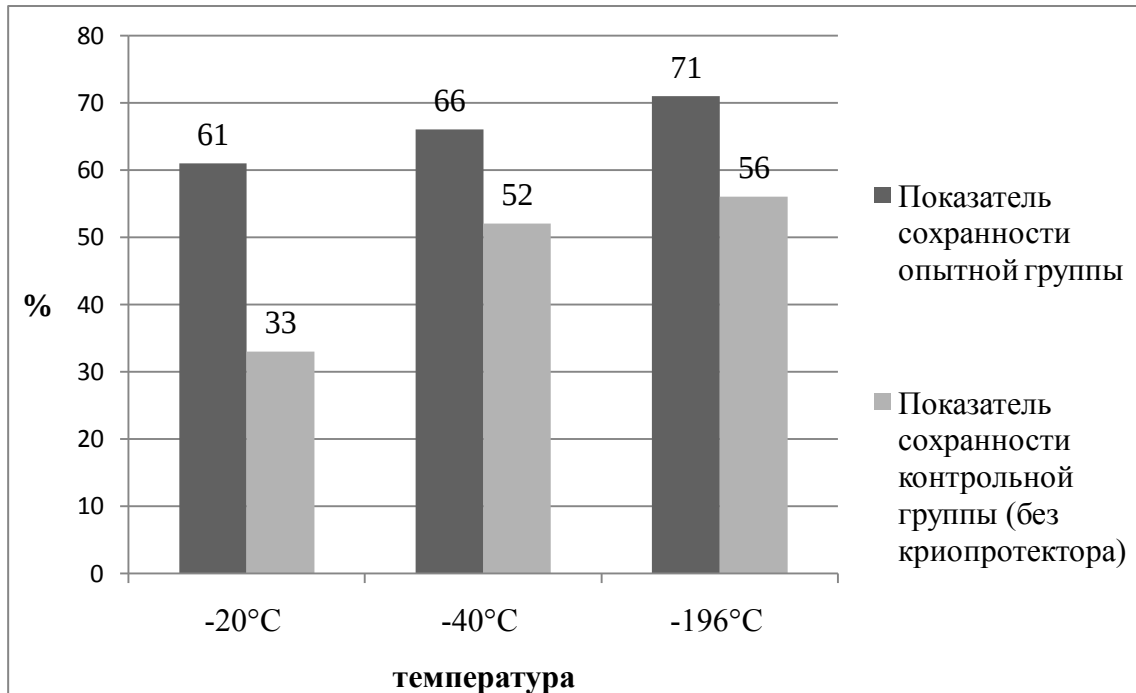


Рисунок 3.2.1. Показатели сохранности диагностических сывороток с антителами к *E. granulosus* и к *T. canis* при разных температурных режимах хранения с применением 10% р-ра глицерина

Как видно из рисунка, образцы в контрольной группе характеризуются низкой сохранностью, показатель которой не превышает 32% в условиях хранения при -20°C, 51% при -40°C и 56% при -196°C, что сравнимо с полученными результатами на первом этапе исследований и данными научной литературы. Установлено, что не существует статистически значимого различия в хранении диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при -40°C и -20°C ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,123$), что подтверждает обоснованность регламентных условий. Однако полученные новые данные говорят об отсутствии статистически значимых отличий между сохранностью испытуемых образцов сыворотки крови при -196°C и -40°C ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,240$), что можно использовать для выбора приоритетных условий хранения биообразцов в

зависимости от целей и сроков хранения. Показатель сохранности в криогенной среде достоверно выше, чем при их хранении при -20°C ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,007$), что позволило продолжать экспериментальные исследования со сверхнизкими температурами их хранения.

Диагностические сыворотки крови с антителами как к *E. granulosus*, так и к *T.canis* достоверно лучше хранятся с применением 10% глицерина, чем без его применения ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,001$). Применение криоконсерванта повысило показатель сохранности образцов при длительном их хранении (один год) при -20°C до 62%; при -40°C до 67%; в условиях криоконсервации до 71%.

Влияние температуры и консерванта на сохранность испытуемых образцов сыворотки оценивалось с помощью логистической регрессии. Согласно расчетам, температурный режим -40°C и ниже обеспечивает сохранность сыворотки в 2 раза (от 1,4 до 3,6 раз) с учетом среднеквадратичной ошибки (0,249) при условии, что другие предикторы остаются неизменными, а наличие консерванта (без изменения других предикторов) улучшает качество хранения в 2,2 раза (от 1,1 до 3,7 раз) с учетом среднеквадратичной ошибки (0,304), что следует из анализа 95% доверительного интервала для EXP (В). Применяемая модель регрессии статистически значима $\chi^2=17,54$; $P=0,0001$ и рассчитывалась только для температуры -20°C и -40°C (в связи с отсутствием статистических отличий в условиях хранения при -40°C и -196°C). Модель правильно классифицировала 62% случаев (табл.3.2.2).

Таблица 3.2.2.

Расчет значений переменных в уравнении логистической регрессии при применении 10% р-ра глицерина

Параметры хранения	В	Среднеквадратичная ошибка	Значение Р	Exp (В)	95% доверительный интервал для EXP(В)	
					Нижний	Верхний
Глицерин 10%	0,795	0,249	0,001	2,214	1,358	3,609
-40°C	0,706	0,304	0,020	2,027	1,117	3,678
-20°C	0,502	0,302	0,097	1,652	0,913	2,989

Далее провели сравнительный анализ показателей сохранности испытуемых образцов сыворотки крови в опытных группах, сформированных по видовой принадлежности - с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* в равных условиях эксперимента (рис. 3.2.2).

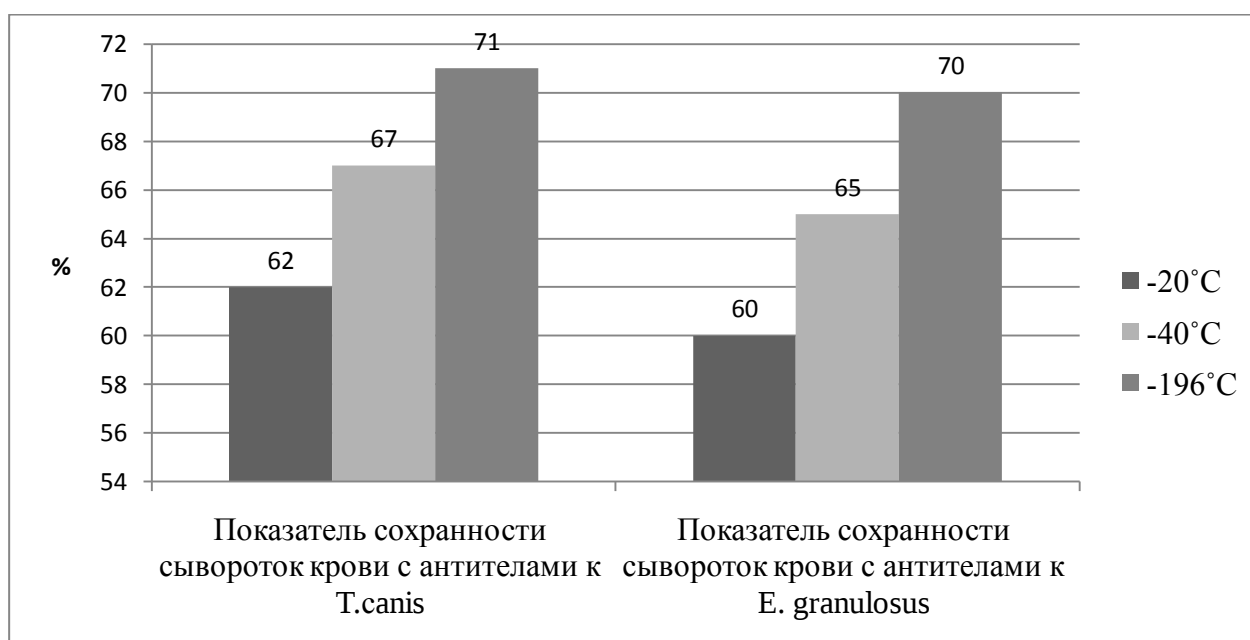


Рисунок 3.2.2. Сравнительная характеристика показателей сохранности образцов диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* после года хранения с 10% глицерином

Как видно из рисунка, при равных условиях хранения показатель сохранности образцов сыворотки с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* составил 60% и 62% при -20°C, 65% и 67% при -40°C, 70% и 71% при -196°C соответственно. Статистически значимых различий в показателях не выявлено ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,158$).

В связи с этим определение эффективных концентраций глицерина в диапазонах от 1 до 78% проводилось в серии экспериментальных исследований 12 групп образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis*. Сыворотки крови для анализов отбирались случайно из общей выборки с различными уровнями антител (табл 3.2.3).

Таблица 3.2.3.

Результат исследования диагностических сывороток крови после длительного хранения (один год) с применением разных концентраций глицерина

Температура		-20°C					-40°C					-196°C				
Группа испытаний	Экспериментальные концентрации	Количественное распределение сывороток в зависимости от полученного результата														
		Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
I	Контроль (без глицерина)	12	4	4	2	2	12	6	4	1	1	12	6	5	0	1
II	1-3 %	12	5	4	1	2	12	6	3	2	1	12	6	4	1	1
III	4-7 %	12	8	2	1	1	12	7	3	2	0	12	7	3	2	0
IV	8-11 %	12	8	1	2	1	12	8	2	1	1	12	8	4	0	0
V	12-15 %	12	8	1	2	1	12	8	3	0	1	12	8	3	1	0

Продолжение таблицы 3.2.3.

VI	16-19 %	12	7	3	2	0	12	6	3	2	1	12	8	2	1	1
VII	20-23 %	12	7	2	3	0	12	5	4	2	1	12	5	5	2	0
VIII	24-34 %	12	5	3	2	2	12	5	4	2	1	12	5	4	2	1
IX	35-45 %	12	2	6	2	2	12	4	3	3	2	12	3	4	3	2
X	46-56 %	12	2	5	3	2	12	2	6	2	2	12	2	7	2	1
XI	57-67 %	12	1	7	2	2	12	1	6	3	2	12	2	7	2	1
XII	68-78 %	12	1	3	5	3	12	1	5	4	2	12	0	6	3	3

Результаты ИФА подсчитывались с учетом суммарной лабораторной ошибки. Качественная оценка эффективности испытуемых концентраций глицерина проводилась при сохранности не менее 60% образцов, полученной при испытании 10% р-ра глицерина (табл.3.2.4).

Таблица 3.2.4

Качественная оценка сохранности образцов сыворотки с применением разных концентраций глицерина при длительном хранении (один год) при разных температурах замораживания

Группы испытаний	Концентрации глицерина (об.%)	М	Температура хранения		
			-20°C	-40°C	-196°C
0	Контроль (без глицерина)	-	-	-	-
I	1-3	2 ± 1	-	-	-
II	4-7	$5,5 \pm 1.5$	+	-	-
III	8-11	$9,5 \pm 1.5$	+	+	+
IV	12-15	$13,5 \pm 1.5$	+	+	+
V	16-19	$17,5 \pm 1.5$	-	-	+
VI	20-23	$21,5 \pm 1.5$	-	-	-
VII	24-34	29 ± 5	-	-	-
VIII	35-45	40 ± 5	-	-	-
IX	46-56	51 ± 5	-	-	-
X	57-67	62 ± 5	-	-	-
XI	68-78	73 ± 5	-	-	-

Как видно из таблицы, в контрольной группе без применения глицерина при заданных условиях хранения образцов сыворотки крови показатель сохранности составил менее 60%, что сопоставимо с результатами первого этапа и литературными данными. В группах III, IV, с концентрациями глицерина в пределах от 8% до 15% при всех температурах замораживания получен показатель сохранности не менее 60%, также результаты удовлетворяющие условиям испытаний достигнуты в группе II при -20°C и в группе V при -196°C. Проведен статистический анализ данных по группам испытуемых концентраций глицерина (табл.3.2.5).

Таблица 3.2.5

Сравнительная оценка результатов между группами с различной концентрацией глицерина

Категории	Группы	P (критерий χ^2 Пирсона)
A	0, I, VI, VII	0,912
B	II, III, IV, V	0,848
C	VIII, IX, X, XI	0,113

Достоверность статистических различий между группами оценивалась по критерию P (χ^2 Пирсона) $\leq 0,05$.

С учетом показателя достоверности различий и для упрощения аналитических процедур испытуемые группы условно были объединены в категории A, B, C:

- Категория A включала в себя группы I, VI, VII с концентрациями глицерина 1-3%, 20-23 %, 24-34 % и контрольную группу;
- Категория B включала в себя группы II, III, IV, V с концентрациями глицерина 4-7 %, 8-11 %, 12-15%, 16-19 %;
- Категория C включала в себя группы VIII, IX, X, XI с концентрациями глицерина 35-45 %, 46-56 %, 57-67 %, 68-78 %.

Статистические различия эффективности испытуемых концентраций глицерина оценивали парно между группами в разных категориях при $P (\chi^2 \text{ Пирсона}) \leq 0,05$ (табл. 3.2.6).

Таблица 3.2.6.

Сравнительная оценка результатов между категориями испытаний

Категории испытаний	P (критерий χ^2 Пирсона)
А и В	0,004
В и С	0,0001
А и С	0,0001

Статистически значимые различия эффективностей концентраций глицерина достоверны в группах II, III, IV, V (категория В), применение которых обеспечило сохранность испытуемых образцов в условиях экспериментальных испытаний.

Таким образом, способ криоконсервации был впервые использован для длительного хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*. Получены новые данные об отсутствии достоверных различий испытуемых параметров сохранности образцов при их хранении в низкотемпературных режимах -40°C и -196°C ($P (\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,240$), что можно интерпретировать как равнозначную возможность применения разных способов хранения биообразцов, в электрических морозильниках или в условиях криоконсервации, в зависимости от целевых задач (в лабораторной медицине или в НБС). В режимах замораживания -40°C и -196°C показатели сохранности испытуемых образцов были в 2 раза выше показателей сохранности при -20°C , указанных в регламентных документах.

Впервые на данном этапе экспериментальных исследований было установлено, что применение 10% р-ра глицерина позволяет обеспечить сохранность испытуемых биообразцов с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*: 61%

при -20°C ; 66% при -40°C ; 71% при -196°C в течение одного года хранения в условиях эксперимента и улучшает показатель сохранности по сравнению с контрольной группой в 2,2 раза. При равных условиях хранения видовых статистически значимых различий между показателями сохранности образцов сыворотки с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* не выявлено ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,158$).

Также доказана эффективность криопротективного действия глицерина в диапазоне испытуемых концентраций от 4 до 19%, которые обеспечивали сохранность не менее 60% образцов сыворотки в условиях эксперимента. По итогам проведенных исследований было обнаружено, что высокие концентрации глицерина, несмотря на сильное криопротективное действие, нарушают исходное соотношение антител в сыворотке и значительно изменяют количественные показатели анализа.

Показатель сохранности не менее 60%, полученный при испытании 10% р-ра глицерина, в последующих этапах экспериментальных исследований был нами определен в качестве критерия оценки эффективности испытываемых стабилизаторов разных типов.

3.3. Разработка двух- и многокомпонентных стабилизирующих составов для оптимизации условий хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*

3.3.1. Определение эффективности действия двухкомпонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин»

Для изучения криоконсервирующего эффекта раствора глицерина в диапазонах низких концентраций в группах I, II, III, IV, V (согласно данным табл. 3.2.4) в эксперименты был введен пектин, обладающий свойством

гелеобразования, которое усиливается в данной комбинации [20]. Предварительно опытным путем были проведены испытания эффективности разных концентраций пектина от 0,05% до 0,59% (3.3.1.1).

Таблица 3.3.1.1.

Результат исследования диагностических сывороток крови после длительного хранения (один год) с применением разных концентраций пектина

Температура	-20°С					-40°С					-196°С				
Экспериментальные концентрации пектина, об. %	Количественное распределение сыворотки в зависимости от полученного результата														
	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
Контроль	12	4	5	2	1	12	6	3	2	1	12	6	4	1	1
0,05-,15	12	5	3	3	1	12	6	5	1	0	12	7	4	1	0
0,16-0,26	12	8	2	1	1	12	6	4	1	1	12	7	3	2	0
0,27-0,37	12	8	2	1	1	12	8	3	0	1	12	6	3	2	1
0,38-0,48	12	8	4	0	0	12	8	2	1	1	12	8	3	0	1
0,49-0,59	12	6	3	2	1	12	7	3	2	0	12	6	3	1	2

Качественным способом оценивались показатели сохранности испытуемых образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis* в условиях аналогичных испытаниям глицерина (табл. 3.3.1.2).

Таблица 3.3.1.2.

Качественная оценка сохранности образцов сыворотки с применением разных концентраций пектина при длительном хранении

Концентрации пектина (об.%)	М	Температура хранения		
		-20°C	-40°C	-196°C
Без консерванта	-	-	-	-
0,05-0,15	0,1±0,05	-	-	-
0,16-0,26	0,21±0,05	+	-	-
0,27-0,37	0,32±0,05	+	+	-
0,38-0,48	0,43±0,05	+	+	+
0,49-0,59	0,54±0,05	-	-	+

Из полученных данных видно, что стабилизирующие свойства пектина проявлялись в диапазонах концентрации 0,16-0,26% при -20 °С; 0,27-0,37 % при -20 °С, -40 °С; 0,49-0,59% при -196 °С; 0,38-0,48 % при -20 °С, -40 °С, -196 °С.

В серии экспериментальных исследований проведены испытания синергетических эффектов 2-компонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин» на сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis* (табл. 3.3.1.3).

Таблица 3.3.1.3.

Результаты исследования образцов сыворотки крови после длительного хранения (один год) с применением разных концентраций композиционного состава «глицерин + пектин»

Температура	-20°С					-40°С					-196°С				
Экспериментальные концентрации глицерина и пектина (об.%)	Количественное распределение сыворотки в зависимости от полученного результата														
	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
Контроль	12	4	5	2	1	12	6	3	2	1	12	7	4	1	0
1-3 + 0,05-0,15	12	9	2	0	1	12	9	2	1	0	12	8	2	1	1

Продолжение таблицы 3.3.1.3.

4-7 + 0,16-0,26	12	10	1	1	0	12	9	2	0	1	12	10	2	0	0
8-11 + 0,27-0,37	12	9	1	1	1	12	10	2	0	0	12	10	2	0	0
12-15 + 0,38-0,48	12	8	3	1	0	12	9	2	1	0	12	8	2	1	1
12-15 + 0,38-0,48	12	7	3	1	1	12	7	2	2	1	12	8	3	1	0

Для определения статистических различий были использованы все испытуемые концентрации пектина с глицерином I, II, III, IV, V групп разведений (табл. 3.3.1.4).

Таблица 3.3.1.4.

Эффективность двухкомпонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин» при длительном хранении образцов сыворотки крови

группы СС	Концентрации глицерина и пектина (об.%)	М	Эффективность СС, %		
			-20°C	-40°C	-196°C
0	(Без консерванта) Контроль	-	36	55	58
I	1-3+0,05-0,15	$(2 \pm 1) + (0,1 \pm 0,05)$	82	75	73
II	4-7+0,16-0,26	$(5,5 \pm 1,5) + (0,21 \pm 0,05)$	83	82	83
III	8-11+0,27-0,37	$(9,5 \pm 1,5) + (0,32 \pm 0,05)$	82	83	83
IV	12-15+0,38-0,48	$(13,5 \pm 1,5) + (0,43 \pm 0,05)$	67	75	73
V	16-19+0,49-0,59	$(17,5 \pm 1,5) + (0,54 \pm 0,05)$	64	64	67

Полученные результаты показывают низкую сохранность образцов сыворотки крови в контрольной группе: 36% при -20°C; 55% при -40°C; 58% при -196°C. При этом криопротективная эффективность стабилизирующих составов в опытных группах составила:

I СС: 82% при -20°C; 75% при -40°C; 73% при -196°C;

II СС: 83% при -20°C; 82% при -40°C; 83% при -196°C;

III СС: 82% при -20°C; 83% при -40°C; 83% при -196°C;

IV СС: 67% при -20°C; 75% при -40°C; 73% при -196°C;

V СС: 64% при -20°C; 64% при -40°C; 67% при -196°C

при длительном (один) год хранения биообразцов в условиях эксперимента.

Результаты исследований опытных групп стабилизирующего состава «глицерин + пектин» сравнивали с полученными данными в контрольной группе (табл. 3.3.1.5).

Таблица 3.3.1.5.

Сравнительная оценка результатов исследований между опытными группами СС «глицерин + пектин» и контрольной группой

Группы испытаний	P (критерий χ^2 Пирсона)
0 и I	0,009
0 и II	0,003
0 и III	0,001
0 и IV	0,017
0 и V	0,042

Достоверность результатов оценивалась по $P (\chi^2 \text{ Пирсона}) \leq 0,05$. Результаты испытаний во всех опытных группах достоверно отличались от результатов в контрольной группе.

Таким образом, применение двухкомпонентного СС «глицерин + пектин» позволило повысить сохранность испытуемых образцов до 83% по сравнению с эффективностью моно - компонентных стабилизирующих растворов (до 71%).

Применение двухкомпонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин» в пределах концентраций глицерина от 1% до 19% и пектина от 0,05% до 0,59% обеспечило сохранность от 64% до 83% образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis* при всех температурных режимах длительного (один год) хранения в условиях эксперимента.

Для дальнейших испытаний были использованы I, II и III двухкомпонентные стабилизирующие составы, показатели эффективности которых при всех режимах хранения составили не ниже 82%, и были достоверно выше результатов с применением моно - консерванта, 10% р-ра глицерина ($P (\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,002$).

3.3.2. Определение эффективности действия состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» на базе стабилизирующего состава «глицерин + пектин»

В ходе проделанных экспериментальных работ основной отсев испытуемых образцов происходил по причине визуально выраженного помутнения образцов, или выпадения осадка. Для устранения сопутствующих длительному хранению факторов, таких как окисление биообразцов и бактериальное обсеменение, проводился подбор эффективных концентраций состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» [86, 115]. В образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis* с I, II и III двухкомпонентными стабилизирующими составами «глицерин + пектин» вносились в разных дозах растворы аскорбиновой кислоты и тиомерсала. Образцы закладывались на хранение в условиях низкотемпературных режимов замораживания. Результаты ИФА подсчитывались с учетом суммарной лабораторной ошибки (табл. 3.3.2.1).

Таблица 3.3.2.1.

Результат исследования образцов сыворотки крови после длительного хранения с применением композиционного состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» на основе композиционного состава «глицерин + пектин»

Т			-20°С					-40°С					-196°С				
СС	Варианты экспериментального подбора концентраций	Композиционные составы «аскорбиновая кислота» и «тиомерсал» (об.%)	Количественное распределение сыворотки в зависимости от полученного результата														
			Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
Контроль	-	-	12	4	4	4	0	12	6	4	2	0	12	7	4	1	0
I	1.1.	0,1-0,9 + 0,20-0,25	12	11	1	0	0	12	9	2	1	0	12	9	2	1	0
	1.2.	0,01-0,09 + 0,1-0,15	12	11	1	0	0	12	10	1	1	0	12	9	3	0	0
	1.3.	0,001-0,009 + 0,01-0,05	12	11	1	0	0	12	9	3	0	0	12	9	3	0	0

Продолжение таблицы 3.3.2.1.

I	1.4.	0,0001-0,0009 + 0,001-0,005	12	10	2	0	0	12	9	2	1	0	12	9	2	1	0
II	2.1.	0,1 - 0,9 + 0,20-0,25	12	11	1	0	0	12	10	2	0	0	12	10	2	0	0
	2.2	0,01-0,09 + 0,1-0,15	12	11	1	0	0	12	11	1	0	0	12	10	2	0	0
	2.3	0,001-0,009 + 0,01-0,05	12	11	1	0	0	12	10	2	0	0	12	10	2	0	0
	2.4.	0,0001-0,0009 + 0,001-0,005	12	10	2	0	0	12	11	1	0	0	12	9	2	1	0

Продолжение таблицы 3.3.2.1.

III	3.1.	0,1-0,9 + 0,20-0,25	12	10	2	0	0	12	11	1	0	0	12	11	1	0	0
	3.2	0,01-0,09 + 0,1-0,15	12	11	1	0	0	12	11	1	0	0	12	11	1	0	0
	3.3	0,001-0,009 + 0,01-0,05	12	11	1	0	0	12	10	2	0	0	12	11	1	0	0
	3.4	0,0001-0,0009 + 0,001-0,005	12	10	2	0	0	12	10	2	0	0	12	10	2	0	0

Эффективность сочетанных действий стабилизирующих составов оценивалась по показателю сохранности биообразцов в течение одного года (табл. 3.3.2.2).

Таблица 3.3.2.2.

Эффективность стабилизирующего действия-состава «аскорбиновая кислота + тиомерсал» на основе состава «глицерин + пектин» при длительном хранении

СС «глицерин + пектин»	Варианты подбора	Концентрации растворов «аскорбиновая кислота» и «тиомерсал» (об.%)	М	Эффективность СС, %		
				-20°C	-40°C	-196°C
0	0	Контроль	-	33	50	58
I	1.1.	0,1-0,9 +0,20-0,25	(0,5±0.4) + (0,225 ± 0,025)	92	75	75
	1.2.	0,01-0,09+0,1-0,15	(0,05±0,04) +(0,125 ± 0,025)	92	83	75
	1.3.	0,001-0,009+0,01-0,05	(0,005±0,004) +(0,03±0,02)	92	75	75
	1.4.	0,0001-0,0009+0,001-0,005	(0,0005±0,0004)+(0,003±0,002)	83	75	75
II	2.1.	0,1-0,9+0,20-0,25	(0,5±0.4) + (0,225±0,025)	92	83	83
	2.2	0,01-0,09+0,1-0,15	(0,05 ± 0,04) +(0,125± 0,025)	92	92	83
	2.3	0,001-0,009+0,01-0,05	(0,005±0,004) +(0,03 ± 0,02)	92	83	83
	2.4.	0,0001-0,0009+0,001-0,005	(0,0005±0,0004)+ (0,003±0,002)	83	92	75

Продолжение таблицы 3.3.2.2.

III	3.1.	0,1-0,9+0,20-0,25	$(0,5 \pm 0,4) + (0,225 \pm 0,025)$	83	92	92
	3.2	0,01-0,09+0,1-0,15	$(0,05 \pm 0,04) + (0,125 \pm 0,025)$	92	92	92
	3.3	0,001-0,009+0,01-0,05	$(0,005 \pm 0,004) + (0,03 \pm 0,02)$	92	83	92
	3.4	0,0001-0,0009+0,001-0,005	$(0,0005 \pm 0,0004) + (0,003 \pm 0,002)$	83	83	83

Результаты испытаний эффективности сложнокомпонентных стабилизирующих составов показали, что при применении разных концентраций испытуемых компонентов «аскорбиновая кислота + тиомерсал», выполненных на основе двухкомпонентных стабилизирующих составов «глицерин + пектин», показатель сохранности биообразцов составил:

- 92% в группах СС 1.1-1.3 при -20°C;
- 92% - в СС 2.1-2.3 при -20°C и СС 2.2 при -40°C;
- 92% - в СС 3.2-3.3 при -20°C; в СС 3.1 – 3.2 при -40°C; в СС 3.1 – 3.3 при -196°C.

Полученные результаты в опытных группах достоверно выше показателей в контрольной группе ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,03$).

С целью статистического подтверждения полученных результатов на большей выборке были проведены дополнительные испытания образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* в количестве по 40 образцов с применением эффективных концентраций испытанных ранее криопротекторов и их сочетаний в составе стабилизирующих растворов I, II, III с контрольной группой - без добавления заявляемого стабилизирующего состава (табл. 3.3.2.3, 3.3.2.4). Для чего в опытах были рассчитаны и применены среднеарифметические значения диапазонов эффективных концентраций криопротективных веществ.

Таблица 3.3.2.3.

Концентрации компонентов стабилизирующих составов (об. %)

СС	I		II		III	
Стабилизатор	концентрация	М	концентрация	М	концентрация	М
Глицерин	1,0-3,0	2,0±1,0	4,0-7,0	5,5± 1,5	8,0 -11,0	9,5 ± 1,5
Пектин	0,05-0,15	0,1 ± 0,05	0,16-0,26	0,21±0,05	0,27-0,37	0,32± 0,05
Тиомерсал	0,01-0,15	0,08±0,07	0,01-0,15	0,08±0,07	0,01-0,15	0,08±0,07
Аскорбиновая кислота	0,01-0,09	0,05±0,04	0,01-0,09	0,05±0,04	0,01-0,09	0,05±0,04
Вода	остальное	-	остальное	-	остальное	-

Таблица 3.3.2.4.

Результат исследования образцов сыворотки крови после длительного хранения (один год) с применением оригинальных стабилизирующих составов

Температура	-20°С					-40°С					-196°С				
СС	Количественное распределение сыворотки в зависимости от полученного результата														
	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка	Общее количество	Сохранение	Снижение	Повышение	Отбраковка
Контроль	80	28	19	26	7	80	40	22	13	5	80	43	25	8	4
I	80	72	6	2	0	80	60	15	5	0	80	60	16	4	0
II	80	71	6	3	0	80	76	3	1	0	80	64	16	0	0
III	80	72	7	1	0	80	76	4	0	0	80	76	4	0	0

Эффективность испытанного многокомпонентного стабилизирующего состава, обеспечивающего сохранность образцов сыворотки крови при паразитозах в течение одного года, представлена на рисунке 3.3.2.1.

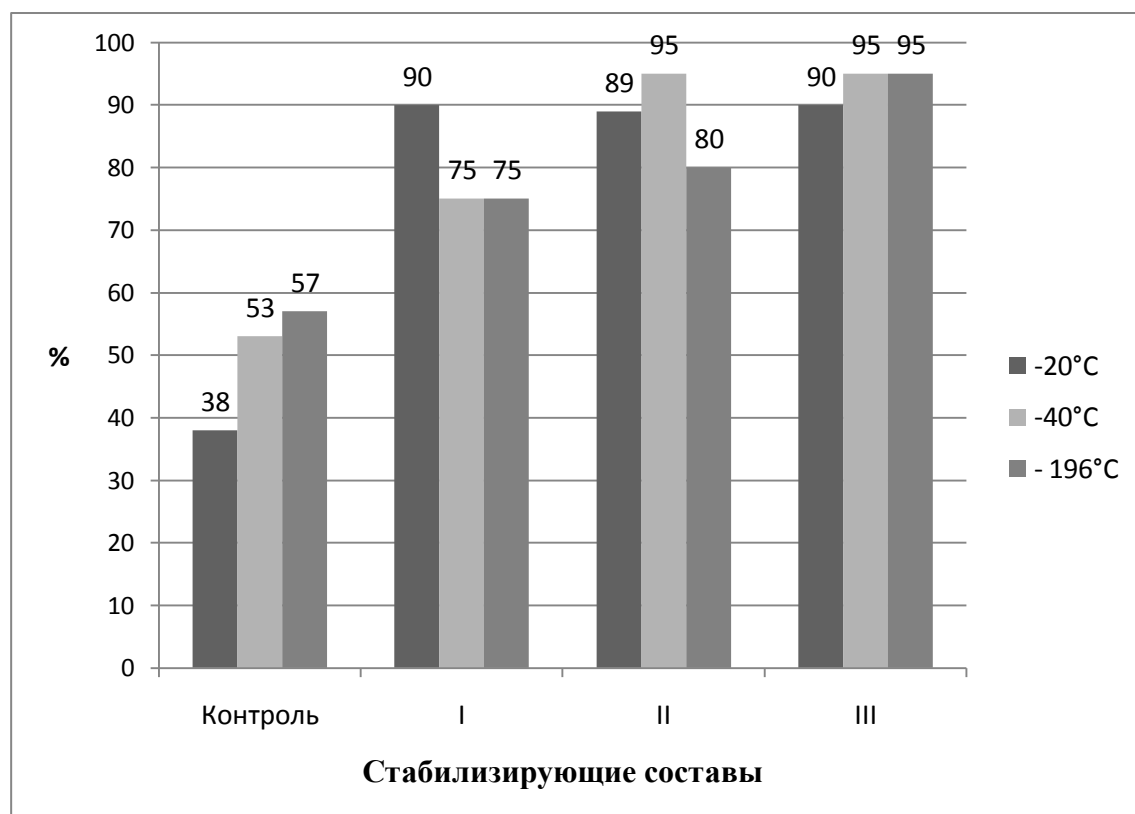


Рисунок 3.3.2.1. Сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при применении разработанного оригинального стабилизирующего состава

Как видно из рисунка, уровни показателей сохранности образцов сыворотки крови в контрольной группе составили 38% при -20°C; 53% при -40°C; 57% при -196°C; в опытных группах:

I – 90% при -20°C; 75% при -40°C и 75% при -196°C;

II – 89% при -20°C; 95% при -40°C; 80% при -196°C;

III - 90% при -20°C; 95% при -40°C; 95% при -196°

Применение разработанных многокомпонентных стабилизирующих составов обеспечивает сохранность образцов сыворотки крови с антителами к

E.granulosus и *T.canis* в течение одного года: 90% при -20°C (СС I); 95% при -40°C (СС II); 90% при -20°C, 95% при -40 и -196° С (СС III).

Полученные данные достоверно подтверждают высокую сохранность, 90 - 95%, диагностических сыворотки при применении стабилизирующих растворов I, II, III по сравнению с сохранностью сывороток крови в контрольной группе - без добавления криопротекторов (57%). Показатель достоверности (P (χ^2 Пирсона) = 0,03.

Для сравнительного анализа статистической значимости эффективностей СС I, II, III проведено парное сравнение полученных результатов с учетом P (критерий χ^2 Пирсона) $\leq 0,05$ (табл. 3.3.2.5).

Таблица 3.3.2.5.

**Парное сравнение результатов испытаний разных композиций
разработанного стабилизирующего состава**

Группы испытаний	P (критерий χ^2 Пирсона)
I и II	0,049
II и III	0,161
I и III	0,001

Отсутствие статистических различий эффективностей получено между СС II и СС III, что подтверждает возможность их равнозначного использования для поставленных экспериментом целей.

Таким образом, были получены новые статистически значимые данные о возможности применения пектина в диапазонах концентраций от 0,05 до 0,37% в качестве стабилизирующего компонента для достижения криопротективной эффективности 4 - 19%. растворов глицерина. По сравнению с эффективностью применения однокомпонентных стабилизирующих растворов от 61 до 71% применение двухкомпонентного стабилизирующего состава «глицерин + пектин» в указанных концентрациях обеспечило сохранность от 64% до 83% образцов

сыворотки крови с антителами к *T.canis* при всех температурных режимах длительного (один год) хранения в условиях эксперимента $P (\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,002$.

Получены новые статистически значимые данные о качественном улучшении условий хранения образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T. canis* с добавлением аскорбиновой кислоты и тиомерсала в стабилизирующий состав «глицерин + пектин», при применении которых сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* в течение одного года составила 90-95%.

Получен патент Российской Федерации № 2704134 на охрану авторских прав на изобретение нового способа хранения сывороток крови с антителами к возбудителям паразитарных болезней с применением разработанного оригинального стабилизирующего состава (приложение 2).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнение данной работы соответствовало задачам стратегического развития здравоохранения РФ в области формирования паспортизированных коллекций Национального Банка Сывороток для осуществления непрерывного мониторинга, контроля и прогноза развития паразитарной заболеваемости населения. Широкое распространение и высокий уровень клинических осложнений тканевых паразитарных болезней, серологическая диагностика которых является методом верификации диагноза, определили цель и задачи нашего исследования по оптимизации условий хранения диагностических сывороток с возможностью их использования в более отдаленные периоды времени.

Экспериментальные исследования, выполненные в рамках настоящей научной работы, методически были построены на проверке надежности условий хранения регламентированных в нормативно-методических документах и поэтапных испытаниях разных физических (низкие температуры) и химических (криопротекторы) факторов, способствующих повышению сохранности исходных уровней антител к тканевым паразитарным болезням в образцах сыворотки крови человека.

При сравнении данных указанных в разных нормативных документах [16, 63] мы заметили ряд несоответствий, размытость и ограниченность возможных сроков хранения. Что влечет за собой различные интерпретации применения их на практике и различную степень сохранности при длительном хранении. В связи с этим наши исследования включали эксперименты с изучением влияния сверхнизких температур на сохранность исходных уровней антител в образцах сыворотки крови к тканевым паразитарным болезням и разработку способа стабилизации этих параметров.

Предварительно в клинико-диагностической лаборатории Института Медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им.

Е.И.Марциновского Первого МГМУ им. И.М.Сеченова были проведены исследования образцов сыворотки с антителами к *C.cellulosae*. Полученные данные показали, что сохранность исходных уровней антител в положительных образцах, хранящихся в регламентных условиях, составляет не более 55% от общего числа исследованных сывороток крови после одного года хранения. С увеличением срока хранения образцов сыворотки, хранящихся в коллекции института до 10 и более лет, показатель их сохранности снижался до 33%, что делало коллекцию сывороток крови непригодной для последующего использования в диагностических целях и мониторинга послеоперационных больных.

На первом этапе исследований мы проверили эффективность длительного хранения образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитарным болезням на примере сывороток крови с антителами к *T.canis* замороженных по двухступенчатой схеме при -20° и -40°C без применения стабилизирующих добавок, что соответствует регламентам хранения, изложенным в действующих нормативно-методических документах. Результаты нашего исследования также выявили низкий показатель сохранности сывороток, который совпал с таковым в исследовании с сыворотками крови с антителами к *C.cellulosae* (не более 55% от общего числа исследованных сывороток крови после одного года хранения). С увеличением срока хранения образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis*, хранящихся в коллекции института до 12 лет и более, показатель их сохранности снижался до 12%

Статистически значимое отличие доли сывороток крови с исходным уровнем антител к *T. canis* наблюдалось в группе испытаний, хранящихся 8-мью годами ранее. Достоверность результата подтверждалась статистическим расчетом для сывороток 2006 – 2014 гг. хранения ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,026$); 2005-2013 гг. ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,003$). Полученные результаты соответствовали описанным в литературе данным о наступающем гидролизе и необратимых изменениях физико-химического состояния биообразца, снижающие

функциональные свойства антител (Hong Y., Hao H.J., Xie Y.C., Wang Q., Li H.F., 2014 г.). Более того, хранение биообразцов в условиях электрических морозильников ненадежно по техническим причинам, таким как отключение электроэнергии вызывающее неуправляемый цикл размораживание / замораживание. По этой причине, как мы полагаем, на предварительном этапе исследований сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *C.cellulosae* 2010 - 2011 гг. хранения была низкой и составила не более 25%. В связи с этим возникает необходимость регулярной инвентаризации коллекции, что является обязательной процедурой контроля качества при хранении в электрических морозильниках.

Принимая во внимание данные Борисова О.Н. (2014 г.) о том, что наряду с гибелью клеток в результате развития в них процесса кристаллизации, клетки могут повреждаться в зоне температур до фазового перехода воды в лед, то есть вблизи 0°C [7], были теоретически обоснованы схемы проведения экспериментов с учетом современных представлений о криоконсервации и стабилизации компонентов крови [40, 41, 65, 105].

Основываясь на полученных предварительных данных, на втором этапе были проведены экспериментальные исследования и проанализированы показатели сохранности положительных сывороток с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при разных температурных режимах (-20°C, -40°C и впервые в криогенной среде при -196°C). Выявлено достоверное различие в хранении диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при температуре хранения -196° и -20°C без применения стабилизаторов ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,007$). Также было отмечено, что различия показателей сохранности образцов сыворотки крови при -196°C и -40°C статистически незначимы ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,240$) без применения стабилизаторов, что на практике может означать преимущественный выбор одной наиболее удобной технологии длительного хранения. Возможно данное обстоятельство следует интерпретировать схожими процессами агрегации белковых молекул замороженной сыворотки крови при -196°C и -40°C. В

литературе этот процесс изучался на примере замораживания СПКЧ до -196°C и дальнейшем хранении в жидком азоте в течение 12 месяцев [73]. При этом сравнительная оценка эффективности длительного хранения испытуемых биообразцов при разных температурных режимах позволила получить новые данные о преимуществе криогенного замораживания, как с применением, так и без применения криопротективных добавок. И это явилось новизной исследовательской работы.

Из данных литературы, (Никольченко А.Ю., 1997 г.), известно успешное применение 10% раствора глицерина, испытанное на белках сыворотки крови. В наших исследованиях впервые за счёт применения 10% р-ра глицерина удалось достигнуть показателя сохранности 60-71% образцов диагностических сывороток крови при хранении в разных температурных режимах, что достоверно выше результатов контрольной группы ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,001$). Известные из литературы, для сохранения клеток крови высокие концентрации глицерина в наших исследованиях экспериментально себя не подтвердили: эффективность категории С с группами концентраций от 35 до 78% была достоверно хуже категории В с группами концентраций от 4 до 19% ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,0001$), показатель сохранности биообразцов не превышал 38% что не соответствовало условиям эксперимента.

Далее для повышения показателя сохранности экспериментальные исследования проводились методом подбора эффективных концентраций стабилизирующих химических соединений разных типов для разработки двухкомпонентного, а затем многокомпонентного стабилизирующего состава, что явилось ноухау в научной практике проведения серологических исследований. В качестве оценки эффективности концентраций, нами был принят критерий сохранности, полученный при испытании 10% р-ра глицерина - не менее 60% от общего количества испытуемых образцов. Теоретической предпосылкой данного раздела исследований явились литературные данные об использовании разных стабилизирующих добавок и сложнокомпонентных составов в медицинской

практике хранения биоматериалов [40, 41, 65, 105]. По оценочным критериям сложнокомпонентный стабилизирующий состав должен, во-первых, способствовать сохранению активности антител в условиях низких и ультранизких температур (-20°C , -40°C , -196°C); во-вторых, предотвращать появление ложноположительного сигнала за счет неспецифической сорбции компонентов сыворотки и роста патогенной микрофлоры; в-третьих, оказывать протекцию от повреждающего действия перекисных радикалов, образующихся в закрытом контейнере при длительном хранении.

По своей химической природе список веществ, используемых для стабилизации антител, достаточно широк и разнообразен, от небольших по молекулярной массе соединений до биомакромолекул.

В наших исследованиях для усиления криопротективной активности мы выбрали глицерин, пектин, аскорбиновую кислоту и тиомерсал, исходя из доступности в закупке, ценовой политики и приоритета их аннотации в научной литературе.

Известен эффект, создающийся при сочетанном действии пектина с низкими концентрациями глицерина: образуется стойкая гелеобразная структура, повышающая осмолярность смеси, что сопровождается понижением температуры замерзания раствора и таким образом, влияет на процессы кристаллизации растворов криопротекторов и их смеси с биообразцами [20, 50]. Полученные результаты эффективного действия композиции «глицерин + пектин», соответствуют данным литературы.

В наших экспериментах криопротективная активность глицерина в отношении образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитарным болезням присутствию высокоэтерифицированного яблочного пектина достоверно увеличилась ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,002$).

Следующие серии экспериментальных испытаний были основаны на использовании сведений из литературы о влиянии окислительных процессов и бактериального роста на сохранность биологических образцов (Padayatty S.J. at

all.2003 г., Gołoś A., Lutyńska A., 2015 г.). В условиях хранения в закрытом флаконе при постоянных рН и температуре основным повреждающим фактором для молекул иммуноглобулинов являются, по-видимому, перекисные радикалы. Антиоксиданты, направленные на ограничение развития окислительных процессов, увеличивают сохранность исходных концентраций антител. Таким образом, для увеличения антиокислительной устойчивости сывороток в состав стабилизатора была введена аскорбиновая кислота, которая используется для связывания перекисных радикалов [115].

Для предотвращения бактериального загрязнения в качестве вещества с выраженным бактериостатическим эффектом нами был использован тиомерсал (мертиолят - торговая марка Eli Lilly and Company), который широко применяется в фармацевтической промышленности в составе вакцин и других инъекционных биопрепаратов [96]. В этой группе испытаний не было вскрытых в процессе замораживания и забракованных вследствие видимого помутнения или выпадения осадка пробирок.

Таким образом, обобщая теоретические данные и сведения экспериментов по подбору эффективных композиционных смесей с выраженным криопротективным действием, нами был разработан сложнокомпонентный стабилизирующий состав, состоящий из глицерина в диапазоне концентраций от 1 до 11 об. %; аскорбиновой кислоты - 0,01-0,09 об. %; тиомерсала - 0,01-0,15 об. % и высокоэтерифицированного яблочного пектина в концентрациях 0,05-0,37 об. %. В условиях эксперимента были достигнуты показатели сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*, отличающиеся в зависимости от состава от 90% до 95 %, что достоверно выше значений контрольной группы ($P(\chi^2 \text{ Пирсона}) = 0,003$).

В условиях эксперимента применение нового разработанного многокомпонентного стабилизирующего состава позволяет стандартизировать технологию хранения образцов сыворотки крови с антителами к тканевым

паразитарным болезням и упрощает их применение без дополнительных процедур очистки перед исследованием.

Таким образом, нами создан простой и надежный способ стабилизации сывороток крови с антителами к тканевым паразитарным болезням, применение которого оптимизирует условия длительного хранения образцов без изменения качественных свойств и значительных потерь их количественных показателей, что способствует достижению цели нашей научной работы.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментально доказано, что около 90% образцов диагностических сывороток с антителами к тканевым паразитарным болезням, хранящихся 10 и более лет в условиях, регламентированных действующими нормативно-методическими документами, не сохраняют исходный уровень антител, а 45% из них утрачивают диагностические параметры в течение первого года хранения.
2. Впервые экспериментально подтверждена высокая эффективность криоконсервации (-196°C) для длительного хранения образцов сыворотки крови с антителами к тканевым паразитарным болезням, что позволяет обеспечить сохранность 71% биообразцов в течение одного года хранения.
3. Получены данные о равной эффективности хранения образцов сыворотки крови с антителами к *E. granulosus* и *T.canis* в низкотемпературных режимах при -40°(51%) и -196°C (56%), что создает новые возможности их применения в зависимости от целей и задач лабораторной службы здравоохранения и (или) биобанкинга.
4. Впервые установлено, что применение 10% глицерина в качестве криопротектора повышает сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *E. granulosus* и *T.canis* в регламентированных условиях хранения до 61% при -20°C; 66% при -40° C, что достоверно выше показателей сохранности образцов без применения криопротектора.
5. Установлено, что применение двухкомпонентного стабилизирующего состава с добавлением пектина в диапазонах концентраций от 0,05 до 0,37% достоверно эффективнее (показатель сохранности - 83%) использования моноконсерванта - 10% раствора глицерина (показатель сохранности - 71%).
6. Доказано качественное улучшение условий хранения образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* с применением аскорбиновой кислоты и тиомерсала в стабилизирующий состав «глицерин + пектин», по сравнению с двухкомпонентным составом. Применение разработанного оригинального

стабилизирующего состава обеспечивает сохранность 90-95% образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* в условиях длительного (один год) хранения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение новых способов хранения диагностических сывороток позволит использовать метод «парных сывороток» для верификации исходных данных и динамических изменений уровней антител при оценке эффективности лечения и прогноза развития заболевания в период медицинского мониторинга состояния больных эхинококкозом и токсокарозом.

2. В лабораторной службе здравоохранения для сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при длительном хранении оптимально применение двухкомпонентного стабилизирующего состава глицерин (1 - 11%) + пектин (0,05 - 0,37%), в связи с простотой и экономичностью технологической процедуры их получения.

3. Применение сложнокомпонентного стабилизирующего состава рекомендовано для длительного хранения образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при выполнении долгосрочных научно-исследовательских, научно-практических работ, в том числе по мониторингу популяционного иммунитета населения, в рамках функционирования Национального Банка Сывороток.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЕ - антительные еденицы

ГСК - гемопоэтические стволовые клетки

ДАЛИ - количестве лет жизни, утраченных в результате инвалидности

ДМАЦ - диметилацетамид

ДМСО - диметилсульфоксид

ИЛЦ - испытательный лабораторный центр

ИП - индекс пробы

ИФА - иммуноферментный анализ

КДК - компоненты донорской крови

КДЛ- клиничко - диагностическая лаборатория

КНК - криопротекторы, непроникающие в клетки

КПК - криопротекторы, проникающие в клетки

КСД - криопротекторы смешанного действия

КЭ - концентрат эритроцитов

м.м - молекулярная масса

МИБП - медицинский иммунобиологический препарат

МУ - методические указания

НБС - Национальный Банк сывороток

ПГ - пропиленгликоль

р-р - раствор

СПКЧ - сыворотка плацентарной крови человека

СС - стабилизирующий состав

ЦОЛИПК - Центральный ордена Ленина институт переливания крови

ЭГ - этиленгликоль

ЯККМ - ядерные клетки костного мозга

В - систематическая погрешность в условиях повторяемости (смещение)

CV - коэффициент вариации

Hg – ртуть

M - среднее арифметическое значение

SD - случайная составляющая погрешности

TE - суммарная лабораторная ошибка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреев А.А., Садикова Д.Г., Тихомиров А.М., Фирсова А.В. Термомеханическое растрескивание и формирование микрочастиц льда при охлаждении криозащитных сред до температур жидкого азота // Теоретические и практические аспекты современной криобиологии материалы Международной заочной научно-практической конференции (Россия - Украина 24 марта 2014 г.) - Сыктывкар 2014.- С. 15 - 18.
2. Антонов М.М., Антонова Л.П., Бабченко И.В. Тканевые гельминтозы у взрослых и детей (эпидемиология, клиника, диагностика, лечение, профилактика) // Метод. Рекомендации. - СПб., 2004. - 29 с.
3. Асланова М.М., Черникова Е.А. Эпидемиологический мониторинг за паразитами // Здоровье населения и среда обитания. – 2013. - № 7 (244).- С. 22-24.
4. Асланова М.М., Черникова Е.А., Сыскова Т.Г. Паразитологический мониторинг как составная часть эпидемиологического надзора за гельминтозами в российской федерации // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2014. -№ 1. - С. 13-16.
5. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология // Калугина Ю.В., Никитина И.И. - Киев: Наукова думка, 1994. - С. 432.
6. Боев Б.В., Семененко Т.А., Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л. Актуальные проблемы создания информационно-аналитической системы для оперативного противодействия эпидемиям инфекционных заболеваний // Микробиология. – 2011. - № 6. -С. 37.
7. Борисова О.Н., Цкипури Ю.И., Беляева Е.А. Значение кристаллизации биологических жидкостей для повседневной практики и перспективы (научный обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2014. -№1. - С.150.

8. Вархотов Т.А., Гавриленко С.М., Аласания К.Ю., Стамбольский Д.В., Огородова Л.М., Брызгалина Е.В. Задачи социально-гуманитарного сопровождения создания национального банка-депозитария биоматериалов в России // Вопросы философии. – 2016.-№ 3.- С.124-138.
9. Венгелен Тайлер В., Бентсон К., Браун Р.Д. и др. Техническое руководство Американской ассоциации банков крови (ааВВ) / ESTM, 12 изд. – 2000.-1056 с.
10. Вонг Дзуан, Сача Грегори А., Нгуйен Фуонг М., Медведев В.Н. Лиофилизированные составы для антидота фактора Ха // ЕА201790415А1 20170831 2015.08.20.
11. Всемирная организация здравоохранения. эхинококкоз. Информационный бюллетень ВОЗ №377, март 2015 г. [Электронный ресурс].- URL:<https://www.who.int/>.
12. Всемирный центр гриппа Crick, промежуточные отчеты [Электронный ресурс].-URL:<http://www.crick.ac.uk/research/worldwide-influenzacentre/annual-and-interim-reports/> [дата обращения 11.08.15].
13. Гольтяев М.В., Каурова С.А., Кобелев А.В., Уграицкая С.В., Фесенко Е.Е., Швирст Н.Э., Шишова Н.В., Яшин В.А. Способ хранения клеточных культур в суспензии // патент России 0002660075 от 05.07.2018.
14. ГОСТ 6259-75 Глицерин. Технические условия (с Изменениями N 1, 2). - М., 1976.
15. ГОСТ Р 51352-99 Наборы реагентов для клинической лабораторной диагностики. Методы испытаний. - М., 1999.
16. ГОСТ Р 53079.4-2008 Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа. - М., 2008.
17. Грачёв А.Е. Влияние длительности хранения криоконсервированных эритроцитов на их качество и эффективность трансфузий: дис. ...канд. мед. наук. - Москва, 2013.- С.104.

18. Григорьева А.А., Гармаева С.Б., Яковенко С.А., Симоненко Е.Ю., Твердислов В.А., Долганова А.А., Апрышко В.П. Биофизические методы в криоконсервации гамет человека: модификация криопротектора яичным желтком // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2016. -№ 1-1. -С. 70-73.
19. Гришина Е.А., Черникова Е.А., Авдеева О.Н. Создание банка сывороток как необходимое условие формирования системы гарантии качества лабораторных исследований паразитарных заболеваний // Актуальные вопросы медицины XXI века. – Уфа, 2014. -С. 18-22.
20. Гулевский А. К. Эволюция стратегий холодоустойчивости насекомых / А. К. Гулевский, Л. И. Релина // Проблемы криобиологии. – 2011. - Т. 21, № 4. - С. 364-376.
21. Ермакова Л.А., Твердохлебова Т.И., Нагорный С.А., Пшеничная Н.Ю., Болатчиев К.Х. Анализ заболеваемости человека ларвальными гельминтозами (эхинококкоз, токсокароз, дирофиляриоз) в Российской Федерации // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017.- Т. 16, № 1 (92). -С. 43-46.
22. Ермакова Л.А., Твердохлебова Т.И., Пшеничная Н.Ю. Диагностическая значимость иммуноферментного анализа при ларвальных гельминтозах (трихинеллез, эхинококкоз, токсокароз) // Профилактическая и клиническая медицина. – 2012.- Т. 3, № 3.- С. 59 – 63.
23. Еропкин М.Ю. Биобанки и их роль в системах биобезопасности, здравоохранения, биотехнологии, экологии и «экономике знаний». 2015. [Электронный ресурс] doi 10.13140/RG.2.1.3229.7040.
24. Жибурт Е.Б. Трансфузиология: учебник.- СПб: Питер, 2002.- 736 с.
25. Жигалева О. Н., Шестюк В. М. Способ консервации биологических материалов // Патент России №2619898,19.05.2017.
26. 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.

27. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 1996 год.

28. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 1998 год.

29. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2000 год.

30. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2002 год.

31. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2004 год.

32. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2006 год.

33. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр

гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2008 год.

34. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2010 год.

35. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2012 год.

36. Заболеваемость простейшими и гельминтозами в населении Российской Федерации: сбор информации и статистический анализ. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2014 год.

37. Калугин Ю.В. Криопротекторы. / Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В.– Киев: Наукова думка, 1978. - 204 с.

38. Компоненты безопасности крови. Памятка для национальных органов здравоохранения. ВОЗ, Женева, 2005.

39. Коншина О.С., Еропкин М.Ю., Никоноров И.Ю., Позднякова М.Г. Роль биобанков в изучении популяционного иммунитета // Журнал инфектологии. – 2018 .-Т 10, № 2.- С. 39-47.

40. Костоломова Е.Г., Суховой Ю.Г., Гольцов С.В., Сухнев Д.Ю. Сравнительная оценка качества гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови при различных методах криоконсервирования // Российский иммунологический журнал – 2014. -Т. 8(17), № 4. -С. 1035-1039.

41. Костяев А.А., Утёмов С.В. , Андреев А.А., Полежаева Т.В., Мартусевич А.К., Исаева Н. В., Шерстнев Ф.С., Ветошкин К.А., Калинина Е.Н., Князев М.Г. Анналы криобиологии. Классификации криопротекторов и криоконсервантов для клеток крови и костного мозга // Вестник гематологии. – 2016.- Т. 12, № 3.- С. 23-27.

42. Костяев А.А., Мартусевич А.К., Андреев А.А. Токсичность криопротекторов и криоконсервантов на их основе для компонентов крови и костного мозга (Обзорная статья) // Научное обозрение. Медицинские науки. – 2016.- № 6.- С. 54-74.
43. Максимов Н.А. О вымерзании и холодостойкости растений. Экспериментальные и клинические исследования. / Н. А. Максимов. – Санкт-Петербург: Типо-лит. М.П. Фроловой, 1913. - 330 с.
44. Миряна Бюрнуф-Радозевич, Тьерри Бюрнуф Состав для стабилизации плазмы крови, способ пастеризации плазмы и использование стабилизированной плазмы в терапии // Патент России № 2112522, 2010 г.
45. Наследов А.Д. SPSS19. Профессиональный статистический анализ данных / А.Д. Наследов // С.-Пб: Издательский дом «Питер», 2011. - 399 с. - С. 321.
46. Никольченко А.Ю. Влияние замораживания-оттаивания и длительного хранения при -196°C в присутствии некоторых криопротекторов на структурно-функциональные особенности церулоплазмينا // Проблемы криобиологии / – 1997.-№3.- С. 32-38.
47. О заболеваемости эхинококкозом и альвеококкозом в Российской Федерации: Письмо Роспотребнадзора от 20.06.2016 №01/7782-16-27 [Электронный ресурс] <https://rospotrebnadzor.ru/>.
48. Онищенко Г.Г. «Федеральный справочник», 2009, №22.
49. Переливание крови. Операция. Основы травматологии: Учебное пособие для студентов для аудиторной работы по общей хирургии / В.А. Белобородов, Е.А. Кельчевская, И.Ю. Олейников// проф. В.А. Белобородов – Иркутск: Тип. Иркутского гос. мед. ун-та, 2011. - С. 64.
50. Полежаева Т.В., Худяков А.Н., Патурова И.Г., Утемов С.В., Головченко В.В., Сергушкина М.И., Безмельцева О.М. Роль пектина пижмы обыкновенной в сохранности ядерных клеток крови при замораживании // Вятский медицинский вестник, 2018. № 1. С. 28-33. (РИНЦ 0,243).

51. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Красовская Н.Н. Серологические методы в оценке пораженности тканевыми гельминтами детей в экстремальных природных условиях севера // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1998. -№ 3.- С. 29.
52. Полетаева О.Г., Старкова Т.В., Коврова Е.А., Легоньков Ю.А., Тумольская Н.И., Красовская Н.Н., Степанова Е.В. Стандартизация диагностических тест-систем паразитарного назначения // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2011. -№ 2. -С. 44-45.
53. Рамазанов В.В., Воловельская Е.Л., Коптелов В.А., Бондаренко В.А. Коагуляционная активность эритроцитов, замороженных в комбинированных средах с непроникающими и проникающими криопротекторами // Вестник проблем биологии и медицины. – 2014.- Т. 3, № 4.- С. 182-186.
54. Распоряжение Правительства РФ от 5 августа 2009 г. №1098-р. [Электронный ресурс]. - URL:<https://rulaws.ru/goverment/Rasporyazhenie-Pravitelstva-RF-ot-05.08.2009-N-1098-r/>.
55. Сведенцов Е.П. Криоконсерванты для живых клеток / Е. П. Сведенцов - Сыктывкар : Коми науч. центр УрО РАН, 2010.- С. 80 с.
56. Свистунов А. А., Сучков С. В. На пути к персонализированной медицине как модели практического здравоохранения нового поколения // Россия: тенденции и перспективы развития (Москва, 01-30 декабря 2016 г.)- Москва, 2017.- С. 754-758.
57. Селюков А.Г. Сохранение ценных, редких и исчезающих видов животных. Проблемы и методы / А.Г. Селюков, М. В. Кибалова, С.А. Селюкова // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование. -2017. -Том 3. № 1. -С. 61-76. doi: 10.21684/2411-7927-2017-3-1-61-76.
58. Семененко Т.А. Роль банка сывороток крови в системе биологической безопасности страны // Вестник Росздравнадзора. – 2010.- № 3. - С. 55-58.
59. Семененко Т.А., Ананьина Ю.В., Боев Б.В., Гинцбург А.Л. Банки биологических ресурсов в системе фундаментальных эпидемиологических и

клинических исследований // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2011. -№ 10.- С. 5-9.

60. Семененко Т.А., Щербаков А.Г., Русакова Е.В., Тедеева Л.У. Значение банка сывороток в системе эпидемиологического надзора за актуальными инфекциями при чрезвычайных ситуациях // Медицина катастроф. – 2011. -№ 4 (76). -С. 42-45.

61. Сергиев В.П. Ликвидация инфекций как научная проблема // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. -2014 .-№ 4.- С. 9-12.

62. Сергиев В.П., Гасымов Э.И. Новая глобальная техническая стратегия Всемирной организации здравоохранения на 2015-2030гг. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2017. -№ 1.-С.59-62.

63. Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней: методические указания / Сост.: В.П.Сергиев, О.Г.Полетаева, Т.В.Продеев др.; Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России.- Москва, 2003.

64. Симоненко Е.Ю., Иванова А.А., Бурмистрова Е.В., Прядун В.В., Васильев А.Н., Яковенко С.А. Калориметрические параметры криопротектора на основе глицерина // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. -Т. 3, № 2.- С. 406-410.

65. Степанов А.А., Коротаев Е.В., Бессмельцев С.С., Рабинович В.И., Пономарев С.А., Хорева О.Е. Оптимизация криоконсервации гемопоэтических стволовых клеток полученных из периферической крови при высоком лейкоцитозе // Российский биомедицинский журнал. – 2015.- Т. 16, № 2.- С. 496-506.

66. Степанова Е.В., Максимова М.С., Жнакина Ж.В., Авдеева О.Н., Лебедева М.Н. Формирование банка сывороток крови больных паразитогами // Справочник заведующего КДЛ. – 2014. -№ 8. -С. 25-31.

67. Танг Цюн, Харел Моти Стабилизирующая композиция для сухого хранения биологических материалов // Патент России №2573324, 20.01.2016.

68. Толстокоров А.С., Гергенретер Ю.С. Особенности диагностики эхинококкоза печени // Кубанский научный медицинский вестник. 2012. №3. URL:

<https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-diagnostiki-ehinokokkoza-pecheni> (дата обращения: 20.05.2019).

69. Трофимов Н.А. Отрасль биобанков в ближайшем будущем // Наука за рубежом. – 2012.-№13.-С.1-13.

70. Тумольская Н.И. Случай описторхоза тяжелое течение // Сеченовский вестник. – 2012. - № 1. - С. 54-58.

71. Тумольская Н.И., Завойкин В.Д., Мазманыч М.В., Сергиев В.П. Альвеолярный эхинококкоз в европейской части России // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2013.-№2.- С. 36-37.

72. Фалько О.В., Земляных Н.Г., Липина О.В., Прокопюк О.С. Модификация белков сыворотки плацентарной крови под влиянием низких температур // Биомедицинская химия. – 2013.- Т 59, №2.-С. 219-234.

73. Фалько О.В., Липина О.В., Чижевский В.В. О криоконсервировании сыворотки плацентарной крови человека // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии (Астрахань, 27-28 апреля 2017)- Астрахань, 2017.- С. 62-64.

74. Федотенков А.Г., Суханова Л.И., Шишкина И.Д. и др. Консервирование костного мозга при низких температурах (-70°C) с применением 15% глицерина для клинических целей: Методические рекомендации. - Москва, 1974. - 13 с.

75. Холодный А.Я., Дыгин В.П., Филев Л.В. и др. Морфологическая и функциональная полноценность посмертного костного мозга через 6 лет хранения в жидком азоте // Трансплантация костного мозга в клинической практике. - М., 1984. - С. 88-89.

76. Хроменкова Е.П., Димидова Л.Л., Твердохлебова Т.И. Актуальность проведения санитарно-паразитологического мониторинга на юге России // Инфекция и иммунитет. – 2012.- Т.2 (1 - 2).- С. 387.

77. Черникова Е.А., Ермакова Л.А., Козлов С.С. Эхинококкозы: подходы к лечению // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. – 2014. -№ 1.- С. 52-56.

78. Чупин И.И. Практика криоконсервации (крионики) - исторический аспект // Исследовательский потенциал молодых ученых: взгляд в будущее - Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, 2012. -С. 185-192.
79. Шишканова Л.В. Токсокароз на юге России; эпизоотологическая, санитарно-паразитологическая и сероэпидемиологическая характеристика: дис. ...канд. биол. наук.- Москва,2011.- С.154.
80. Шишканова Л.В., Твердохлебова Т.И., Ермакова Л.А., Думбадзе О.С., Ширинян А.А., Нагорный С.А. и др. Токсокароз на юге России // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. – 2014.- № 15.- С. 356 - 358.
81. Эпидемиологический надзор за эхинококкозами: Методические указания МУ 3.2.3470-17 .—Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2018.-47 с.
82. Эхинококкоз цистный (однокамерный). Клиника, диагностика, лечение, профилактика / Сергиев В.П., Легоньков Ю.А., Полетаева О.Г., Черникова Е.А. // Москва: Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М. Сеченова, 2008. - 36 с.
83. Antibody Shelf Life / How to Store Antibodies / Mary Johnson (han at labome dot com) Synatom Research, Princeton, New Jersey, United States Mater methods 2012;2:120.doi.org/10.13070/mm.en.2.120.
84. Argentieri M., Pilla D., Vanzati A., Lonardi S., Facchetti F., Doglioni C., et al. Antibodies are forever: a study using 12-26-year-old expired antibodies // Histopathology. -2013.-Vol.63. P. 869-76.
85. Artene S.A., Ciurea M.E., Purcaru S.O. et al. Biobanking in a constantly developing medical world//Sci. World J. -2013,doi: 10.1155/2013/343275.
86. Ball L.K., Ball R., Pratt R.D. An assesment of thimerosal use in childhood vaccines. Pediatrics 2001;107(5):1147- 1154.
87. Brooks Zoe C. Performance-driven quality control. - Washington: American Association for Clinical Chemistry, 2001.

88. Bycroft C., Freeman C., Petkova D., Band G., Elliott L.T., Sharp K., Motyer A., Vukcevic D., Delaneau O., O'Connell J., Cortes A., Welsh S., Young A., Effingham M., McVean G., Leslie S., Allen N., Donnelly P., Marchini J. The UK Biobank resource with deep phenotyping and genomic data//Nature.-2018.№ 562(7726).P. 203-209 doi: 10.1038/s41586-018-0579-z.
89. Caulfield T., Burningham S., Joly Y. et al. A review of the key issues associated with the commercialization of bio-banks // J. Law. Biosci.-2014 Vol. 1 (1) P. 94-110. doi: 10.1093/jlb/lst004.
90. Caulfield T., Burningham S., Joly Y. et al. A review of the key issues associated with the commercialization of bio-banks. // J. Law. Biosci.-2014 Vol. 1 (1) P. 94-110. doi: 10.1093/jlb/lst004.
91. Coussot G., Le Postollec A., Faye C., Dobrijevic M. A gold standard method for the evaluation of antibody-based materials functionality: Approach to forced degradation studies // J. Pharm Biomed Anal. - 2018. - Vol.152. P. 17-24. doi: 10.1016/j.jpba.2018.01.041.
92. D.F.Marton. Pentagon's giant blood serum bank may provide PTSD clues/Scientific American, 2013, August 12.
93. De Souza Y.G., Greenspan J.S. Biobanking past, present and future: responsibilities and benefits. AIDS. 2013. Vol. 27 (3) P. 303–312. doi: 10.1097/QAD.0b013e32835c1244.34.
94. Fransson M.N., Rial-Sebbag E., Brochhausen M. et al. To-ward a common language for biobanking // Eur. J. Hum. Genet. - 2015. Vol. 23 P. 22–28. doi: 10.1038/ejhg.2014.45.
95. Global biobank directory, tissue banks and biorepositories <http://specimencentral.com/biobank-directory/> Accessed 2 Aug 2016.
96. Gołoś A., Lutyńska A. Thiomersal-containing vaccines - a review of the current state of knowledge. // Przegląd epidemiologiczny.- 2015.- Vol. 69, № 1. - P. 59-64. - PMID 25862449.

97. Guidelines on human biobanks and genetic re-search databases [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://www.oecd.org/sti/bio-tech/44054609.pdf>. Accessed 01 Aug 2016. - Дата доступа: 2016.
98. Hewitt R.E. Biobanking: the foundation of personalized medicine // *Curr. Opin. Oncol.*-2011. Vol. 23. № 1. - P.112 - 119. doi: 10.1097/CCO.0b013e32834161b8.
99. Highsmith J. Biobanking: Technologies and Global Markets. Market research report. BCC Research. 2011.
100. Hong Y., Hao H.J., Xie Y.C., Wang Q., Li H.F. Effect of storage conditions and freeze/thaw cycles on serum and plasma levels of anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody // *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* . - 2014. Vol. 52. № 6. - P. 103-105 doi:10.1515/cclm-2013-1021.
101. Isachenko V., Alabart J.L., Dattena M., Cappai P., Nawroth F., Isachenko E., Cocero M.J., Olivera J., Roche A., Accardo C., Folch J. New technology for vitrification and field (microscope-free) thawing and transfer of the small ruminant embryo // *Theriogenology*.-2003.№ 59. P. 1209-1218.
102. Ji D., Kamalden T., Del Olmo Aguado S., Osborne N. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms // *Apoptosis*. - 2011 Vol.16. P. 25-37 .
103. Kamenski P.A., Sazonov A.E., Fedyanin A.A. et al. Biological Collections: Chasing the Ideal // *Acta Naturae*.- 2016 Vol. 8 (2).P. 6–9. PMID: 27437135.25.
104. Kinkorová J. Biobanks in the era of personalized medicine: objectives, challenges, and innovation // *The EPMA J.*-2016 Vol.7. P. 4. doi: 10.1186/s13167-016-0053-7.
105. Lori D. Campbell 2012 best practices for repositories collection, storage, retrieval, and distribution of biological materials for re-search international society for biological and environ-mental repositories. // *Biopreserv. Biobank.*- 2012.- Vol.10, № 2 P. 79-161. doi: 10.1089/bio.2012.1022.
106. Lovelock F. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing // *Biochem. J.*- 1954. Vol. 56. № 3. P. 265–270.

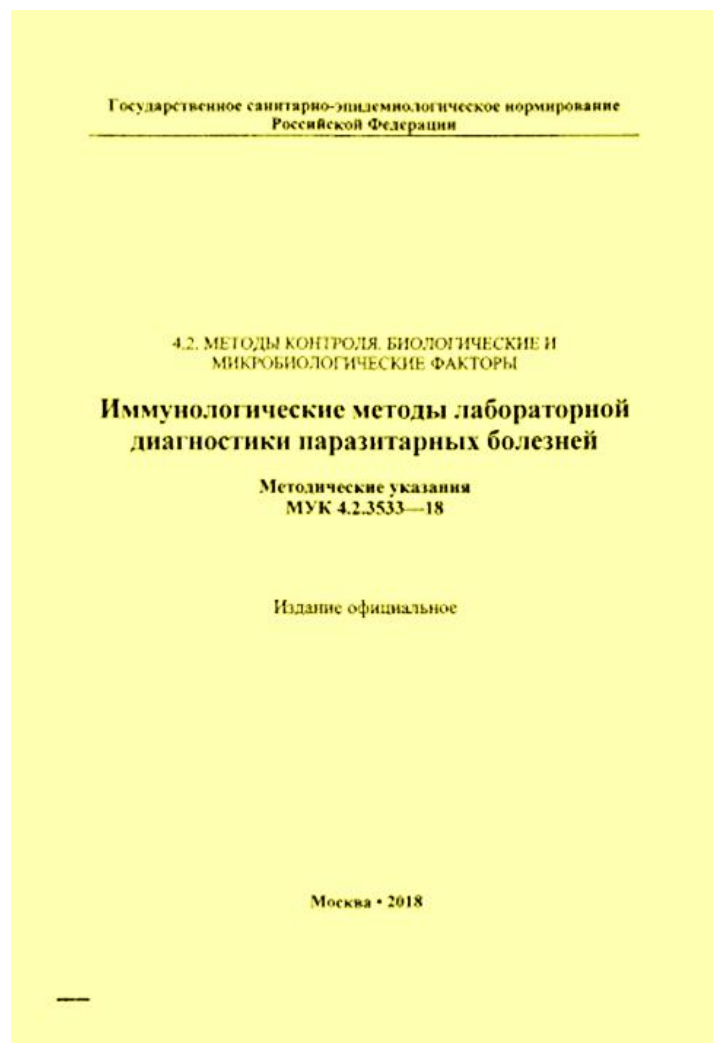
107. Marodin G., França P., Rocha J.C .et al. Biobanking for health research in Brazil: present challenges and future directions // *Rev. Panam. Salud. Publica.* - 2012 Vol. 31 (6) P. 523–528. PMID: 22858821.28. 2009.
108. Maryman H.T. Cryoprotective agents: A review // *Cryobiology.* - 1971. Vol. 3. №2. P. 173 - 183.
109. Matthews D.E. Using and understanding medical statistics / D.E. Matthews, T.V. Farewell. – 4th, completely rev. and enl. ed. / S. Karger AG, 2007. - 322 p.
110. Miller M.A., Rodrigues M.A., Glass M.A., Singh S.K., Johnston K.P., Maynard J.A. Frozen-state storage stability of a monoclonal antibody: aggregation is impacted by freezing rate and solute distribution// *J. Pharm Sci.*-2013. Vol. 102. №4.- P. 1194 - 1208. doi: 10.1002/jps.23473.
111. Mitchell D., Geissler J., Parry-Jones A. et al. Biobanking from the patient perspective // *Research Involvement and Engagement.*-2015 Vol. 1 (4). doi: 10.1186/s40900-015-0001-z.
112. Mora M., Angellini C., Bignami A. et al. The EuroBioBank Network: 10 years of hands-on experience of collaborative, transnational biobanking for rare diseases // *Eur. J. Hum. Genet.* -2015 Vol.; 23 (9) P. 1116 - 1123. doi: 10.1038/ejhg.2014.272.
113. Moro P., Schantz P. M. Echinococcosis: a review. // *International Journal of Infectious Diseases.* -2009. №13. P. 125 - 133.
114. Murphy B., Swarts S., Mueller B., van der Geer P., Manning M., Fitchmun M. Protein instability following transport or storage on dry ice // *Nat Methods.* -2013 Vol.10. P. 278-9.
115. Padayatty S.J., Katz A., Wang Y., Eck P., Kwon O., Lee J.H., Chen S., Corpe C., Dutta A., Dutta S.K., Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention // *Journal of the American College of Nutrition.* - 2003. - №22.
116. Park J., Nagapudi K., Vergara C., Ramachander R., Laurence J., Krishnan S. Effect of pH and excipients on structure, dynamics, and long-term stability of a model IgG1 monoclonal antibody upon freeze-drying // *Pharm Res.*-2013 Vol.30 P.:968-84.

117. Peacock J.L. Oxford Handbook of Medical Statistics / J.L. Peacock, P.J. Peacock / Oxford University Press, 2011. - 517 p.
118. Petrie A. Medical statistics at a glance / A. Petrie, C. Sabin. - 3rd ed. / Wiley Blackwell, 2009. - 181 p.
119. Pomian K. Collectors and Curiosities / Paris and Venice, Cambridge, 1990. - 348 p.
120. Reznik O.N., Kuzmin D.O., Skvortsov A.E., Reznik A.O. Biobanks are an essential tool for transplantation. History, current state, perspectives // Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs.-2016 Vol. 18, № 4.pp. 123-132. doi.org/10.15825/1995-1191-2016-4-123-132.
121. The case for personalized medicine. 2014. 4th Edition Personalized Medicine Coalition. available at: http://www.personalizedmedicinecoalition.org/Userfiles/PMC-Corporate/file/pmc_case_for_personalized_medicine.pdf. Accessed 01 Aug 2016.
122. Turunen M., Olsson J., Dallner G. Metabolism, function of coenzyme Q // Biochimica et Biophysica Acta. - 2004. - №1660 (1-2).
123. U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Health, National Cancer Institute. Best practices for biospecimen resources. <http://biospecimens.cancer.gov/bestpractices/2011-NCIbestpractices.pdf>. Accessed 01 Aug 2016.31.
124. Valery C.R., Pivacek L.E., Gray A.D. et al. The safety and therapeutic effectiveness of human red cells stored at -80°C for as 21 years // Transfusion. - 1989. Vol.29. P. 429 - 437.
125. Vaught J.B., Henderson M.K., Compton C.C. Biospecimens and biorepositories: from afterthought to science // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. - 2012. Vol.21 (2) P. 253–255. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-11-1179.
126. Verlinden M., Nys H., Ectors N. et al. Access to biobanks: Harmonization across biobank initiatives. Biopreserv. Biobank.-2014 Vol.12 (6) P. 415–422. doi: 10.1089/bio.2014.0034.58.
127. Zita C., Overvad K., Mortensen S.A., Sindberg C.D., Moesgaard S., Hunter D.A. Serum coenzyme Q10 concentrations in healthy men supplemented with 30 mg or 100

mg coenzyme Q10 for two months in a randomized controlled study // BioFactors. – 2003. - №18 (1-4).

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Методические указания МУК 4.2.3533 – 18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней».



ББК 53.4

И53

И53 Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней; Методические указания.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2018.—47 с.

ISBN 978–5–7508–1639–2

1. Разработаны ИМПЦТМ им. Марьиного Первого государственного Московского университета им. И. М. Сеченова (В. П. Сергеев, Е. Н. Морозов, М. Н. Лебедева, О. Г. Полетаева, Н. И. Тумольская, Е. Н. Понировский, Т. В. Пролеус, О. П. Зеля, В. Д. Завойкин, К. Ю. Кузнецова, Е. В. Степанова, Е. Н. Жиренкина, Ж. В. Жнакина), ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора (Т. И. Твердохлебова, Л. А. Ермакова, О. С. Думбадзе, Л. В. Шипканова), Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Т. М. Гузеева), ФБУЗ «Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (Т. Г. Сыскова, М. М. Асламова), ФБУН «Тюменский НИИ краевой и инфекционной патологии» Роспотребнадзора (Т. Ф. Степанова, Т. В. Постникова, К. Б. Степанова), ГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России (Т. Н. Константинова), ФБУЗ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (А. Л. Гинзбург, Д. Б. Гончаров), ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора (О. Ю. Старостина).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 24 ноября 2017 г. № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 15 февраля 2018 г.

4. Введены взамен МУ 3.2.1173—02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней».

ББК 53.4

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

**Патент: «Способ хранения сывороток крови с антителами к возбудителям
паразитарных болезней»**

