

Оценка надежности результатов серологического мониторинга по материалам биобанка

Ноздрачева А. В., Семененко Т. А.

ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России. Москва, Россия

Цель. Оценить сохранность иммуноглобулинов (Ig) разных классов (IgA, IgM, IgG, IgE) в условиях продолжительного низкотемпературного хранения образцов сыворотки крови.

Материал и методы. В работе использованы образцы сывороток крови из коллекции отдела эпидемиологии, исследованные методом иммуноферментного анализа на наличие антител классов IgA, IgM, IgG, IgE двукратно: сразу по поступлению в лабораторию и после хранения при температуре -70°C в течение 8 лет.

Результаты. По истечении периода хранения серопозитивных сывороток уровень антител класса IgA статистически значимо не изменился ($p=0,7$). В отношении остальных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgE) наблюдалось небольшое (не $>15\%$), однако статистически значимое снижение их уровня в сыворотке крови ($p<0,05$), наиболее выраженное для Ig E. Показано, что чем выше был уровень антител в образцах при первом исследовании, тем более он снизился после долгосрочного хранения (корреляционная связь при $p<0,05$). Это не привело к появлению ложноотрицательных результатов, что связано с выявленной нами большей "точностью" измерения именно небольших значений.

Заключение. Длительное низкотемпературное хранение образцов сывороток крови в условиях биобанка обеспечивает сохран-

ность антител разных классов и является основой достоверности результатов будущих исследований.

Ключевые слова: биобанкирование, хранение образцов, иммуноглобулины, сыворотка крови, сохранность антител.

Отношения и деятельность. Работа выполнена при поддержке Государственного задания Минобрнауки РФ № FZWN-2020-0017 (дизайн, анализ и интерпретация данных).

Поступила 29/08-2023

Рецензия получена 26/09-2023

Принята к публикации 28/09-2023



Для цитирования: Ноздрачева А. В., Семененко Т. А. Оценка надежности результатов серологического мониторинга по материалам биобанка. Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2023;22(11):3709. doi:10.15829/1728-8800-2023-3709. EDN SHUJMM

Assessment of the reliability of serological monitoring results based on biobank materials

Nozdracheva A. V., Semenenko T. A.

N. F. Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology. Moscow, Russia

Aim. To evaluate the safety of immunoglobulins (Ig) of different classes (IgA, IgM, IgG, IgE) under conditions of long-term low-temperature storage of blood serum samples.

Material and methods. The work used samples of blood serum from the collection of the Department of Epidemiology, examined by enzyme immunoassay for antibodies of classes IgA, IgM, IgG, IgE twice as follows: immediately upon receipt in the laboratory and after storage at a temperature of -70°C for 8 years.

Results. After the storage of seropositive sera, the level of IgA antibodies did not change significantly ($p=0,7$). For the remaining classes of immunoglobulins (IgM, IgG, IgE), a small (not $>15\%$) but significant decrease ($p<0,05$), most pronounced for IgE, was observed. It was shown that the higher the antibody level in the samples during the first study, the more it decreased after long-term storage (correlation at $p<0,05$). This did not lead to false negative results, which is due to the greater accuracy in measuring small values.

Conclusion. Long-term low-temperature storage of serum samples in biobank conditions ensures the safety of antibodies of different classes and is the basis for the reliability of future studies.

Keywords: biobanking, sample storage, immunoglobulins, blood serum, preservation of antibodies.

Relationships and Activities. The work was supported by the State assignment of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation № FZWN-2020-0017 (design, analysis and interpretation of data).

Nozdracheva A. V.* ORCID: 0000-0002-8521-1741, Semenenko T. A. ORCID: 0000-0002-6686-9011.

*Corresponding author:
nozdracheva0506@gmail.com

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):
e-mail: nozdracheva0506@gmail.com

[Ноздрачева А. В.* — к.м.н., зав. лабораторией неспецифической профилактики инфекционных заболеваний отдела эпидемиологии, ORCID: 0000-0002-8521-1741, Семененко Т. А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела эпидемиологии, ORCID: 0000-0002-6686-9011].

Received: 29/08-2023
Revision Received: 26/09-2023
Accepted: 28/09-2023

Cardiovascular Therapy and Prevention. 2023;22(11):3709. doi:10.15829/1728-8800-2023-3709. EDN SHUJMM

For citation: Nozdracheva A.V., Semenenko T.A. Assessment of the reliability of serological monitoring results based on biobank materials.

ИФА — иммуноферментный анализ, Ig — иммуноглобулин(-ы), IgA — Ig класса A, IgM — Ig класса M, IgE — Ig класса E, IgG — Ig класса G.

Ключевые моменты

Что известно о предмете исследования?

- Использование материалов банка сывороток крови позволяет проводить широкомасштабные научные исследования в области эпидемиологии инфекционных болезней, в т.ч. изучение популяционного иммунитета. Проведено экспериментальное исследование сохранности иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE при долгосрочном низкотемпературном хранении образцов сыворотки крови.

Что добавляют результаты исследования?

- Установлено, что хранение образцов сывороток крови в течение 8 лет при температуре -70°C оказало незначительное влияние на уровень иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE. Показано, что чем выше был уровень антител в образцах при первичном исследовании, тем более он снизился при повторном исследовании, что, однако, не изменило интерпретацию результатов исследования.

Key messages

What is already known about the subject?

- The use of blood serum bank materials allows for large-scale research in epidemiology of infectious diseases, including the study of population immunity. An experimental study was carried out on the safety of immunoglobulins IgA, IgM, IgG, IgE during long-term low-temperature storage of serum samples.

What might this study add?

- Storage of blood serum samples for 8 years at a temperature of -70°C had a slight effect on the level of immunoglobulins IgA, IgM, IgG, IgE. The higher the antibody level in the samples during the initial study, the more it decreased in the re-evaluation, which, however, did not change the interpretation of the study results.

Введение

Иммуноглобулины (Ig), вырабатываемые плазматическими клетками в ответ на проникновение в организм чужеродного агента (антигена), являются маркерами, наиболее часто используемыми для диагностики инфекционной патологии [1]. Определение уровня и соотношения антител разных классов в сыворотке крови может служить одним из основных критериев оценки иммунного статуса индивида и использоваться для контроля лечения некоторых инфекционных заболеваний. Кроме того, анализ превалентности Ig позволяет судить о распространении инфекций в популяции, прогнозировать риски осложнения эпидемической ситуации в будущем [2-4].

В условиях бурного развития отрасли биобанкирования в последние годы, создание коллекций биообразцов для изучения инфекционной патологии неотъемлемо связано с определением критериев и сроков сохранности маркерных молекул, в т.ч. антител, а также с необходимостью систематизации требований к процессингу образцов и выработки единых методических рекомендаций [5-7]. Таким образом, гарантия сохранности биообразцов — это обязательное условие

обеспечения достоверности исследований популяционного иммунитета по материалам биобанка.

Сохранение способности Ig вступать в реакцию с антигеном, оцениваемой разными методами, является основным критерием стабильности при долгосрочном низкотемпературном хранении. Известно, что структурные особенности, агрегатное состояние и восприимчивость к протеазам существенно влияют на стабильность антител [8]. При этом многими авторами показано, что высокой стойкостью при замораживании обладают именно белковые молекулы, к которым относятся Ig, тогда как, например, нуклеиновые кислоты значительно быстрее подвергаются деградации [7-9].

Антитела, входящие в гамма-глобулиновую фракцию белков крови, представляют собой гетеродимеры, состоящие из двух тяжелых и двух легких цепей, соединенных дисульфидными связями. Согласно классификации на основе строения константной области тяжелой цепи выделяют пять классов антител, а именно Ig класса A (IgA), Ig класса D (IgD), Ig класса E (IgE), Ig класса G (IgG) и Ig класса M (IgM), которые выполняют разные функции в ор-

ганизме. Постоянные тяжелые области IgA, IgD и IgG имеют три домена и шарнирную область для обеспечения гибкости. В соответствии с разновидностями дисульфидных связей, классы IgG и IgA дополнительно классифицируют на шесть изотипов — IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Все рекомбинантные антитела, используемые для создания терапевтических препаратов, разрабатываемые на сегодняшний день, относятся к классу IgG. Это связано с тем, что указанный класс Ig обладает наиболее высокой стабильностью, имеет самый продолжительный период полувыведения из сыворотки, и составляет ~75% всех антител плазмы крови у человека¹. При этом результаты экспериментальной оценки влияния низкотемпературного долгосрочного хранения на сохранность других классов антител (IgA, IgM, IgE, IgD) представлены в научной литературе фрагментарно.

Известно, что на физико-химическое состояние антител при их долгосрочном хранении влияет множество факторов. Во-первых, большое значение имеет окружающая жидкая среда (цельная кровь, плазма или сыворотка крови)¹. Так, широкое разнообразие белковых и клеточных структур в цельной крови при хранении образца часто приводит к необратимому изменению функционального состояния антител. В связи с этим для закладки в биобанк наиболее часто используют сыворотку или плазму крови. Первую из них получают после естественного свертывания и центрифугирования образца крови, что позволяет удалить сгустки фибрина, клетки крови и связанные с ними факторы свертывания [10]. Плазму получают путем добавления антикоагулянтов (например, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), цитрата, гепарина) перед удалением клеток крови центрифугированием. По некоторым оценкам, в сыворотке крови на ~3-4% меньше белка, чем в плазме, в связи с чем использование этого вида биообразцов предпочтительно для сероэпидемиологических исследований на материале биобанков. Кроме того, сыворотку часто считают золотым стандартом метабомики, поскольку она готовится из свернувшейся крови и не требует внесения чужеродных веществ, имеющих потенциал к искажению результатов. Также распространено использование пробирок, содержащих разделительные гели, которые образуют барьер между упакованными клетками и сывороткой во время центрифугирования, улучшая стабильность анализа. Применяют и специальные агенты, активирующие свертывание крови и сокращающие время этого процесса до 30 мин.

Во-вторых, при хранении антитела проявляют тенденцию к агрегации из-за различных химических взаимодействий в растворе, в числе которых сочетание Ван-дер-Ваальсовых сил, гидрофобных вза-

имодействий, дисульфидных и водородных связей. Это может привести к образованию видимых частиц и даже к выпадению антител в осадок [11, 12]. Распространенными причинами агрегации могут стать, в т.ч. контаминация образца на преаналитическом этапе, а также изменение pH. Как известно, на сохранность антител также влияет температура, а наиболее распространенными режимами хранения биообразцов являются: +4° С, -20° С и -70 — -80° С, что призвано замедлить любые типы химического взаимодействия между молекулами с участием Ig [13]. В связи с этим оптимальной температурой хранения является -70 — -80° С. Известно, что агрегацию антител можно уменьшить с помощью криопротекторов за счет замедления кристаллизации льда и эвтектического перехода раствора антител [14, 15].

В-третьих, показано, что риск агрегации антител максимален во время процессов замораживания/оттаивания в результате сложных физических и химических изменений в сыворотке крови [15]. Следовательно, повторы таких циклов увеличивают риск возникновения и степень агрегации. Вне зависимости от класса анализируемых маркеров универсальной рекомендацией для процессинга сывороточного материала является минимизация количества циклов замораживания и оттаивания. С этой целью исходный биообразец необходимо разделить на аликвоты небольшого объема перед замораживанием, которые можно разморозить для проведения исследования по мере необходимости. Таким образом, каждая аликвота подвергается только одному циклу замораживания/оттаивания. Кроме того, некоторыми исследователями показана целесообразность добавления криопротектора глицерина в концентрации 50% для предотвращения повреждения антител при низкотемпературном хранении [16, 17].

И наконец, значение имеет режим размораживания образца. Быстрое оттаивание может денатурировать белки в 11 раз сильнее, чем медленное. Поэтому для минимизации нестабильности антител следует применять более медленное оттаивание, т.е. на льду [15].

Как видно из приведенных данных, причины агрегации и снижения активности антител весьма разнообразны, и полностью их влияние на всех этапах биобанкирования исключить нельзя. Тем не менее, актуальным является проведение экспериментальных исследований сохранности Ig разных классов при условии соблюдения рекомендаций по предотвращению их денатурации.

Для анализа свойств антител, в т.ч. их стабильности/сохранности могут быть использованы разные методы, например иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоттинг, хроматография и т.д. [15-17]. Все эти методы оценивают основное свойство Ig — способность связывания антигена. Наиболее простым и доступным методом из них является ИФА.

¹ Abcam: Antibody storage guide. <https://www.abcam.com/protocols/antibody-storage-guide> (25 August 2023).

Суть его заключается в том, что антиген-мишень сначала иммобилизуется на планшете, а затем захватывается специфичным антителом из внесенного образца сыворотки крови. После этого добавляется связанное с ферментом вторичное антитело, которое распознает область, способную к кристаллизации фрагмента первичного антитела (Fc), так называемый конъюгат. На последнем этапе ИФА образовавшийся комплекс связанных антител становится видимым для измерения спектрофотометром при добавлении субстрата фермента (хромогенный, флуориметрический или люминесцентный). Измеренная оптическая плотность в лунках планшета соответствует концентрации антител в исследуемом образце сыворотки крови. При долгосрочном хранении таких образцов способность антител связывать антиген может снижаться, что в свою очередь проявится в изменении оптической плотности исследуемых образцов в ИФА.

Цель исследования — оценить сохранность Ig разных классов в условиях продолжительного низкотемпературного хранения образцов сыворотки крови.

Материал и методы

В исследовании использованы образцы сыворотки крови от случайно выбранных условно здоровых лиц в возрасте 18-45 лет, проживающих в Москве, из коллекции отдела эпидемиологии ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи" Минздрава России. Среди обследованных лиц долевое распределение мужчин и женщин составило 48 и 52%, соответственно. Взятие крови осуществляли из локтевой вены с помощью системы однократного применения BD Vacutainer Safety-Lok (Becton Dickinson and Company, США) в количестве 4-5 мл в лечебно-профилактическом учреждении. Для сбора и хранения образцов крови применяли пробирки с активатором свертывания. После доставки в лабораторию для отделения сыворотки образцы цельной крови отстаивали и центрифугировали при температуре 18-25° С, а затем аликвотировали и маркировали с помощью штрих-кодов. Хранение полученных аликвот при низких температурах (-70° С) в морозильных камерах (производство Sanyo (модель Ultra Low), Япония) осуществляли в криопробирках (производство Axugen Scientific, USA) с закручивающимися крышками, исключающими самопроизвольное вскрытие. Указанное оборудование оснащено температурными датчиками с выводением значений на внешнее табло. Контроль температурного режима в морозильных камерах осуществлялся сотрудником лаборатории ежедневно с отметкой в соответствующем журнале.

Образцы сывороток крови были исследованы двукратно: сразу после поступления в лабораторию (опыт 1) и по завершению 8 лет хранения при температуре -70° С (опыт 2). Повторные циклы замораживания/оттаивания образцов были исключены, т.к. для проведения работы использованы разные аликвоты. Размораживание биообразцов проводили постепенно по ступенчатой схеме, включающей последовательное выдерживание в температурных интервалах: 1) -20 — -22° С (сут.); 2) +4 — +6° С (сут.); 3) +19 — +21° С (2 ч).

Таблица 1

Характеристика распределения уровней антител разных классов (г/л) в образцах сывороток крови при поступлении в лабораторию (опыт 1) и после 8-летнего периода низкотемпературного хранения (опыт 2)

		Медиана (Me)	Нижний квартиль (Q25)	Верхний квартиль (Q75)	Стандартное отклонение (SD)
IgA	Опыт 1	3,2	1,9	4,1	2,7
	Опыт 2	3,3	2,8	3,8	0,9
IgM	Опыт 1	3,2	2,1	5,9	2,9
	Опыт 2	2,7	1,8	4,9	3,6
IgG	Опыт 1	17,0	9,8	20,0	11,2
	Опыт 2	11,0	7,2	13,3	4,3
IgE	Опыт 1	48,0	15,0	251,0	310,7
	Опыт 2	25,1	8,0	170,0	356,6

Примечание: Ig — иммуноглобулин(-ы).

Определение уровня общих Ig классов IgA, IgM, IgG, IgE в образцах сыворотки крови в каждом опыте осуществляли одномоментно методом твердофазного непрямого ИФА с использованием соответствующих тест-систем производства ООО "Хема" (Россия).

Проведение работы одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи" Минздрава России (протокол № 2 от 4 февраля 2016г).

Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью программ Microsoft Excel и STATISTICA 12.0. Уровни значимости α - и β - установлены равными 5% (т.е. значение $p < 0,05$, рассматривается как значимое, а анализ имел 95%-ю мощность). Для статистического анализа полученных значений уровня антител разных классов на каждом этапе исследования было оценено распределение исследуемых величин. С помощью критерия Шапиро-Уилка установлено несоответствие распределения уровней антител нормальному закону (распределению Гаусса), в связи с чем использованы непараметрические методы описательной статистики, рассчитаны следующие показатели: медиана (Me) и интерквартильный размах [Q25-Q75], стандартное отклонение (SD). Для проверки достоверности различий между результатами в опыте 1 и опыте 2 использовали критерий Вилкоксона (T). Критическое значение ($T_{\text{крит}}$) для него согласно табличным данным при $n=90$ удовлетворяло неравенству $T_{\text{крит}} > 466$. Для оценки корреляционной связи использовали коэффициент корреляции Спирмена (ρ).

Результаты

По результатам исследования установлено, что после 8 лет низкотемпературного хранения статистически значимых изменений уровня антител класса IgA не было ($T=1970$, $p=0,7$) (таблица 1). В отношении остальных классов антител (IgM, IgG, IgE) наблюдалось статистически значимое снижение их концентрации в сыворотке в опыте 2 ($p < 0,05$) в пределах 15%, наиболее выраженное в случае IgE. Следует от-

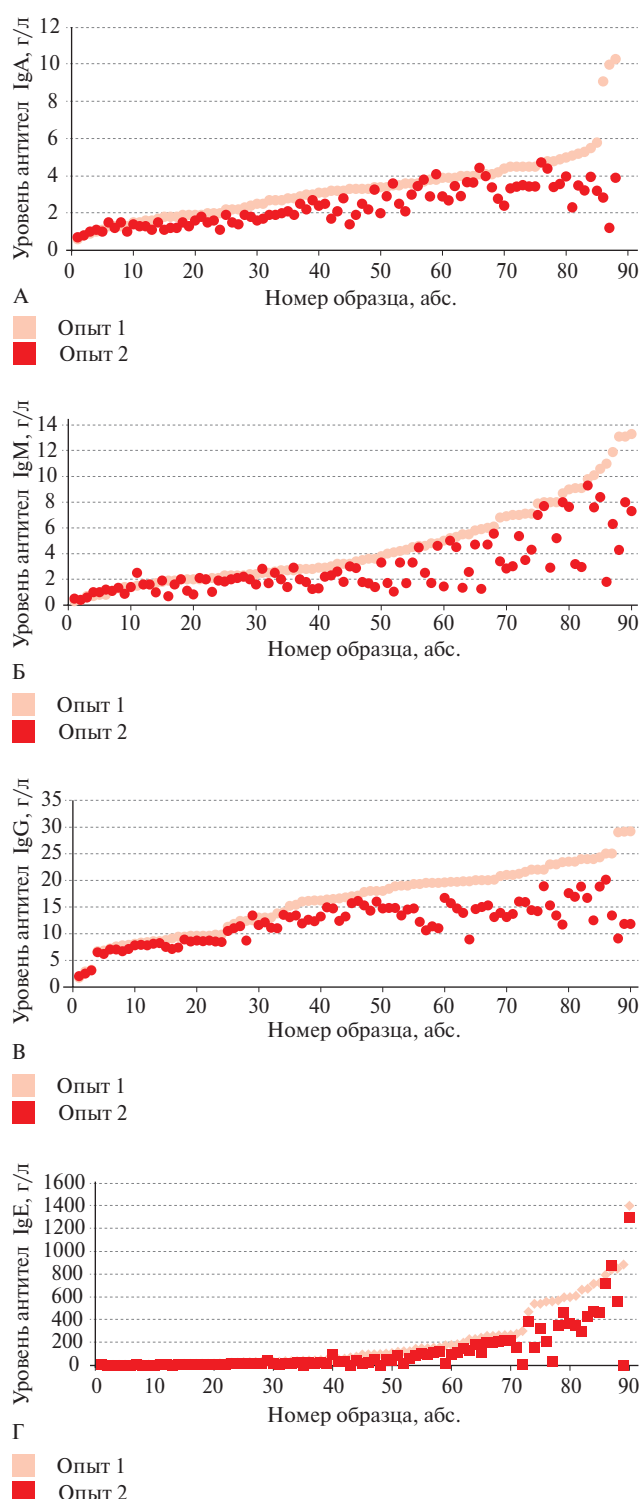


Рис. 1 Распределение образцов сыворотки крови в соответствии с уровнем антител (А — IgA, Б — IgM, В — IgG, Г — IgE) при первичном (опыт 1) и повторном (опыт 2) исследованиях. Примечание: Ig — иммуноглобулин(-ы).

метить, что разброс значений указанного показателя при повторном исследовании уменьшился (интерквартильный размах и стандартное отклонение в опыте 2 было меньше, чем в опыте 1). Такие результаты согласуются с данными, полученными ранее [18].

Все образцы сыворотки крови были серопозитивными при первичном и повторном исследовании. При этом наблюдалось смещение распределения уровней Ig всех исследуемых классов, к значению cut off (минимальное положительное значение согласно инструкции по применению тест-системы).

Установлено, что чем выше был уровень антител в образцах сывороток крови при первичном исследовании (опыт 1), тем более выраженным было его снижение после долгосрочного хранения (опыт 2). Для наглядности мы упорядочили результаты исследования образцов в опыте 1 по мере возрастания указанного показателя, и представили их попарно (рисунок 1). Корреляционный анализ выявил положительную сильную связь между уровнем антител при первичном исследовании и разницей значений (Δ) опыта 1 и опыта 2 для каждого образца сыворотки крови ($\rho=0,8$ при $p<0,05$). Такие результаты соответствовали данным, полученными нами ранее в отношении специфических к вирусам кори и краснухи антител [18].

Например, для IgG видно, что исследуемые показатели в пределах 20 г/л практически совпадали при первичном и повторном исследовании, тогда как при больших значениях разница была более выраженной. Концентрация специфических антител >25 г/л выявлена только в образцах в опыте 1. Корреляционная связь между уровнями антител при первичном и повторном исследованиях была ожидаемо сильной ($\rho=0,8$ при $p<0,05$). Аналогичные данные были получены и в отношении других классов Ig.

Одной из задач работы было оценить влияние продолжительного низкотемпературного хранения на интерпретацию результата исследования относительно полученного для образцов в опыте 1. Уровни антител в двух опытах были сопоставлены со значениями возрастной нормы антител согласно инструкции по применению используемых тест-систем. Установлено, что в отношении IgA, IgM, IgG при повторном исследовании не произошло такого изменения уровня антител, которое могло бы привести к искажению трактовки результатов диагностики в опыте 1. В отношении IgE в двух образцах наблюдалось снижение уровня антител до значений возрастной нормы, тогда как в аналогичных образцах при первичном исследовании он был превышен.

Обсуждение

Основной задачей преаналитического этапа является исключение возможности искажения результатов исследования с использованием коллекции образцов сывороток крови даже после долгосрочного их хранения. На основании полученных нами данных показано, что хранение при температуре -70°C , по всей видимости, не останавливает биохимические процессы в сыворотке крови, о чем может свидетельствовать установленное небольшое снижение среднего (Me) уровня антител всех классов (не $>15\%$).

Наиболее подверженными этому процессу оказались IgE. При условии, что распределение уровней антител не подчинялось закону нормального распределения и было смещено к значению cut off, все это могло привести к появлению ложноотрицательных образцов после хранения. Тем не менее, такие изменения не отразились на интерпретации результатов исследования, т.к. доля проб, в которых уровень антител был выше возрастной нормы, оказалась одинаковой в опытах 1 и 2. Исключением стали IgE, для которых интерпретация результатов исследования изменилась в двух образцах. Важным результатом стало отсутствие образцов с неопределяемым уровнем антител при повторном исследовании через 8 лет.

Отсутствие влияния снижения среднего уровня антител по завершении периода низкотемпературного хранения на интерпретацию результатов исследования, т.е. возникновения ложноотрицательных образцов, может быть объяснено следующим образом. При выполнении работы были подтверждены данные о большей "точности" небольших по сравнению с более высокими значениями уровня разных классов антител, полученные нами ранее в отношении специфических Ig класса G [18]. Такой эффект мог нивелировать снижение среднего (Me) уровня антител в выборке, что является важным для обеспечения достоверности сероэпидемиологических исследований по материалам коллекций биообразцов. Объяснение полученных результатов может быть различным и, вероятно, связано с биохимическими особенностями антител. Однако, по мнению авторов, это связано, прежде всего, с особенностями постановки ИФА. Согласно инструкции по применению используемых тест-систем, для соотнесения оптической плотности с уровнем антител в исследуемых образцах сывороток крови используют калибровочные образцы. В отношении Ig исследуемых классов, указанные калибраторы имеют небольшие значения, например, для IgG — 0; 1; 5; 10; 25 г/л, а для IgA — 0; 0,1; 0,5; 2; 5 г/л. При этом разброс полученных значений в выборке значительно шире указанных значений (рисунок 1). Вероятно, большая "точность" низких значений заложена в самой методике ИФА. В связи с этим актуальным является исследование сохранности антител при помощи разных методов, что могло бы исключить возможные методические погрешности.

Важно заметить, что по некоторым литературным данным процесс денатурации антител более выражен в тех образцах, где они имеют низкий уровень. Однако при средних и высоких титрах IgG и IgM вредные последствия повторных циклов замораживания и оттаивания, а также длительного низкотемпературного хранения минимальны [8]. Например, экспериментально показано, что после завершения 10 циклов замораживания/оттаивания активность указанных Ig сохранилась. Таким образом, очевидно, что выраженное снижение средних и высоких уровней антител, обнару-

женное нами, не может привести к появлению ложноотрицательных результатов в конечном итоге.

Результаты работы показали, что Ig основных классов являются достаточно стойкими при низкотемпературном хранении в течение 8 лет, а снижение среднего их уровня не искажает результатов последующих исследований при помощи ИФА и свидетельствует о надежности использования коллекций образцов биобанков. Полученные данные согласуются с результатами других исследователей. Например, в работе [8] убедительно показано, что длительное низкотемпературное хранение, а также многократные циклы замораживания-оттаивания не имели критического влияния на стабильность специфических антител IgG. Ввиду того, что образцы были отобраны с учетом гетерогенности поликлонального иммунного ответа человека, авторы делают вывод о возможности экстраполяции данных на все антитела против вакцин и лекарств.

Кроме того, стабильность антител при хранении была продемонстрирована и при помощи других высокочувствительных методов лабораторной диагностики, например, изотермической дифференциальной сканирующей флуориметрии в реальном времени [1], а также методом масс-спектропии [2]. Такие данные послужили научной основой разработки биосенсоров в разных областях медицины [3].

Полученные нами результаты, а также данные других авторов свидетельствуют о том, что обеспечение сохранности антител является комплексной задачей и деструктивное влияние многих факторов преаналитического этапа нельзя исключить полностью. В связи с этим перспективным направлением совершенствования технологического процесса биобанкирования является разработка методов и средств автоматизации с целью минимизации ручного труда [19, 20]. Такой подход позволит исключить ошибки и максимально стандартизировать операционные процедуры в биобанкировании, минимализируя, тем самым, влияние преаналитического этапа на результаты исследования.

Заключение

Для обеспечения достоверности результатов исследований приоритетным является использование образцов сывороток крови в ближайшие сутки после их получения. Однако стремительное развитие биобанкирования во всем мире подтверждает оправданность сохранения ценных образцов для будущих исследований и использование для этого разнообразных средств и методов, максимально замедляющих физико-химические процессы. Полученные в работе результаты подтвердили данное заключение и позволили сделать общий вывод о том, что низкотемпературное хранение в течение 8 лет обеспечивает сохранность антител разных классов и не ведет к существенному искажению результатов диагностики.

Ввиду того, что Ig являются одним из самых стойких маркеров контакта с возбудителем инфекционных заболеваний, а метод ИФА — одним из самых надежных; сероэпидемиологические исследования на их основе обладают высокой достоверностью и актуальностью.

Литература/References

1. Ma H, Ó'Fágáin C, O'Kennedy R. Antibody stability: A key to performance — Analysis, influences and improvement. *Biochimie*. 2020;177:213-25. doi:10.1016/j.biochi.2020.08.019.
2. Semenenko TA, Akimkin VG. Seroepidemiology in the surveillance of vaccine-preventable diseases. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2018;95(2):87-94. (In Russ.) Семененко Т.А., Акимкин В.Г. Сероэпидемиологические исследования в системе надзора за вакциноуправляемыми инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(2):87-94. doi:10.36233/0372-9311-2018-2-87-94.
3. Anisimov SV, Akhmerov TM, Balanovsky OP, et al. Biobanking. National Manual. Moscow: TRIUMPH Publishing House LLC, 2022. 308 p. (In Russ.) Анисимов С.В., Ахмеров Т.М., Балановский О.П. и др. Биобанкирование. Национальное руководство. Москва: ООО "Издательство ТРИУМФ", 2022. 308 с. ISBN: 978-5-93673-322-2.
4. Semenenko TA, Anan'ina YV, Boev BV, et al. Banks of biological resources in the system of basic epidemiological and clinical studies. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2011;10:5-9. (In Russ.) Семененко Т.А., Ананьина Ю.В., Боев Б.В. и др. Банки биологических ресурсов в системе фундаментальных эпидемиологических и клинических исследований. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2011;10:5-9.
5. Doludin YV, Borisova AL, Pokrovskaya MS, et al. Current best practices and biobanking recommendations. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019;64(12):769-76. (In Russ.) Долудин Ю.В., Борисова А.Л., Покровская М.С. и др. Современные передовые практики и рекомендации по биобанкированию. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019;64(12):769-76. doi:10.18821/0869-2084-2019-64-12-769-776.
6. Pokrovskaya MS, Borisova AL, Sivakova OV, et al. Quality management in biobank. World tendencies and experience of biobank of FSI "NMRC for preventive medicine" of the Ministry of healthcare of Russia. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2019;64(6):380-4. (In Russ.) Покровская М.С., Борисова А.Л., Сивакова О.В. и др. Управление качеством в биобанке. мировые тенденции и опыт биобанка ФГБУ "НМИЦ профилактической медицины" Минздрава России. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2019;64(6):380-4. doi:10.18821/0869-2084-2019-64-6-380-384.
7. Anisimov SV, Granstrem OK, Meshkov AN, et al. National association of biobanks and biobanking specialists: new community for promoting biobanking ideas and projects in Russia. *Biopreserv Biobank*. 2021;19(1):73-82. doi:10.1089/bio.2020.0049.
8. Castro AR, Jost HA. Effect of multiple freeze and thaw cycles on the sensitivity of IgG and IgM immunoglobulins in the sera of patients with syphilis. *Sex Transm Dis*. 2013;40(11):870-1. doi:10.1097/OLQ.0000000000000036.
9. Kozlova VA, Metelskaya VA, Pokrovskaya MS, et al. Stability of serum biochemical markers during standard long-term storage and with a single thawing. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2020;19(6):2736. (In Russ.) Козлова В.А., Метельская В.А., Покровская М.С. и др. Изучение стабильности биохимических маркеров при непрерывном длительном хранении сыворотки крови и при однократном размораживании. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2020;19(6):2736. doi:10.15829/1728-8800-2020-2736.
10. Vignoli A, Tenori L, Morsiani C, et al. Serum or Plasma (and Which Plasma), That Is the Question. *J Proteome Res*. 2022;21(4):1061-72. doi:10.1021/acs.jproteome.1c00935.
11. Rouet R, Lowe D, Christ D. Stability engineering of the human antibody repertoire. *FEBS Lett*. 2014;588(2):269-77. doi:10.1016/j.febslet.2013.11.029.
12. Correia IR. Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs*. 2010;2(3):221-32. doi:10.4161/mabs.2.3.11788.
13. Moggridge J, Biggar K, Dawson N, et al. Sensitive Detection of Immunoglobulin G Stability Using in Real-Time Isothermal Differential Scanning Fluorimetry: Determinants of Protein Stability for Antibody-Based Therapeutics. *Technol Cancer Res Treat*. 2017;16(6):997-1005. doi:10.1177/1533034617714149.
14. Xiang H, Chan D, Bates R. Minimization of freeze/thaw-induced protein aggregation and optimization of a drug substance formulation matrix. *BioPharm Int*. 2015;28(8):30-7.
15. Martin P, Colandene J, Pruett WA, et al. Impact of manufacturing-scale freeze-thaw conditions on a mAb solution. *BioPharm Int*. 2017;30(2):30-6.
16. Manikwar P, Majumdar R, Hickey JM, et al. Correlating excipient effects on conformational and storage stability of an IgG1 monoclonal antibody with local dynamics as measured by hydrogen/deuterium-exchange mass spectrometry. *J Pharm Sci*. 2013;102(7):2136-51. doi:10.1002/jps.23543.
17. Ma H, O'Kennedy R. Generation and optimization of antibodies for use in biosensors/ In: *Nanobiosensors for personalized in situ biomedical diagnostics* (ed Pranjal Chandra and Esther Sehgal) Institute of Engineering and Technology (IET) Publishing. 2016;209-30. ISBN: 9781849199506; e-ISBN: 9781849199513. 638 p. doi:10.1049/PBHE001E.
18. Nozdracheva AV, Semenenko TA. Influence of long-term storage of blood serum samples in a biobank for population-based seroepidemiologic studies. *Cardiovascular Therapy and Prevention*. 2022;21(11):3407. (In Russ.) Ноздрачева А.В., Семененко Т.А. Влияние длительного хранения образцов сывороток крови в условиях биобанка для проведения популяционных сероэпидемиологических исследований. *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2022;21(11):3407. doi:10.15829/1728-8800-2022-3407.
19. Voloshkin AA, Rybak LA, Nozdracheva AV, et al. Robotic system based on a delta manipulator for aliquoting in closed chambers and boxes. *Extreme Robotics*. 2022;1(1):436-44. (In Russ.) Волошкин А.А., Рыбак Л.А., Ноздрачева А.В. и др. Роботизированная система на базе дельта манипулятора для аликвотирования в закрытых камерах и боксах. *Экстремальная робототехника*. 2022;1(1):436-44.
20. Khalapyan S, Rybak L, Nebolsin V, et al. Robotic System for Blood Serum Aliquoting Based on a Neural Network Model of Machine Vision. *Machines*. 2023;11(3):349. doi:10.3390/machines11030349.