MED. DOŚW. MIKROBIOL., 2012, 64: 79 - 85

Wpływ wielokrotnego, cyklicznego zamrażania i rozmrażania próbki surowicy na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla wybranych antygenów bakteryjnych

Effect of multiple freeze-thaw cycles on detection of IgA, IgG and IgM antibodies to selected bacterial antigens

Waldemar Rastawicki, Karolina Śmietańska, Natalia Rokosz, Marek Jagielski

Zakład Bakteriologii Narodowego Instytutu Zdrowia
Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie

Oceniono wpływ wielokrotnego, cyklicznego zamrażania i rozmrażania próbki surowicy na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla antygenów *M. pneumoniae, Yersinia enterocolitica i Salmonella sp*. Uzyskane wyniki wykazały, że nawet 30-krotne zamrożenie i rozmrożenie próbki surowicy nie ma istotnego wpływu na poziom przeciwciał dla wybranych lipopolisacharydowych i białkowych antygenów bakteryjnych.

ABSTRACT

Introduction. In presented study we investigated the effect of multiple freeze-thaw cycles of human sera on the determination of IgA, IgG and IgM antibodies to selected bacterial antigens.

Methods. A panel of 15 serum samples with elevated levels of antibodies to *Mycoplasma peumoniae*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* spp. were used (5 positive sera for each pathogen). One set of aliquots designed as the baseline, was taken and stored at 4-8^{o}C for the remainder for the study. The remaining seven sets of aliquots were divided into two parts and repeatedly frozen respectively at two different temperatures: -65^{o}C and -25^{o}C. Once a day the aliquot sets were removed from the freezer and allowed to stand at room temperature for approximately 1 h until completely thawed. For the determination of the level of antibodies the sera after: 2, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 freeze/cycle were used. The measurement of IgA, IgG and IgM antibodies was done using a home-made ELISA with four different antigens: whole-cell antigen of *M. pneumoniae* FH strain, LPS and Yop antigens of *Y. enterocolitica* serotype O:3 and LPS extracted by Westphal method from *Salmonella* serogroup B +D. The results were presented as the arithmetic mean of the antibody titre in five sera which were treated by the same number of freeze-thaw cycles

Results. There was no significant statistic difference between levels of antibodies in unfrozen and frozen sera even after 30 freeze-thaw cycles. Depending of the antigen used in ELISA a slight varations in the level of antibodies were observed but the changes were small and not clinically significant. Examination of the ELISA values does not suggest any consistent nonlinear trend in levels of IgA, IgG and IgM antibodies in sera frozen at -65° C as well at -25° C.
Conclusions. Our study demonstrates that the IgA, IgG and IgM antibody activity levels measured for *M. pneumoniae*, *Y. enterocolitica and Salmonella* antigens are stable even after 30 freeze-thaw cycles.

WSTĘP

Badanie odczynem immunoenzymatycznym ELISA poziomu swoistych przeciwciał w próbkach surowicy uzyskanych od osób chorych z zakażeniami bakteryjnymi jest często wykonywanym, rutynowym badaniem diagnostycznym w laboratoriach mikrobiologicznych. Po wykonaniu oznaczeń, próbki te są niejednokrotnie zamrażane i wykorzystywane ponownie w badaniach diagnostycznych lub też w badaniach naukowych. W większości procedur badawczych zaleca się unikania wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek surowicy. Zachodzi więc pytanie w jakim stopniu proces ten ma wpływ na poziom przeciwciał obecnych w surowicy i czy próbki w ten sposób traktowane są nadal wartościowym materiałem badawczym.

Celem badań była ocena wpływu wielokrotnego, cyklicznego zamrażania i rozmrażania próbki surowicy na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla wybranych antygenów bakteryjnych.

MATERIAŁ I METODY

Próbki surowicy. Przedmiotem badań było 15 próbek surowicy uzyskanych w roku 2011 od osób chorych z objawami ze strony układu oddechowego bądź też ze strony układu pokarmowego. Do badań przeznaczono po 5 próbek surowicy, w których we wcześniej przeprowadzonych rutynowych badaniach diagnostycznych wykryto podwyższonych poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla antygenów *Mycoplasma pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* serotypu O:3 oraz pałeczek *Salmonella* z grupy serologicznej B lub D. Do czasu przeprowadzenia doświadczenia próbki te były przetrzymywane w temperaturze – 65° C.

Procedura przeprowadzania cykli rozmrażania i zamrażania próbek surowicy. Wielokrotne rozmrażanie i zamrażanie próbek surowicy przeprowadzono według następującej procedury:

1. Wybrane surowice rozmrożono, dokładnie wymieszano (wortex) i rozlano do 2 osobnych probówek Eppendorfa w objętości po 500 µl. Odpowiednio oznaczone (jedna temp. –65°C a druga temp. –25°C) probówki zawierały pierwotną, wyjściową do dalszych cykli zamrażania i rozmrażania surowicę. Następnie z każdej probówki pobrano po 50 µl surowicy, którą przetrzymywano do czasu wykonania badania w temp. 4-8° C (próbka

nr 1). Próbki przetrzymywane w chłodni nie podlegały dalszym cyklom zamrożenia i rozmrożenia. Dodatkowo, również z każdej probówki, pobrano po 50 µl surowicy, którą zamrożono, odpowiednio w temperaturze –65°C bądź –25°C (próbka nr 2).

2. Pozostałą, wyjściową próbkę surowicy zamrażano w odpowiednich temperaturach na okres 1-3 dni, po czym rozmrażano w temperaturze pokojowej w ciągu 1 godziny. Cykl ten powtarzano czterokrotnie.
3. Po czwartym cyklu zamrażania i rozmrażania, z każdej probówki wyjściowej, po dokładnym wymieszaniu zawartości, pobrano po 50 µl surowicy, którą zamrożono w odpowiednich temperaturach (próbka nr 3).
4. Kolejne próbki surowicy (próbki nr 4-8) uzyskano pobierając, w odstępach co 5 cykli, po 50 µl surowicy z cyklicznie zamrażanej i rozmrażanej próbki wyjściowej.
5. W planowanym dniu przeprowadzenia oznaczeń, wszystkie zamrożone próbki surowicy (próbki 2-8) rozmrożono i poddano, razem z próbkami przetrzymywanymi w chłodni (próbka nr 1) badaniom serologicznym w odpowiednim kierunku.

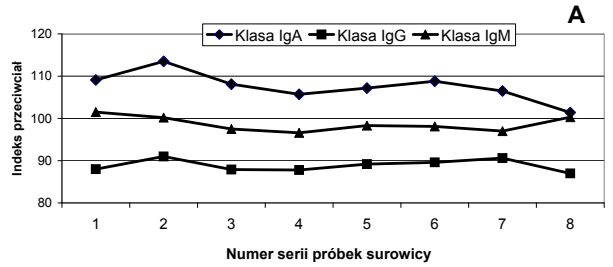
Łączny czas trwania doświadczenia (30 cykli zamrażania i rozmrażania próbek surowicy) trwał 6 tygodni. Ogółem uzyskano 8 serii każdej próbki surowicy: przechowywanej w chłodni (w temp. 4-8° C) bądź też cyklicznie zamrażanej w dwóch różnych temperaturach: - 25° C i – 65° C (Tabela I).

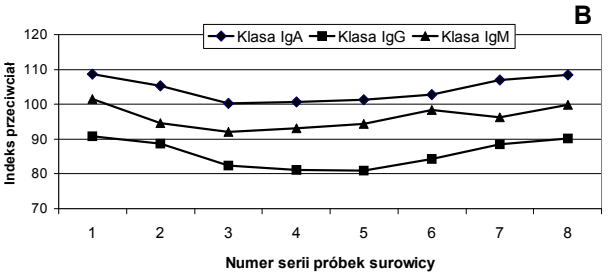
Tabela I. Ogólna liczba przeprowadzonych cykli zamrażania i rozmrażania poszczególnych próbek surowicy.

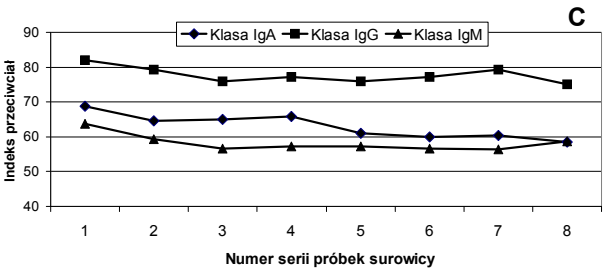
Numer serii próbek surowicy	Liczba cykli zamrażania i rozmrażania	
Nr 1	Próbka 1 raz rozmrożona i przetrzymywania w chłodni w temp. 4-8°C	
	Temperatura zamrażania -25°C	Temperatura zamrażania -65°C
Nr 2	Próbka 2 x zamrożona	Próbka 2 x zamrożona
Nr 3	Próbka 5 x zamrożona	Próbka 5 x zamrożona
Nr 4	Próbka 10 x zamrożona	Próbka 10 x zamrożona
Nr 5	Próbka 15 x zamrożona	Próbka 15 x zamrożona
Nr 6	Próbka 20 x zamrożona	Próbka 20 x zamrożona
Nr 7	Próbka 25 x zamrożona	Próbka 25 x zamrożona
Nr 8	*Próbka 30 x zamrożona*	Próbka 30 x zamrożona

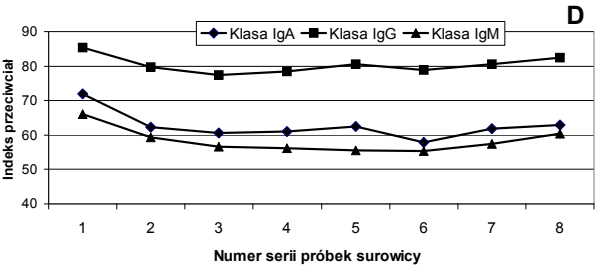
Badania serologiczne. Wszystkie badania przeprowadzono przy użyciu odczynu immunoenzymatycznego ELISA, poszukując w badanych próbkach surowicy przeciwciał osobno w klasie immunoglobulin A, G i M, bezpośrednio po ostatnim rozmrożeniu próbek. Badania przeprowadzono zgodnie z procedurami przyjętymi w rutynowych badaniach diagnostycznych w Zakładzie Bakteriologii NIZP-PZH wyznaczając indeks przeciwciał, obliczany jako stosunek absorbancji (OD) próbki badanej do absorbancji kontroli cut-off. Posłużono się następującymi testami ELISA:

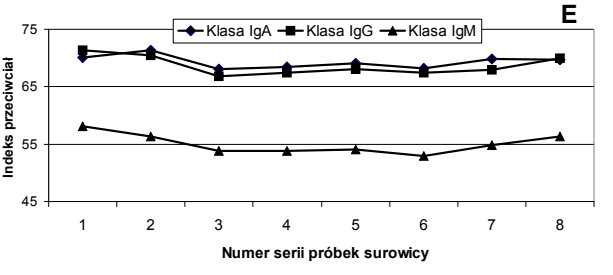
Test immunoenzymatyczny ELISA w kierunku wykrywania przeciwciał dla antygenów *M. pneumoniae*. Badania przeprowadzono zgodnie z procedurą podaną uprzednio (2). Jako antygenu użyto homogennej zawiesiny fragmentów błon komórkowych uzyskanych po rozbiciu ultradźwiękami komórek szczepu FH *M. pneumoniae*.

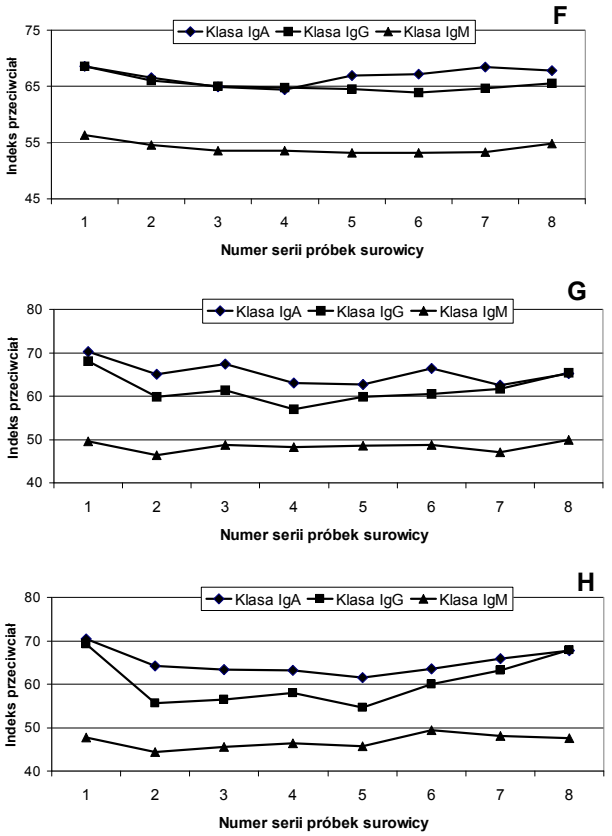

A
Klasa IgA
Klasa IgG
Klasa IgM
Indeks przeciwciał
120
110
100
90
80
1
2
3
4
5
6
7
8
Numer serii próbek surowicy


B
Klasa IgA
Klasa IgG
Klasa IgM
Indeks przeciwciał
120
110
100
90
80
70
1
2
3
4
5
6
7
8
Numer serii próbek surowicy


C
Klasa IgA
Klasa IgG
Klasa IgM
Indeks przeciwciał
90
80
70
60
50
40
1
2
3
4
5
6
7
8
Numer serii próbek surowicy


D
Klasa IgA
Klasa IgG
Klasa IgM
Indeks przeciwciał
90
80
70
60
50
40
1
2
3
4
5
6
7
8
Numer serii próbek surowicy


E
Klasa IgA
Klasa IgG
Klasa IgM
Indeks przeciwciał
75
65
55
45
1
2
3
4
5
6
7
8
Numer serii próbek surowicy



Rycina 1. Wpływ kolejnych cykli zamrażania i rozmrażania na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM oznaczanych metodą ELISA. Na rycinie przedstawiono średnie wartości indeksu przeciwciał wyliczone z badania 5 próbek surowicy w danej serii zamrażania i rozmrażania. A- próbki surowicy zamrażane w temp. –25° C badane z antygenem *M. pneumoniae*; B- próbki surowicy zamrażane w temp. –65° C badane z antygenem *M. pneumoniae*; C- próbki surowicy zamrażane w temp. –25° C badane z antygenem Yop pałeczek *Yersinia*, D- próbki surowicy zamrażane w temp. –65° C badane z antygenem Yop pałeczek *Yersinia*, E - próbki surowicy zamrażane w temp. –25° C badane z antygenem LPS pałeczek *Yersinia* O:3; F - próbki surowicy zamrażane w temp. –65° C badane z antygenem LPS pałeczek *Yersinia* O:3; G - próbki surowicy zamrażane w temp. –25° C badane z antygenem LPS pałeczek *Salmonella*, H- próbki surowicy zamrażane w temp. –65° C badane z antygenem LPS pałeczek *Salmonella.*

Test immunoenzymatyczny ELISA w kierunku wykrywania przeciwciał dla antygenów somatycznych (LPS) oraz białek wydzielniczych Yop pałeczek *Y. enterocolitica* grupy O:3. Odczyn ELISA przeprowadzono na płytkach polistyrenowych firmy Nunc zgodnie z metodyką opisaną uprzednio (3). Oczyszczony preparat antygenu somatycznego jak również białek wydzielniczych Yop uzyskano we własnym zakresie.

Test immunoenzymatyczny ELISA w kierunku wykrywania przeciwciał dla antygenów pałeczek *Salmonella* z grupy B+D. Badanie przeprowadzono na płytkach polistyrenowych firmy Nunc, oznaczając poziom przeciwciał dla mieszaniny wagowo równych ilości lipopolisacharydów uzyskanych z pałeczek *Salmonella* grupy B i D metodą Westphala (Sigma, nr kat. L-6011 i L-6511) (4).

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Na rycinie 1 przedstawiono wpływ kolejnych cykli zamrażania i rozmrażania na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla antygenów *M. pneumoniae*, *Y. enterocolitica* i pałeczek *Salmonella*. Wartości zaprezentowane na rycinie są średnimi arytmetycznymi wartościami indeksu przeciwciał, wyliczonymi z badania wszystkich 5 próbek surowicy pochodzącymi z danej serii zamrażania i rozmrażania.

Przeprowadzone badania nie wykazały istotnych różnic w poziomie przeciwciał w próbkach surowicy poddawanych różnej liczbie cykli zamrażania i rozmrażania. Stosunkowo największe różnice zauważono pomiędzy próbkami przetrzymywanymi w chłodni a próbkami wielokrotnie zamrażanymi. Nie stwierdzono wspólnej dla wszystkich użytych antygenów, wyraźnej tendencji do spadku czy też wzrostu poziomu przeciwciał w kolejnych seriach próbek surowicy. Obserwowane, niewielkie różnice miały charakter przypadkowy i wynikały z zastosowania bardzo czułej metody badawczej. Co ciekawe, nie stwierdzono również żadnych istotnych różnic w przebiegu krzywych w zależności od klasy badanych przeciwciał czy też od temperatury mrożenia próbek surowicy.

Poziom przeciwciał w próbkach surowicy poddanych 30 cyklom zamrożenia i rozmrożenia (seria nr 8) w stosunku do poziomu przeciwciał w surowicy przetrzymywanej w chłodni (seria nr 1) był co prawda niższy w każdym badanym przypadku, ale różnice te były zaledwie kilku-kilkunasto procentowe, i nie miały wpływu na końcową interpretację wyniku badania (Tabela II).

Tabela II. Różnice (w odsetkach) w poziomie przeciwciał dla wybranych patogenów bakteryjnych w próbkach surowicy poddanych 30-cyklom zamrożenia i rozmrożenia w stosunku do surowic przetrzymywanych w chłodni.

Antygen	Próbki surowicy zamrażane w –25° C			Próbki surowicy zamrażane w –65° C		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
M. pneumoniae	- 7,1%	- 1,1%	- 0,2 %	- 0,2 %	- 0,6 %	- 1,7 %
Białka Yop *Yersinia*	- 15,0 %	- 8,5%	- 8,0%	- 12,4%	- 3,4%	- 8,6%
LPS O:3 *Yersinia*	- 0,6%	- 2,0%	- 2,9%	- 1,2%	- 4,5%	- 2,7%
LPS *Salmonella*	- 7,3%	- 4,0%	- 0,6%	- 3,7%	- 2,0%	- 0,4%

Wartości odchylenia standardowego wyników uzyskanych z badania wszystkich 8 serii próbek surowicy były bardzo niskie i wahały się w zależności od kierunku badania od 1,1 do 5,6. Podobnie różnice w poziomie przeciwciał, pomiędzy wartościami uzyskanymi w badaniu pierwszych 4 serii próbek surowicy (liczba cykli zamrażania i rozmrażania od 1 do 10) były nieistotne w porównaniu do wartości uzyskanych w badaniu kolejnych 4 serii (liczba cykli od 15 do 30).

W przeprowadzonych badaniach nie dysponowano świeżo uzyskanymi, nie mrożonymi próbkami surowicy. Wszystkie badane surowice było poprzednio przetrzymywane w głębokim zamrożeniu przez okres kilku miesięcy. Tak więc, nie mogliśmy ocenić wpływu jednokrotnego zamrożenia na poziom przeciwciał w stosunku do poziomu wyjściowego w jednej serii doświadczenia. W naszych badaniach ograniczyliśmy się więc do oceny wpływu wielokrotnego zamrażania i rozmrażania surowic na poziom przeciwciał. Uzyskane wyniki wykazały, że nawet 30-krotne zamrożenie i rozmrożenie próbki surowicy nie ma istotnego wpływu na poziom przeciwciał klasy IgA, IgG i IgM dla wybranych lipopolisacharydowych jak i białkowych antygenów bakteryjnych.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących wpływu powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania próbek surowicy na poziom zawartych w nich przeciwciał dla antygenów bakteryjnych. W analogicznych badaniach przeprowadzonych odczynem ELISA w kierunku zakażeń wirusowych uzyskano niejednoznaczne wyniki. *Siennicka* i wsp. (5) nie stwierdzili wpływu dziesięciokrotnego rozmrożenia i zamrożenia próbki surowicy na obecność przeciwciał zarówno klasy IgG jak i IgM dla antygenów wirusa cytomegalii i odry. Podobnie *Pinsky* i wsp. (1), również podczas 10-krotnie powtarzanych cykli zamrażania i rozmrażania próbek surowicy, nie zauważyli spadku poziomu przeciwciał klasy IgG dla wirusów świnki, odry i różyczki. Z kolei *Truszkiewicz* (6) stwierdził nieznaczny wzrost poziomu przeciwciał anty–HAV oraz anty-EBV klasy IgG (odpowiednio o 28,79% oraz 16,89%) w próbkach surowicy poddanych 38 cyklom zamrażania i rozmrażania w stosunku do miana wyjściowego.

PIŚMIENNICTWO

1. *Pinsky NA, Huddleston JM, Jacobson RM* i inni. Effect of multiple freeze – thaw cycles on detection of measles, mumps, and rubella virus antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10: 19-21.
2. *Rastawicki W*. Ocena odczynami tradycyjnymi i nowej generacji odpowiedzi humoralnej na antygeny *Mycoplasma pneumoniae* w przebiegu naturalnego zakażenia u ludzi. Praca doktorska PZH, Warszawa, 1994.
3. *Rastawicki W, Jagielski M., Kałużewski S, Gierczyński R*. Porównanie przydatności testu ELISA opracowanego we własnym zakresie i komercyjnego testu ELISA firmy Mikrogen do serologicznej diagnostyki zakażeń wywoływanych przez pałeczki z rodzaju *Yersinia*. Med Dośw Mikrobiol 2001, 53: 355 - 60.
4. *Rastawicki W, Rokosz N, Jagielski M*. Przydatność wybranych lipopolisacharydowych preparatów antygenowych uzyskanych z pałeczek *Salmonella* grupy serologicznej B i D do serodiagnostyki salmonelozy. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 65-71.
5. *Siennicka J, Laskowska A, Trzcińska A*. Wpływ wielokrotnego rozmrażania próbki na stabilność przeciwciał klasy IgG i IgM. Med Dośw Mikrobiol 2010; 62: 281-3.
6. *Truszkiewicz W*. Wpływ warunków przechowywania na wyniki oznaczeń poziomu przeciwciał w próbkach ludzkiej surowicy. Med Dośw Mikrobiol 2011; 63: 189-93.

Otrzymano: 28 II 2012 r.

Adres Autora: 00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii NIZP-PZH
e-mail: wrastawicki@pzh.gov.pl