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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

Кандидат медицинских наук **Кузнецова К. Ю.**

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Малышева Наталья Семеновна – доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Курский государственный университет», кафедра биологии и экологии, профессор кафедры; директор научно-исследовательского института паразитологии

Ермакова Лариса Александровна – кандидат медицинских наук, ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, клиника Инфекционных и паразитарных болезней, заведующая клиникой; врач-инфекционист высшей категории

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «29» сентября 2020 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.02 в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д.8, стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

ДСУ 208.001.02, д.м.н., доцент **Морозов Евгений Николаевич**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 «Национальная система биологической и химической безопасности Российской Федерации», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 28 апреля 2015 года № 418.

В настоящее время длительное хранение диагностических сывороток крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней проводится в условиях морозильников со сменой температуры от -20° до -40°С, как прописано в методических указаниях (МУ 3.2.1173-02). При этом по литературным данным, без использования специальных стабилизирующих добавок после 6 месяцев хранения в образцах сыворотки наступают необратимые изменения их физико-химического состояния, что приводит к снижению концентрации диагностических антител (Mary Johnson, 2012). Однако в медицинской практике востребованы технологические приёмы, обеспечивающие сохранение исходного уровня антител для использования образцов диагностических сывороток крови в сроки превышающие нормативные (8 месяцев по ГОСТ Р 53079.4-2008). Так, например, серологический контроль уровней диагностических антител и прогноз развития заболевания у больных эхинококкозом в период диспансерного наблюдения (5 лет) составляет 1 раз в год и, как правило, проводится с применением метода постановки «парных сывороток». Этот метод используется в специализированных лабораториях для обеспечения точности полученных результатов. Особенность его в том, что для проведения сравнительных анализов используют сохраненные образцы сыворотки от одного пациента в разные периоды заболевания (Полетаева О.Г. и др. 1998, 2011).

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 (Постановление Правительства РФ от 1 декабря 2004 г. N 715 "Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих").

Степень научной разработанности темы.

Наиболее широко внедрены в практику здравоохранения методы хранения, связанные с применением низких и ультранизких температур, за счет которых удается сохранить физиологические и аналитические свойства образцов разных по структуре биологических материалов (Грачёв А.Е. 2013; Костоломова Е.Г. 2014; Степанов А.А., 2015; Coussot G. 2018). 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 месяцев при температурах от 4° до 8°С и при -20°С. Стабильность IgM обеспечивается в течение 4 месяца при температуре от 4° до 8°С в течение 6 месяцев при -20°С (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 от 2° до 4°С; более 2-х недель при -20°С; более года при -40°С. Из этого следует, что в нормативных документах и методических указаниях обнаружились разночтения сроков хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*.

Из данных литературы известно, что использование ультранизких температур применительно к сыворотке крови приводит к снижению концентрации диагностических иммуноглобулинов (Жибурт Е.Б. 2002; Никольченко А.Ю. 1997). Применение химических стабилизаторов предотвращает денатурацию белков сыворотки крови за счет понижения точки заморозки в криогенной среде (Гольтяев М.В. 2018; Григорьева А.А. 2016; Калугин Ю.В. 1978; Костяев А.А. 2016). Описано более 120 химических соединений, использующихся в качестве перспективных криопротекторов. Их эффективность зависит от характеристик исследуемого биоматериала и выбранного способа длительного хранения (Андреев А.А. 2014; Сведенцов Е.П. 2010). При проведенном нами патентном поиске не удалось обнаружить сведения об эффективном использовании криоконсервантов для хранения образцов сыворотки крови с антителами к возбудителям тканевых паразитозов.

Таким образом, существует потребность разработки новых способов хранения образцов сыворотки крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней, что позволило сформулировать цель и направления научного исследования.

Целью научной работы является разработка методики криоконсервации для длительного хранения сывороток, содержащих антитела к *Echinococcus granulosus* и *Toxocara canis.*

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи:**

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°С) и при криоконсервации с применением глицерина.

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

4. Разработать новый технологический способ длительного хранения сывороток крови с антителами 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 надежным 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 нормативно-методических документов.

Впервые были получены данные, неучтенные в регламентирующих документах, подтверждающие высокую эффективность применения 10% раствора глицерина и стабилизирующих составов на его основе в концентрациях 1-11% при длительном хранении образцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis*.

Подобраны оригинальные двух- (глицерин, пектин) и многокомпонентные (глицерин, пектин, аскорбиновая кислота, тиомерсал) стабилизирующие составы, применение которых обеспечивает надёжность и высокую эффективность длительного хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* в низкотемпературных условиях.

Разработан новый способ длительного (1 год) хранения образцов диагностических сывороток крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней, 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 сохранения исходных уровней антител в образцах диагностических сывороток крови с

антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при длительном хранении (1 год).

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°С), а также при их криоконсервации.

Новый способ хранения сывороток крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней позволяет создать паспортизированные коллекции для включения в Национальный Банк Сывороток.

Результаты исследований использованы при подготовке методических указаний: Методы контроля биологических и микробиологических факторов МУК 4.2.3533-18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней», утверждённого 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.

Получен патент: «Способ хранения сывороток крови с антителами к возбудителям паразитарных болезней» №2704134 С1**.**

Материалы диссертационной работы включены в образовательную программу «Лабораторная диагностика паразитарных болезней» 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 возбудителям тканевых паразитарных болезней 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°С и криогенной среде при -196°С.
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.

Достоверность научных положений и выводов подтверждена результатами экспериментальных исследований, выполненных на большом объеме диагностического материала, данными их статистической и аналитической обработки на всех этапах работы.

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 2018 г., 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 2017 г., Москва.

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

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

Диссертация апробирована на совместном заседании Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского и

кафедры тропической медицины и паразитарных болезней МПФ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 2 от 22 мая 2019 года)

Личный вклад автора

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 паспорту 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, в том числе 1 в Scopus, а также 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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

Для выполнения поставленных задач был использован комплекс серологических, аналитических и статистических методов, которые обеспечивали реализацию и оценку экспериментальных исследований. В работе использованы оборудование, материалы, реактивы для проведения метода ИФА, прописанные в методических указаниях МУ 3.2.1173-02 «Серологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней». Применялись тест-системы Токсокара-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 *C.cellulosae* (производство R-Biopharm AG Германия).

Воспроизводимость результатов при измерении концентрации диагностических антител в параллельной постановке на разных сериях тест-систем одного производителя в ходе экспериментальных работ была подтверждена и составила 97%.

Для стабилизирующего состава в качестве компонентов были использованы промышленные химические соединения: глицерин ч.д.а. (ГОСТ 6259-75), аскорбиновая кислота, тиомерсал (тимеросал, мертиолят натрия, орто-этилртутьтиосалицилат натрия, $C_9H_9HgNaO_2S$), высокоэтерифицированный яблочный пектин.

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. Суммарная лабораторная ошибка (TE) рассчитывалась по формуле Brooks *Z.* (2002): $TE= (B) + 2SD$ 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%.

Оценка результатов экспериментальных исследований проводилась методом ИФА. Учету и исследованию ИФА не подлежали и отбраковывались образцы сыворотки с механическими повреждениями пробирки в процессе замораживания; образцы, при визуальной оценке имеющие выраженное помутнение и/или выпадение осадка (при длительном хранении их было до 25%). 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 ± 4%), в том числе серонегативность.

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). Сравнение номинальных данных проводилось при помощи критерия χ^2 Пирсона (критерий достоверности результатов оценивался по P (χ^2 Пирсона) $\leq$ 0,05)), 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. Основные направления работы и выполненный объем исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Направления, объекты, показатели и объем исследований

Направления	**Объекты**	**Показатели**	**Объем**
1. Исследование коллекционных образцов сыворотки крови с антителами к *C.cellulosae* и *T.canis* 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 *C.cellulosae* и *T.canis*	Сохранность сыворотки крови с антителами к *C.cellulosae* и *T.canis* в коллекционных образцах сыворотки крови со сроками хранения свыше 10 лет.	**305 образцов сыворотки крови** с антителами к *C. cellulosae* - 53 образца; к *T.canis*-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 *E.granulosus* и *T.canis*	Образцы сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis.*	Сохранность сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* с применением 10% глицерина в разных температурных условиях: -20°, -40°,-196°С	**230 образцов сыворотки крови,** из них - с антителами к *E.granulosus* без криопротекторов - 55 образцов с криопротекторами - 60 образцов*;* - с антителами к *T.canis* без криопротекторов - 55 образцов , с криопротекторами - 60 образцов исследования после хранения при -20°, -40°, -196°С в параллельной постановке в двух лунках х2 = **1380 исследований**
	Образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis.*	Эффективность разных концентраций глицерина для хранения сывороток с антителами к *T.canis* в разных температурных условиях: -20°,-40°, -196°С	**12 образцов сыворотки крови** с антителами к *T.canis* Исследования с 11 концентрациями глицерина и в контроле без консерванта после хранения при -20°, -40°, -196°С в параллельной постановке в двух лунках х2= **864 исследования**
3. Экспериментальный подбор композиции стабилизирующего состава и оценка его эффективности для длительного хранения сывороток крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis.*	Образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis.*	Эффективность разных концентраций пектина для хранения сывороток с антителами к *T.canis* в разных температурных условиях: -20°,-40°,-196°С	**12 образцов сыворотки крови** с антителами к *T.canis* Исследования с 5 концентрациями пектина и в контроле без него после хранения при -20°, -40°, -196°С в параллельной постановке в двух лунках х2=**432 исследования**

Продолжение таблицы 1.

		Эффективность разных концентраций двухкомпонентного состава «пектин + глицерин» для хранения сывороток с антителами к *T.canis* в разных температурных условиях: -20°,-40°, -196°С	**12 образцов сыворотки крови** с антителами к *T.canis* исследования по 5 параметрам композиции консерванта и в контроле без него после хранения при -20°, -40°, -196°С 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 *T.canis* в разных температурных условиях: -20°,-40°, -196°С	**12 образцов сыворотки крови** с антителами к *T.canis* Исследования основы пектин + глицерин с 12 концентрациями аскорбиновой кислоты и тиомерсала и в контроле без консерванта после хранения при -20°, -40°,-196°С в параллельной постановке в двух лунках х2 = **936 исследований**
	Образцы сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis.*	Эффективность разных концентраций стабилизирующего состава для хранения сывороток с антителами к *E.granulosus* и *T.canis.*в разных температурных условиях: -20°,-40°,-196°С	**80 образцов сыворотки крови** с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* Исследовали по 3 параметрам стабилизирующего состава и в контроле после хранения при -20°, -40°, -196°С в параллельной постановке в двух лунках х2 = **1920 исследований**
4. Расчёт систематической погрешности в условиях повторяемости (смещение)	Образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis* и *E.granulosus*	Погрешность результатов измерений	**48 образцов сыворотки крови** с антителами к *T. canis* и *E. granulosus* в параллельной постановке в 8 лунках = **384 исследования**
5. Расчёт воспроизводимости результатов исследования сывороток крови с антителами к *T.canis* и *E.granulosus* в двух сериях тест-систем.	Образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis* и *E.granulosus*	Воспроизводимость результатов измерений на разных сериях тест-систем.	**60 образцов сыворотки крови** с антителами к *T. canis* и *E. granulosus* в параллельной постановке в двух сериях в 2 лунках х2 = **240 исследований**
Всего исследован 771 образец сыворотки крови, выполнено 7198 исследований			

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Для оценки эффективности регламентированных режимов хранения исследовали сохранность исходных параметров сывороток крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней, хранящихся в коллекции института на протяжении 10 и более лет.

Были проанализированы данные полученные предварительно на сыворотках крови с антителами к *C.cellulosae* - за 10 лет хранения около 70% образцов утратили свои исходные уровни антител. При этом после первого года хранения (2012 - 2013 гг.) доля сохранных образцов сыворотки крови не превышала 55%.

В рамках работы провели аналогичные исследования сывороток крови с антителами к *T.canis*. Между параметрами сохранности и сроками хранения в этой группе исследований также наблюдалась линейная зависимость (рис. 1).

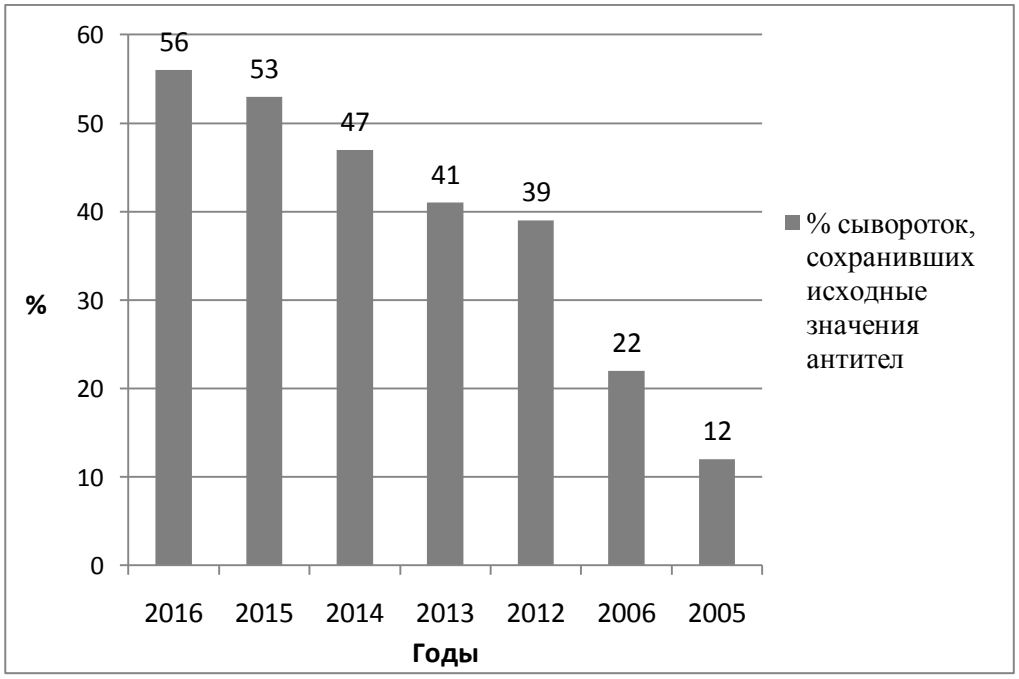

Рисунок 1. Показатель сохранности образцов сыворотки крови с антителами к *T.canis* в зависимости от сроков хранения

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 сохранных образцов сыворотки крови не превышала 56%.

Статистически значимые отличия показателя сохранности получены при сравнении испытуемых образцов сыворотки крови в группах от 2006 г. и 2014 г. (P (χ2 Пирсона) = 0,026) и от 2005 г. и 2013 г. (P (χ2 Пирсона) = 0,003). При сравнении других групп значимых отличий не наблюдалось: 2005 г. и 2006 г. (P (χ2 Пирсона) = 0,206); 2006 г. и 2012 г. (P (χ2 Пирсона) = 0,125); 2006 г. и 2013 г. (P (χ2 Пирсона) = 0,077); 2012 г. и 2013 г. (P (χ2 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 (последовательное хранение при -20°С и -40°С). При этом статистически значимые различия параметров сохранности сывороток крови с антителами к *T.canis* получены при сравнении испытуемых образцов сыворотки после 8 лет хранения.

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°С, -40°С 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. Наши исследования были начаты с применения раствора глицерина в концентрации 10% (рис. 2.), так как эту концентрацию успешно применяли для криоконсервации белков сыворотки крови (Никольченко А.Ю., 1997 г.), но научных и литературных данных его эффективности применительно к образцам сыворотки с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней не найдено.

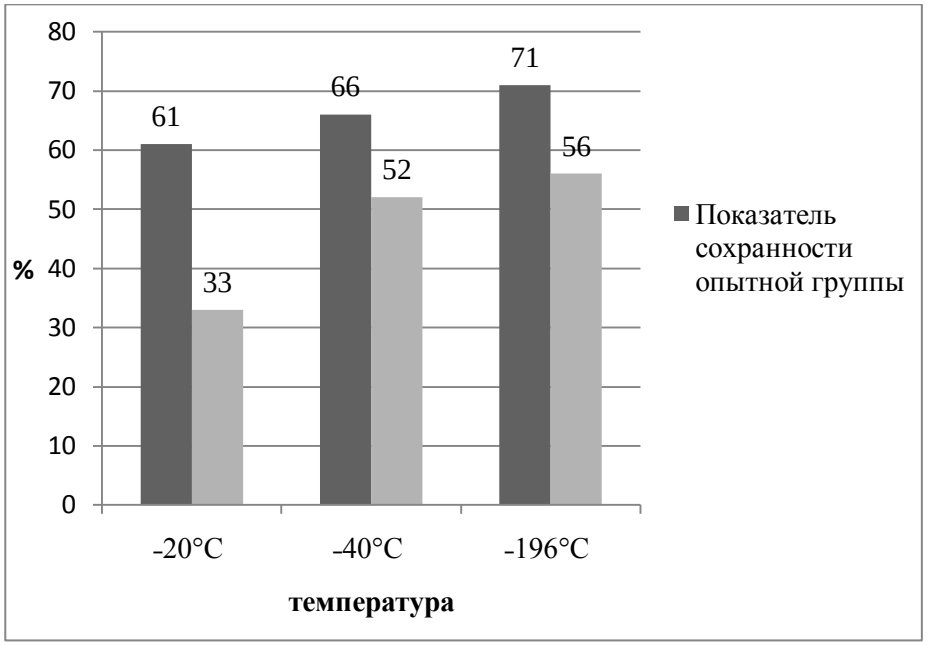

Рисунок 2. Показатели сохранности диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и к *T.canis* при разных температурных режимах хранения с применением 10% р-ра глицерина

Как видно из рисунка, образцы в контрольной группе характеризуются низкой сохранностью, показатель которой не превышает 32% в условиях хранения при -20°С, 51% при -40°С и 56% при -196°С, 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°С и -20°С (Р (χ2 Пирсона) = 0,123)), что подтверждает обоснованность регламентных условий. Получены новые данные об отсутствии достоверных отличий между сохранностью испытуемых образцов сыворотки крови при -196°С и -40°С (Р (χ2 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 -20°С (Р (χ2 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 (Р (χ2 Пирсона) = 0,001). Применение криоконсерванта повысило показатель сохранности образцов при длительном их хранении (один год) при -20°С до 62%; при -40°С 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°С и ниже обеспечивает сохранность сыворотки в 2 раза (от 1,4 до 3,6 раз) с учетом

среднеквадратичной ошибки 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, что следует из анализа 95% доверительного интервала для EXP (B). Применяемая модель регрессии статистически значима Хи-квадрат=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.

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).

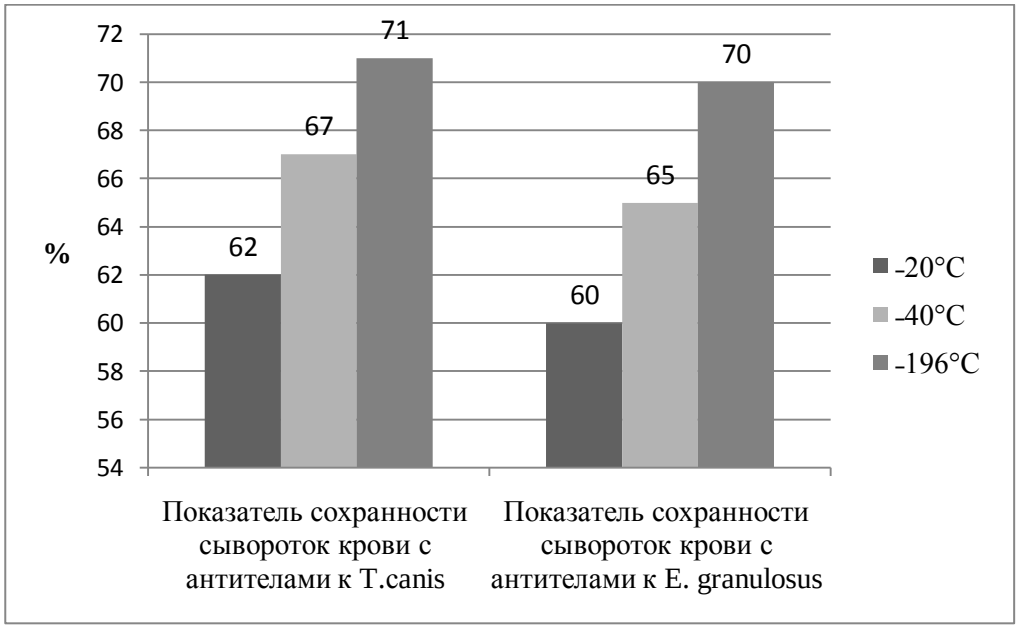

Рисунок 3. Сравнительная характеристика показателей сохранности образцов диагностических сывороток с антителами к *E.granulosus* и с антителами к *T.canis* после года хранения с 10% глицерином

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 (χ2 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*. Качественная оценка эффективности испытуемых концентраций глицерина проводилась при сохранности не менее 60% образцов, полученной при испытании 10% р-ра глицерина (табл. 2.).

Таблица 2.

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

Группы испытаний	Концентрации глицерина (об.%)	M	Температура хранения		
			-20°C	-40°C	-196°C
0	Контроль (без глицерина)	-	-	-	-
I	1-3	2 ± 1	-	-	-
II	4-7	5,5 ± 1.5	+	-	-
III	8-11	9,5 ± 1.5	+	+	+
IV	12-15	13,5 ± 1.5	+	+	+
V	16-19	17,5 ± 1.5	-	-	+
VI	20-23	21,5 ± 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.).

Таблица 3.

Сравнительная оценка результатов между группами с различной концентрацией глицерина

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

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(0);
- Категория B включала в себя группы II, III, IV, V с концентрациями глицерина 4-7 % ,8-11 %, 12-15%,16-19 %;

- Категория С 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 Р (χ2 Пирсона) $\leq$ 0,05 (табл. 4).

Таблица 4.

Сравнительная оценка результатов между категориями испытаний

Категории испытаний	Р (критерий χ2 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.

Показана 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.

РАЗРАБОТКА ДВУХ- И МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СОСТАВОВ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК КРОВИ С АНТИТЕЛАМИ К *E.GRANULOSUS* И *T.CANIS*

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. 2) в эксперименты был введен пектин, обладающий свойством гелеобразования, которое усиливается в данной комбинации. Предварительно опытным путем были проведены испытания эффективности разных концентраций пектина от 0,05% до 0,59%. Оценивали качественно аналогично испытаниям глицерина (табл. 5).

Таблица 5.

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

Концентрации пектина (об.%)	M	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°C; 0,27-0,37 % при -20°C, -40°C; 0,49-0,59% при -196°C; 0,38-0,48 % при -20°C, -40°C, -196°C.

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

Для определения статистических различий были использованы все испытуемые концентрации пектина с глицерином I, II, III, IV, V групп разведений (табл. 6).

Таблица 6.

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

Группы СС	Концентрации глицерина и пектина (об.%)	M	Эффективность СС, %		
			-20°C	-40°C	-196°C
0	Контроль (Без консерванта)	-	36	55	58
I	1-3+0,05-0,15	(2±1) + (0,1±0,05)	82	75	73
II	4-7+0,16-0,26	(5,5±1.5) + (0,21±0,05)	83	82	83
III	8-11+0,27-0,37	(9,5±1.5) + (0,32±0,05)	82	83	83
IV	12-15+0,38-0,48	(13,5±1.5) + (0,43±0,05)	67	75	73
V	16-19+0,49-0,59	(17,5±1.5) + (0,54±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 при длительном (1 год) хранении биообразцов в условиях эксперимента 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°С; 64% при -40°С; 67% при -196°С.

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

Достоверность результатов оценивалась по Р (χ2 Пирсона) ≤ 0,05. Результаты испытаний во всех опытных группах достоверно отличались от результатов в контрольной группе.

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 моноконсерванта - 10% р-ра глицерина (Р (χ2 Пирсона) = 0,002).

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». В образцы сыворотки крови с антителами к *T.canis* с I, II и III двухкомпонентными стабилизирующими составами «глицерин + пектин» вносились разные концентрации растворов аскорбиновой кислоты и тиомерсала. Образцы закладывались на хранение в условиях низкотемпературных режимов замораживания. Результаты ИФА подсчитывались с учетом суммарной лабораторной ошибки.

Эффективность сочетанных действий стабилизирующих составов оценивалась по показателю сохранности биообразцов в течение одного года.

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

Полученные результаты в опытных группах достоверно выше показателей в контрольной группе (Р (χ2 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. Для чего в опытах были рассчитаны и применены среднеарифметические значения диапазонов эффективных концентраций криопротективных веществ (табл. 7).

Таблица 7.

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	-

Эффективность испытанного многокомпонентного стабилизирующего состава, обеспечивающего сохранность образцов сыворотки крови при паразитозах в течение одного года, представлена на рисунке 4.

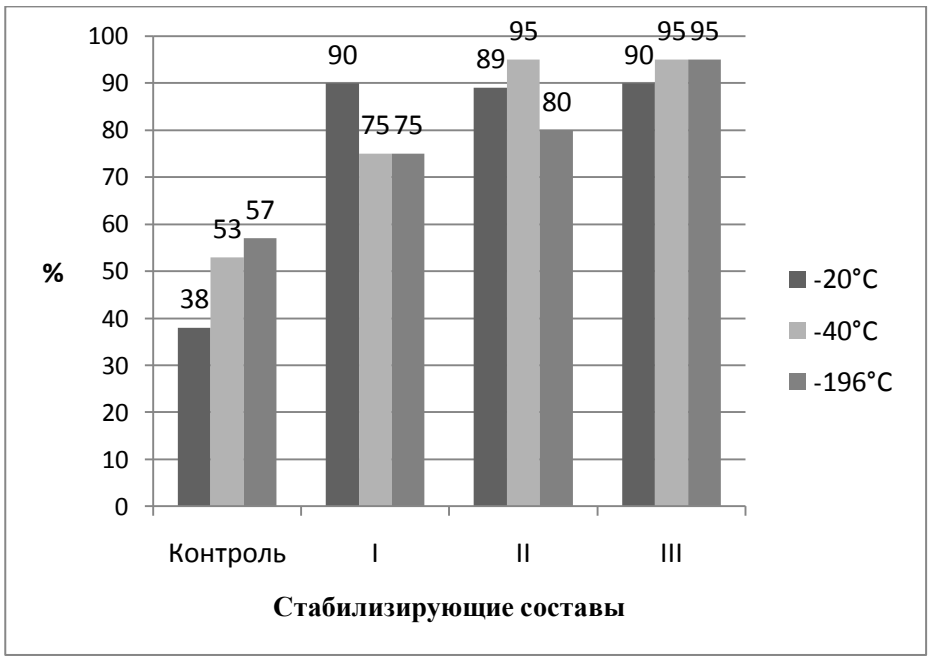

Рисунок 4. Сохранность образцов сыворотки крови с антителами к *E.granulosus* и *T.canis* при применении разработанного оригинального стабилизирующего состава

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

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

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

III - 90% при -20°С; 95% при -40°С; 95% при -196°С.

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°С (СС I); 95% при -40°С (СС II); 90% при -20°С, 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 (Р (χ2 Пирсона) = 0,03).

Отсутствие статистических различий эффективностей получено между СС II и СС III (Р (критерий χ2 Пирсона) = 0,161), что подтверждает возможность их равнозначного использования для поставленных экспериментом целей.

Обобщая теоретические данные и сведения экспериментов по подбору эффективных композиционных смесей с выраженным криопротективным действием, нами был разработан многокомпонентный 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 (Р (χ2 Пирсона) = 0,003).

Таким образом, нами создан простой и надежный способ стабилизации сывороток крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней, 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 возбудителям тканевых паразитарных болезней, 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°С) для длительного хранения образцов сыворотки крови с антителами к возбудителям тканевых паразитарных болезней, 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°С (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°С; 66% при -40° С, 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 многокомпонентного 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Степанова Е.В., Максимова М.С., Жнакина Ж.В., Авдеева О.Н., Лебедева М.Н. Формирование банка сывороток крови больных паразитозами // Справочник заведующего КДЛ. - 2014. - № 8. - С. 25-31.
2. **Жнакина Ж.В.**, Кузнецова К.Ю., Мания Т.Р., Сергиев В.П. Изменение диагностической характеристики антител к Cysticercus cellulosae в коллекционных образцах сыворотки крови в зависимости от сроков хранения в условиях глубокого замораживания. // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. -2017.- № 1. -С. 27-29.
3. Жнакина Ж.В., Кузнецова К.Ю. Разработка научно обоснованных подходов к управлению процессами сохранения активности диагностических сывороток при ларвальных паразитарных болезнях // В сборнике: Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия антропогенно детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения Материалы Международного Форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды. - 2017. - С. 153-156.
4. Кузнецова К.Ю., **Жнакина Ж.В.,** Мания Т.Р., Кузнецова М.А. Разработка научно обоснованных подходов к управлению процессами сохранения активности диагностических сывороток при ларвальных паразитарных болезнях. // Гигиена и санитария. - 2018. Т. 97.- № 11. -С. 1098-1101.
5. Жнакина Ж.В., Кузнецова К.Ю. Разработка методологии дифференцированного подхода к управлению процессами хранения сывороток больных паразитарными болезнями // В книге: Современные проблемы оценки, прогноза и управления экологическими рисками здоровью населения и окружающей среды, пути их рационального решения Материалы III Международного форума Научного совета Российской Федерации по экологии человека и гигиене окружающей среды. - 2018. - С. 113-115.
6. Жнакина Ж.В., Мания Т.Р., Кузнецова К.Ю. Сравнительная оценка сохранности диагностических параметров сыворотки крови с антителами к Echinococcus spp. при длительном хранении в разных условиях замораживания // В книге: Окружающая среда и здоровье. Инновационные подходы в решении медико-биологических проблем здоровья населения Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. - 2018. - С. - 104-106.
7. **Жнакина Ж.В.**, Кузнецова К.Ю. Экспериментальные данные об оптимизации технологий длительного сохранения функциональной активности сывороток с антителами к Echinococcus spp. и Toxocara spp. в условиях низких температур.// Медицинская паразитология и паразитарные болезни. -2018. -№ 4. -С. 26-32.