

ЭОЖ 619:57.083

МИНЕРАЛДЫ ҚЫШҚЫЛДАР НЕГІЗІНДЕ ДАЙЫНДАЛҒАН ИММУНОФЕРМЕНТТІК ТАЛДАУДЫҢ ТЕЖЕГІШ РЕАГЕНТТЕРІН САЛЫСТЫРМАЛЫ ЗЕРТТЕУ

Исмагамбетов Б.М.^{1*}, Шоманова С.Е.¹, Ахажанова И.А.¹, Есимбекова Н.Б.¹, Ершебулов З.Д.¹¹«OtarBioPharm» жауапкершілігі шектеулі серіктестігі, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский кенті, 5 ғимарат, 080409

* Автор-корреспондент: bekza88@mail.ru

ТҮЙІН

Иммуноферменттік талдау ветеринариялық диагностикада жұқпалы ауруларға қарсы антиденелерді анықтаудың кеңінен қолданылатын жоғары сезімтал иммунологиялық әдістерінің бірі болып табылады. Талдау нәтижелерінің дәлдігі ферментативтік реакцияның толық және уақтылы тоқтатылуына тәуелді, ал бұл кезеңде қолданылатын тежегіш реагенттің құрамы мен қышқылдық қасиеттері шешуші рөл атқарады. Осы жұмыста минералды қышқылдар негізінде дайындалған тежегіш реагенттердің иммуноферменттік талдаудағы әсері салыстырмалы түрде бағаланды.

Зерттеу барысында тұз, ортофосфор және күкірт қышқылдарынан әртүрлі концентрацияда ерітінділер дайындалып, бәсекелі иммуноферменттік талдау жүйесінде қолданылды. Ферментативтік реакция тоқтатылғаннан кейін теріс және оң бақылаулардың оптикалық тығыздығы өлшеніп, оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісі, теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас және вариация коэффициенті есептелді.

Нәтижелер қышқыл түрі мен концентрациясының талдау сигналдарының тұрақтылығына айқын әсер ететінін көрсетті. Тұз қышқылы 0,5-4,0 М диапазонында оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісінің төмен деңгейін және теріс және оң бақылаулар арасындағы жоғары қатынасты қамтамасыз етті. Ортофосфор қышқылы қолданылған жағдайда оң бақылауда сигналдың уақыт бойынша өсуі байқалды, бұл ферментативтік реакцияның толық тоқтамауын көрсетеді, ал күкірт қышқылы ерітінділерінде К- және К+ сигналдарының қатар төмендеуі хромогендік өнімнің тұрақсыздануына байланысты бақылаулар арасындағы айырмашылықтың азаюына әкелді.

Алынған деректер иммуноферменттік талдауда тежегіш реагентті ғылыми негізде таңдаудың аналитикалық сенімділік пен нәтижелердің қайта өндірілуін қамтамасыз етудегі маңыздылығын көрсетті.

Түйін сөздер: иммуноферменттік талдау, тежегіш реагент, минералды қышқылдар, тұз қышқылы, ортофосфор қышқылы, күкірт қышқылы, оптикалық тығыздық, ветеринариялық диагностика.

КІРІСПЕ

Иммуноферменттік талдау (ИФТ) антиген мен антидене арасындағы өзара әрекеттесуге негізделген және ферменттік конъюгат пен хромогенді субстрат арқылы нәтижені тіркеуге мүмкіндік беретін кеңінен қолданылатын иммунологиялық әдіс болып табылады [1, 2]. Бұл әдіс жоғары сезімталдығымен, салыстырмалы қарапайым орындалуымен және бір мезгілде көптеген үлгілерді талдау мүмкіндігімен ерекшеленеді. Ветеринариялық практикада ИФТ жұқпалы ауруларға қарсы серологиялық мониторинг жүргізуде, вакцинация тиімділігін бағалауда және жасырын инфекцияларды анықтауда маңызды құрал ретінде пайдаланылады [2, 3].

Блютанг вирусына қарсы антиденелерді анықтауға арналған бәсекелі иммуноферменттік талдау халықаралық деңгейде ұсынылатын стандартты скринингтік әдістердің қатарына жатады [3-6]. Бұл тест-жүйелер жануарлар популяциясындағы серологиялық жағдайды бағалауға және індеттің таралу динамикасын бақылауға мүмкіндік береді.

Қазіргі ИФТ жүйелерінде жиі қолданылатын хромогендік жұптардың бірі – тетраметилбензидин мен желкек пероксидазасы (HRP) жүйесі болып табылады [1, 7]. Желкек пероксидазасы тетраметилбензидинді тотықтыру арқылы алдымен көк түсті аралық өнім түзеді, ал күшті қышқыл ортада бұл өнім протондану нәтижесінде тұрақты сары түске ауысып, 450 нм толқын ұзындығында өлшенеді [7, 8]. Ферментативтік реакцияны тоқтатуға арналған ерітінді талдау хаттамасында тежегіш реагент

ретінде пайдаланылады.

Тежегіш реагенттің қышқылдық қасиеттері ферменттің толық инактивациялануына және түзілген түстің тұрақтылығына тікелей әсер етеді. Қышқылдық жеткіліксіз болған жағдайда реакция толық тоқтамай, оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша артуы жалғасуы ықтимал. Ал шамадан тыс агрессивті ортада хромофордың тұрақсыздануы немесе түстің әлсіреуі байқалады [7-9]. Мұндай өзгерістер теріс және оң бақылаулар арасындағы айырмашылықты төмендетіп, тест-жүйенің аналитикалық сипаттамаларына ықпал етеді.

Әдеби деректерде тежегіш реагент ретінде көбіне минералды қышқылдар – тұз қышқылы, ортофосфор қышқылы және күкірт қышқылы – қолданылатыны көрсетіледі [2, 7-9]. Алайда олардың нақты концентрациялық диапазондары мен сигнал тұрақтылығына әсері әрдайым жүйелі түрде салыстырылмайды. Бұрын жүргізілген зерттеуде тұз қышқылы негізіндегі тежегіш реагенттің белгілі бір концентрациясы бәсекелі ИФТ нәтижелерінің дәлдігі мен қайта өндірілуін жақсартатыны анықталған [10].

Блютанг вирусына қарсы серологиялық мониторинг жүргізуде қолданылатын бәсекелі иммуноферменттік талдаулардың диагностикалық дәлдігі реагенттердің сапасына және аналитикалық параметрлердің тұрақтылығына тәуелді екені көрсетілген [11]. Осыған байланысты соңғы жылдары ИФТ сезімталдығын арттыру және нәтижелердің тұрақтылығын қамтамасыз ету бағытында бірқатар технологиялық жетілдірулер ұсынылған [12]. Бұл зерттеу

улер талдау компоненттерінің, соның ішінде ферменттік жүйе мен реакцияны тоқтататын ерітіндінің, аналитикалық нәтижеге елеулі әсер ететінін көрсетеді.

Сонымен бірге әртүрлі минералды қышқылдарды бір диагностикалық жүйе аясында салыстырмалы түрде бағалау жеткілікті деңгейде зерттелмеген. Осыған байланысты бұл жұмыстың мақсаты – минералды қышқылдар негізінде дайындалған тежегіш реагенттердің бәсекелі иммуноферменттік талдаудағы әсерін салыстыру және олардың оптикалық тығыздық көрсеткіштеріне, уақыт бойынша өзгерісіне және теріс пен оң бақылаулар арасындағы қатынасқа ықпалын анықтау болып табылады.

МАТЕРИАЛДАР МЕН ӘДІСТЕР

Зерттеу дизайны

Зерттеу блютанг вирусына қарсы антиденелерді анықтауға арналған бәсекелі иммуноферменттік талдаудың (ИФТ) отандық тест-жүйесі негізінде жүргізілді. Талдау бұрын сипатталған хаттамаға сәйкес орындалды [10]. Қатты фазаға рекомбинантты VP7 ақуызы адсорбцияланған 96-ұяшықты планшеттер пайдаланылды. Блютанг вирусына қарсы биотинделген моноклоналды антидене, желкек пероксидазасымен (HRP) таңбаланған стрептавидин конъюгаты (стрептавидин-HRP конъюгаты), сондай-ақ теріс (K-) және оң (K+) бақылаулар қолданылды. Тежегіш реагенттердің әсерін бағалау мақсатында тәжірибелер бақылау үлгілерімен жүргізілді.

Тежегіш реагенттерді дайындау

Тежегіш реагенттер ретінде үш минералды қышқыл қолданылды: тұз қышқылы (HCl), ортофосфор қышқылы (H_3PO_4) және күкірт қышқылы (H_2SO_4). Аналитикалық дәрежедегі бастапқы қышқылдардан дистилденген суда қажетті концентрациядағы ерітінділер дайындалды (0,1-5,0 диапазонында). Әрбір қышқыл мен концентрация комбинациясы үшін ерітінділердің рН мәні алдын ала калибрленген рН-метрмен 20-25 °C температурада өлшенді. Өлшеулер үш қайталауда жүргізіліп, орташа мәндер есептелді.

Иммуноферменттік талдауды жүргізу

ИФТ өндіруші нұсқаулығына сәйкес жүргізілді [10]. Планшет ұяшықтарына бақылау үлгілері енгізіліп, оларға биотинделген моноклоналды антидене қосылды, содан кейін планшет 37 ± 1 °C температурада инкубацияланды. Инкубация аяқталғаннан кейін байланыспаған компоненттерді жою мақсатында планшет жуу буферімен 5 рет жуылды. Келесі кезеңде желкек пероксидазасымен таңбаланған стрептавидин (стрептавидин-HRP) конъюгаты қосылып, планшет 37 ± 1 °C температурада 30 минут бойы қайта инкубацияланды. Осы инкубация аяқталған соң планшет жуу буферімен 5 рет қайта жуылды. Әр ұяшыққа тетраметилбензидин (ТМБ) субстраты қосылып, бөлме температурасында қараңғыда 10 минут бойы инкубация жүргізілді. Белгіленген уақыт өткен соң ферментативтік реакция тежегіш реагентін қосу арқылы тоқтатылды.

Оптикалық тығыздықты өлшеу

Тежегіш реагент енгізілгеннен кейін планшет 450 нм толқын ұзындығында Stat Fax 4300 (ChroMate) спектрофотометрінде өлшенді. Қажет болған жағдайда референстік фильтр (630 нм) қолданылды. Оптикалық тығыздық

көрсеткіштері реакция тоқтатылғаннан кейін 1, 5, 10, 20 және 30 минут өткен соң тіркелді. Әрбір нұсқа кемінде екі параллель ұяшықта орындалып, тәжірибе үш тәуелсіз экспериментте қайталанды.

Есептелген көрсеткіштер

Әрбір нұсқа үшін теріс және оң бақылаулардың орташа оптикалық тығыздығы (M) және стандартты ауытқуы (SD) анықталды.

Оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісі келесі формула бойынша есептелді:

$$\Delta OD_t = OD_t - OD_1$$

мұндағы OD_1 – реакция тоқтатылғаннан кейінгі 1-минуттағы мән,

OD_t – сәйкес уақыт нүктесіндегі мән.

Салыстырмалы өзгеріс пайызбен есептелді:

$$\text{Өзгеріс (\%)} = (OD_t - OD_1) / OD_1 \times 100\%.$$

Теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас (K-/K+) келесі формула бойынша анықталды:

$$K-/K+ = OD(K-) / OD(K+).$$

Вариация коэффициенті (CV, %) келесі формула бойынша есептелді:

$$CV = SD / M \times 100\%.$$

Статистикалық өңдеу

Сандық деректер Microsoft Excel бағдарламасында өңделді. Нәтижелер орташа мән $\pm$ стандартты ауытқу ($M \pm SD$) түрінде ұсынылды. Қышқыл түрі мен концентрациясына байланысты үрдістер сипаттамалық статистика және графикалық талдау арқылы бағаланды. Статистикалық маңыздылықты бағалау жүргізілген жоқ, себебі зерттеу салыстырмалы аналитикалық сипатта болды. Оңтайлы тежегіш реагент ретінде оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісі төмен, теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынасы жоғары және вариация коэффициенті аз нұсқалар қарастырылды.

НӘТИЖЕЛЕР

Тежегіш реагенттердің концентрациясы мен рН көрсеткіштері

Минералды қышқылдар негізінде дайындалған тежегіш реагенттердің әртүрлі концентрацияларына сәйкес нақты рН мәндері 1-кестеде келтірілді. Барлық ерітінділер 20-25 °C температурада өлшенді.

Зерттеу нәтижелері қышқыл түріне байланысты бірдей молярлық концентрация жағдайында рН көрсеткіштері арасында айтарлықтай айырмашылық жасайтынын көрсетті.

Тұз қышқылы ерітінділерінде концентрация артқан сайын рН мәні айқын төмендеп, 1,20 (0,1 M) деңгейінен -1,04 (5,0 M) дейін өзгерді. 1,0 M концентрациядан бастап рН нөлдік мәннен төмен болды, бұл күшті бірнегізді қышқылдың толық диссоциациялануын көрсетеді.

Ортофосфор қышқылы ерітінділерінде рН төмендеуі біртіндеп жүрді: 0,1 M кезінде 1,71 болса, 5,0 M кезінде 0,52 деңгейіне дейін төмендеді. Барлық концентрацияларда рН оң мәнде сақталды, бұл оның салыстырмалы әлсіз көпнегізді қышқыл екендігін көрсетеді.

1-кесте. Минералды қышқылдар негізіндегі тежегіш реагенттердің концентрациясы мен pH көрсеткіштері (20-25 °C)

Қышқыл түрі	0,1 М	0,2 М	0,3 М	0,4 М	0,5 М	1 М	2 М	3 М	4 М	5 М
Тұз қышқылы	1,2	1,15	0,95	0,74	0,34	0,06	-0,36	-0,52	-0,82	-1,04
Ортофосфор қышқылы	1,71	1,54	1,46	1,40	1,21	1,01	0,88	0,76	0,65	0,52
Күкірт қышқылы	0,98	0,70	0,40	0,27	0,13	-0,50	-1,00	-1,50	-1,85	-2,30

Күкірт қышқылы жағдайында pH 0,98 (0,1 М) деңгейінен -2,30 (5,0 М) дейін төмендеді. 1,0 М және одан жоғары концентрацияларда pH теріс мәнге өтті, бұл ерітіндідегі протондардың концентрациясы өте жоғары екенін көрсетеді.

Осылайша, бірдей молярлық концентрация кезінде қышқылдардың қышқылдық деңгейі айқын ерекшеленді: ең төмен pH мәндері күкірт қышқылында, одан кейін тұз қышқылында тіркелді, ал ең жоғары pH мәндері ортофосфор қышқылында тіркелді.

1-кестеде көрсетілген pH айырмашылықтары тежегіш реагенттердің имуноферменттік талдаудағы әсерін түсіндіруге негіз болды. Протон концентрациясының жоғары болуы ферменттің инактивация жылдамдығына және түзілген хромогеннің тұрақтылығына тікелей ықпал етеді, сондықтан қышқылдық деңгейіндегі айырмашылықтар К⁻ және К⁺ сигналдарының динамикасында көрініс табуы мүмкін.

Бәсекелі имуноферменттік талдауда теріс бақылаудың (К⁻) оптикалық тығыздығы тежегіш реагенттің химиялық табиғаты мен концентрациясына тәуелді болды (2-4-кестелер).

Тұз қышқылы қолданылған нұсқаларда К⁻ үшін бастапқы оптикалық тығыздық 1,9-2,3 диапазонында тіркелді

(2-кесте). 30 минут ішінде оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісі 2,7-8,1 % төмендеу шегінде болды. Барлық концентрациялар үшін өзгеріс біртіндеп және тұрақты сипатта жүрді.

Ортофосфор қышқылы қолданылған нұсқаларда К⁻ сигналдарының динамикасы концентрацияға байланысты ерекшеленді (3-кесте). 0,1-0,4 М диапазонында бастапқы мәндер 0,7-1,6 аралығында болып, 30 минут ішінде 5-9 % төмендеу байқалды. 0,5-5,0 М концентрацияларында бастапқы оптикалық тығыздық 1,9-2,0 деңгейінде болды, ал уақыт бойынша өзгерісі 0-3 % шегінде сақталды.

Күкірт қышқылы негізіндегі ерітінділерде К⁻ бастапқы оптикалық тығыздығы 0,1-2,0 М аралығында 2,0-2,2, ал 4,0-5,0 М диапазонында 1,1-1,5 деңгейінде болды (4-кесте). 30 минут ішінде 10-23 % төмендеу тіркелді, бұл сигналдың айқын әлсіреуін сипаттайды.

Минералды қышқылдар қолданылғандағы өлшеулердің қайталанымдылығы

Минералды қышқылдар қолданылған жағдайда өлшеулердің қайталанымдылығы вариация коэффициенті (CV, %) арқылы бағаланды (5-кесте). 1-минуттағы мәндер реакция тоқтағаннан кейінгі бастапқы аналитикалық тұрақтылықты, ал 30-минуттағы көрсеткіштер сигналдың уақыт бойынша сақталуын сипаттайды.

2-кесте. Тұз қышқылы қолданылғанда К⁻ және К⁺ үшін оптикалық тығыздық көрсеткіштері

Концентрация (М)	К ⁻ бастапқы ОТ	К ⁻ 30 мин өзгерісі, %	К ⁺ бастапқы ОТ	К ⁺ 30 мин өзгерісі, %	Теріс/оң қатынас (10 мин)
0,1-0,4	1,9-2,3	5-8	0,02-0,04	9-29	40-60
0,5-4,0	2,0-2,3	2,7-6	0,02-0,04	±6	50-94
5,0	~2,0	6-8	~0,03	±6	50-70

3-кесте. Ортофосфор қышқылы қолданылғанда К⁻ және К⁺ үшін оптикалық тығыздық көрсеткіштері

Концентрация (М)	К ⁻ бастапқы ОТ	К ⁻ 30 мин өзгерісі, %	К ⁺ бастапқы ОТ	К ⁺ 30 мин өзгерісі, %	Теріс/оң қатынас (10 мин)
0,1-0,4	0,7-1,6	5-9	0,02-0,11	60-170	16-35
0,5-3,0	1,9-2,0	0-3	0,05-0,09	20-40	30-51
4,0-5,0	~1,9	1-3	~0,08	20-35	25-40

4-кесте. Күкірт қышқылы қолданылғанда К⁻ және К⁺ үшін оптикалық тығыздық көрсеткіштері

Концентрация (М)	К ⁻ бастапқы ОТ	К ⁻ 30 мин өзгерісі, %	К ⁺ бастапқы ОТ	К ⁺ 30 мин өзгерісі, %	Теріс/оң қатынас (10 мин)
0,1-2,0	2,0-2,2	10-23	0,08-0,26	10-21	8-18
4,0	~1,5	≈0	~0,15	10-15	12-16
5,0	1,1-1,5	15-20	0,20-0,25	15-20	8-12

5-кесте. Минералды қышқылдар негізіндегі тежегіш реагенттер қолданылғандағы вариация коэффициенті (CV, %)

Қышқыл	Концентрация	К- CV (1 мин)	К- CV (30 мин)	К+ CV (1 мин)	К+ CV (30 мин)
HCl	0,5 М	1,28	1,39	6,8	6,4
	1 М	1,76	1,89	11,4	10,8
	2 М	2,65	2,84	11,4	10,8
	3 М	3,12	3,29	9,2	9,2
	4 М	3,15	3,24	7,1	7,3
H ₃ PO ₄	0,5 М	1,53	1,56	1,03	0,81
	1 М	1,52	1,56	1,27	0,92
	2 М	3,06	3,12	1,23	0,93
	3 М	2,63	2,64	1,09	0,84
H ₂ SO ₄	0,5 М	1,81	2,17	23,8	28,3
	1 М	1,90	2,48	22,2	26,3
	2 М	1,85	2,21	33,1	39,2
	3 М	2,56	3,09	27,8	30,7

6-кесте. Минералды қышқылдардың салыстырмалы аналитикалық сипаттамасы

Қышқыл	Оңтайлы концентрация диапазоны (М)	К- өзгерісі, %	К+ өзгерісі, %	Теріс/оң қатынас	Жалпы бағалау
Тұз қышқылы	0,5-4,0	3-8	≤6	50-94	Жоғары тұрақтылық
Ортофосфор қышқылы	0,5-3,0	0-3	20-40	16-51	Оң сигнал өседі
Күкірт қышқылы	4,0	0-15	10-20	8-18	Динамикалық диапазон тар

ОТ – оптикалық тығыздық; К- – теріс бақылау; К+ – оң бақылау.

Тұз қышқылы қолданылған нұсқаларда К- үшін CV 1,3-3,3 % диапазонында болды. 30 минут ішінде вариация коэффициентінің айтарлықтай өзгеруі байқалмады. К+ үшін CV 6-11 % деңгейінде тіркелді, бұл оң бақылау сигналының салыстырмалы тұрақтылығын көрсетеді.

Ортофосфор қышқылы жағдайында К- үшін CV 1,5-3,1 % аралығында болды, ал К+ үшін 1 % шамасында тіркелді. Бұл өлшеулердің жақсы қайталанымдылығын көрсеткенімен, алдыңғы бөлімде сипатталғандай, оң бақылау сигналдарының уақыт бойынша өсуі байқалды.

Күкірт қышқылы қолданылған нұсқаларда К- үшін вариация коэффициенті 1,8-3,1 % деңгейінде болды. Алайда К+ үшін CV 22-39 % аралығында тіркелді. Бұл оң бақылау сигналдарының айқын вариабельдігін және хромогендік өнімнің тұрақсыздығын көрсетеді.

Оң бақылау сигналдарының тұрақтылығы

Вариация коэффициенті (CV) барлық зерттелген концентрациялар үшін есептелді. Алайда нәтижелерді аналитикалық интерпретациялау иммуноферменттік талдау үшін практикалық маңызы бар 0,5-4,0 М концентрациялық диапазонға шоғырландырылды. Тұз қышқылы қолданылған нұсқаларда К+ бастапқы оптикалық тығыздығы 0,02-0,04 аралығында болды (2-кесте). 0,5-5,0 М концентрацияларында 30 минут ішінде өзгеріс ±6 % шегінде тіркелді.

Ортофосфор қышқылы жағдайында К+ бастапқы мәндері 0,02-0,11 аралығында болды (3-кесте). 30 минут ішінде 0,1-0,4 М концентрацияларында 60-170 % өсу, ал

0,5-5,0 М диапазонында 20-40 % өсу байқалды.

Күкірт қышқылы қолданылғанда К+ бастапқы оптикалық тығыздығы 0,08-0,26 аралығында болды (4-кесте). 30 минут ішінде 10-21 % төмендеу тіркелді.

Теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас

Теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас реакция тоқтатылғаннан кейінгі 10-минуттық өлшеу нүктесінде есептелді, себебі бұл уақытта сигнал тұрақтанып, талдау нәтижелерін сенімді салыстыруға мүмкіндік береді. 10-минуттық өлшеу нүктесінде теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас қышқыл түріне байланысты айқын айырмашылық көрсетті.

Тұз қышқылы үшін бұл көрсеткіш 50-94 диапазонында тіркелді (2-кесте).

Ортофосфор қышқылы үшін 16-51 аралығында болды (3-кесте).

Күкірт қышқылы қолданылғанда 8-18 деңгейінде анықталды (4-кесте).

Ең жоғары қатынас мәндері тұз қышқылы қолданылған нұсқаларда байқалды, бұл теріс және оң бақылаулар арасындағы диагностикалық айырмашылықтың айқын екенін көрсетеді.

Минералды қышқылдардың салыстырмалы бағасы

5-кестеде көрсетілгендей, К- үшін вариация коэффициенті барлық зерттелген қышқылдарда 3 % шамасында болып, өлшеулердің жақсы қайталанымдылығын көрсетті.

K⁺ үшін варибельдік қышқыл түріне байланысты айқын айырмашылық көрсетті: ортофосфор қышқылы қолданылған нұсқаларда CV ең төмен деңгейде ($\approx 1\%$) тіркелсе, тұз қышқылы жағдайында бұл көрсеткіш орташа деңгейде (шамамен 6-11 %) болды, ал күкірт қышқылы қолданылғанда айқын жоғары мәндерге ($\approx 22-39\%$) жетті.

Барлық көрсеткіштердің жинақталған салыстырмалы сипаттамасы 6-кестеде берілді.

Тұз қышқылы 0,5-4,0 М диапазонында K⁻ үшін жоғары бастапқы сигналды, оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісінің төмен деңгейін және теріс пен оң бақылаулар арасындағы ең жоғары қатынасты көрсетті. Бұл нұсқаларда вариация коэффициентінің төмен мәндері өлшеулердің жақсы қайталанымдылығын көрсетті.

Ортофосфор қышқылы қолданылған жағдайда K⁻ сигналы салыстырмалы тұрақты болғанымен, K⁺ сигналында уақыт бойынша айқын өсу байқалды.

Күкірт қышқылы қолданылған нұсқаларда K⁻ және K⁺ сигналдарының қатар төмендеуі тіркеліп, вариация коэффициентінің жоғары мәндері өлшеулердің айқын варибельдігін көрсетті.

Жалпы алғанда алынған нәтижелер минералды қышқылдардың тежегіш реагент ретіндегі әсері оптикалық тығыздықтың абсолюттік мәндерімен ғана емес, сонымен қатар сигналдың уақыт бойынша тұрақтылығымен және өлшеулердің қайталанымдылығымен де анықталатынын көрсетті. Қышқылдардың химиялық табиғаты мен концентрациясына байланысты байқалған айырмашылықтар фермент инактивациясының тиімділігіне және түзілген хромогеннің тұрақтылығына ықпал етуі мүмкін. Осыған байланысты алынған нәтижелердің механизмдік түсіндірмесі және олардың имуноферменттік талдаудың аналитикалық сипаттамаларына әсері келесі бөлімде қарастырылады.

ТАЛҚЫЛАУ

Имуноферменттік талдауда тежегіш реагент ферментативтік реакцияны толық тоқтатумен қатар, түзілген хромогендік өнімнің тұрақтылығын қамтамасыз етуі тиіс. Тетраметилбензидин – желкек пероксидазасы жүйесінде түзілетін хромогендік өнімнің тұрақтылығы қышқылдық ортаға тікелей тәуелді [1, 7]. Қышқыл енгізілген кезде фермент инактивацияланады және көк түсті аралық өнім протондану нәтижесінде сары түсті тұрақты қосылысқа ауысады [7, 8]. Алайда қышқылдың табиғаты мен концентрациясы бұл үдерістің толықтығына және кейінгі тұрақтылығына әртүрлі әсер етеді.

Соңғы жылдары ИФТ технологиясын жетілдіру бағытындағы зерттеулерде реакцияны тоқтататын ерітіндінің құрамы сигналдың қалыптасу кинетикасына және соңғы оптикалық тығыздықтың тұрақтылығына айтарлықтай ықпал ететіні көрсетілген [12]. Сонымен қатар тежегіш ерітіндінің қышқылдық деңгейі мен химиялық табиғаты фермент инактивациясының толықтығын және хромогеннің кейінгі өзгерісін айқындайтын негізгі факторлардың бірі болып табылатыны дәлелденген [13]. Бұл деректер тежегіш реагентті таңдау тек техникалық емес, аналитикалық тұрғыдан маңызды шешім екенін көрсетеді.

Тұз қышқылы қолданылған нұсқаларда теріс бақылау

сигналының салыстырмалы тұрақтылығы және оң бақылаудың төмен деңгейде сақталуы ферменттің жылдам әрі толық инактивациялануын көрсетеді. Күшті бірінегізді қышқыл ретінде HCl ерітіндіде толық диссоциацияланады және ортада жоғары протон концентрациясын қамтамасыз етеді. Бұл желкек пероксидазасының ферментативтік белсенділігін тез тоқтатып, реакцияның жалғасуына жол бермейді. Алынған нәтижелерде түстің шамадан тыс деградациясы байқалмады, бұл хромофордың жоғары тұрақтылығын көрсетеді. Әдеби деректерде де минералды күшті қышқылдардың ТМБ жүйесінде тұрақты сигнал қалыптастыратыны көрсетілген [7-9].

Ортофосфор қышқылы жағдайында теріс бақылауда салыстырмалы тұрақтылық сақталғанымен, оң бақылауда уақыт бойынша сигналдың өсуі байқалды. Бұл құбылыс ферментативтік реакцияның толық тоқтамауымен немесе қышқылдың салыстырмалы әлсіз диссоциациясына байланысты болуы мүмкін. Ортофосфор қышқылы көпнегізді және әлсіздеу қышқыл болып табылады, сондықтан оның ерітіндісіндегі еркін протон концентрациясы бірдей молярлық жағдайда тұз қышқылына қарағанда төмен болады. Нәтижесінде желкек пероксидазасының толық инактивациясы баяу жүруі ықтимал, бұл оң бақылауда түстің біртіндеп артуына әкеледі. Мұндай құбылыс бәсекелі форматтағы талдауда диагностикалық айырмашылықтың төмендеуіне және шекті мәнді анықтаудың күрделенуіне себеп болуы мүмкін. Сонымен қатар ортофосфор қышқылы қолданылған нұсқаларда K⁺ үшін вариация коэффициентінің ең төмен мәндері тіркелді, бұл өлшеулердің жоғары қайталанымдылығын көрсеткенімен, сигналдың уақыт бойынша өсуі ферментативтік реакцияның толық тоқтамайтынын дәлелдейді.

Күкірт қышқылы қолданылғанда теріс және оң бақылауларда сигналдардың қатар төмендеуі тіркелді. Күшті екі негізді қышқыл ретінде H₂SO₄ жоғары қышқылдық орта түзеді және протондану үдерісі қарқынды жүреді. Мұндай ортада тек фермент инактивацияланып қана қоймай, түзілген хромофор құрылымының тұрақтылығы да бұзылуы мүмкін. Түстің әлсіреуі хромогендік өнімнің деградациясымен немесе хромофордың тұрақсыздануымен байланысты болуы ықтимал [7, 8]. Нәтижесінде динамикалық диапазон тарылып, теріс және оң бақылаулар арасындағы айырмашылық азаяды.

Біздің нәтижелеріміз заманауи зерттеулерде көрсетілген тенденциялармен үйлеседі және тежегіш реагенттің қышқылдық табиғаты мен концентрациясы имуноферменттік талдаудың аналитикалық сенімділігіне кешенді әсер ететінін нақтылайды [12, 13]. Тұз қышқылының белгілі бір молярлық диапазоны ферментативтік реакцияның толық тоқтауын, сигнал тұрақтылығын және бақылаулар арасындағы айқын айырмашылықты қамтамасыз ететіні тәжірибелік тұрғыдан дәлелденді. Тежегіш реагенттердің аналитикалық сенімділігін бағалауда вариация коэффициенті қосымша маңызды ақпарат береді. Тұз қышқылы қолданылған жағдайда K⁻ және K⁺ үшін CV төмен деңгейде сақталуы фермент инактивациясының жылдам әрі толық жүретінін және түзілген хромофордың тұрақтылығын көрсетеді. Ортофосфор қышқылы өлшеулердің жоғары қайталанымдылығын (төмен CV) қамтамасыз еткенімен, оң бақылауда сигналдың уақыт бойынша өсуі фермен-

тативтік реакцияның толық тоқтамайтынын көрсетеді. Күкірт қышқылы жағдайында K^+ үшін жоғары вариациялық хромогеннің деградациясының біркелкі жүрмейтінін және нәтижесінде сигнал тұрақтылығының төмендейтінін көрсетеді.

Жалпы алғанда, тежегіш реагентті таңдау имуноферменттік талдаудың стандартталуы мен валидациясында маңызды кезең болып табылады. Алынған нәтижелер тек блотанг вирусына арналған тест-жүйемен шектелмей, басқа да ИФТ жүйелерін әзірлеу және оңтайландыру кезінде қолданылуы мүмкін.

Зерттеудің белгілі бір шектеулері бар. Жұмыс тек блотанг вирусына қарсы бәсекелі имуноферменттік талдаудың бір диагностикалық моделі негізінде жүргізілді. Бағалау теріс (K^-) және оң (K^+) бақылау үлгілері арқылы орындалды, клиникалық немесе далалық үлгілер зерттелген жоқ. Сонымен қатар топтар арасындағы статистикалық маңыздылыққа салыстырмалы талдау жүргізілмеді, ал сигнал тұрақтылығы реакция тоқтатылғаннан кейінгі алғашқы 30 минут аралығында ғана бағаланды. Болашақ зерттеулерде алынған нәтижелерді әртүрлі ИФТ форматтарында, клиникалық үлгілерде және ұзақ уақыттық бақылау жағдайында тексеру орынды болып табылады.

ҚОРЫТЫНДЫ

Жүргізілген зерттеу блотанг вирусына қарсы бәсекелі имуноферменттік талдау үлгісінде минералды қышқылдар негізінде дайындалған тежегіш реагенттердің әсерін салыстырмалы түрде бағалады. Қышқылдың химиялық табиғаты мен концентрациясы теріс (K^-) және оң (K^+) бақылаулардың оптикалық тығыздығына, сигналдың уақыт бойынша өзгерісіне және бақылаулар арасындағы қатынасқа тікелей әсер ететіні анықталды.

Жүргізілген салыстырмалы талдау минералды қышқылдардың химиялық табиғаты мен концентрациясы ферментативтік реакцияның тоқтау тиімділігіне, сигналдың уақыт бойынша тұрақтылығына және имуноферменттік талдаудың аналитикалық сенімділігіне әртүрлі әсер ететінін көрсетті. Зерттеу нәтижелері бойынша тұз қышқылының 0,5-4,0 М концентрациялық диапазоны реакцияны тиімді тоқтату, сигнал тұрақтылығын сақтау және бақылаулар арасындағы аналитикалық айырмашылықты қамтамасыз ету тұрғысынан оңтайлы болып анықталды.

Зерттеудің практикалық маңыздылығы минералды қышқылдарды бір диагностикалық модель жағдайында салыстырмалы бағалау негізінде бәсекелі имуноферменттік талдау үшін оңтайлы тежегіш реагент пен оның тиімді концентрациялық диапазонын негіздеуде.

Бұрын жүргізілген зерттеуде тұз қышқылының концентрациясын оңтайландыру бәсекелі ИФТ-ның дәлдігі мен қайта өндірілуін жақсартатыны көрсетілген болатын [10]. Қазіргі салыстырмалы талдау бұл қорытындыны толықтырып, тұз қышқылының 0,5-4,0 М диапазонының бәсекелі имуноферменттік талдау үшін аналитикалық тұрғыдан оңтайлы екенін растады. Осылайша, жүргізілген зерттеу басқа минералды қышқылдармен тікелей салыстыру негізінде тежегіш реагентті таңдаудың эксперименттік негіздемесін кеңейтті.

Ұсынылған бағалау критерийлері – оптикалық тығыздықтың уақыт бойынша өзгерісі, теріс және оң бақылаулар арасындағы қатынас және вариация коэффициенті – минералды қышқылдарға негізделген тежегіш реагенттерді таңдаудың әмбебап әдістемелік тәсілі ретінде қолданылуы мүмкін. Алынған нәтижелер тек блотангқа арналған тест-жүйемен шектелмей, ветеринариялық және биомедициналық диагностикада қолданылатын басқа да имуноферменттік талдауларды стандарттау, валидациялау және аналитикалық көрсеткіштерін оңтайландыру бағытында пайдаланылуы мүмкін.

АВТОРЛАРДЫҢ ҮЛЕСІ

Тұжырымдаманы әзірлеу, Б.М.И. және З.Д.Е.; әдістемені әзірлеу, С.Е.Ш. және Б.М.И.; зерттеу жүргізу, И.А.А., Н.Б.Е. және С.Е.Ш.; валидация, И.А.А. және Б.М.И.; формальды талдау, Н.Б.Е.; деректерді жинақтау және басқару, С.Е.Ш. және И.А.А.; қолжазбаның бастапқы нұсқасын дайындау, С.Е.Ш., Н.Б.Е., И.А.А. және Б.М.И.; қолжазбаны жазу және редакциялау, С.Е.Ш., И.А.А. және Б.М.И.; визуализация, С.Е.Ш. және И.А.А.; ғылыми жетекшілік, Б.М.И.; жобаны әкімшілік басқару, З.Д.Е. Барлық авторлар қолжазбаның жарияланатын нұсқасын оқып шығып, оның жариялануына келісім берді.

ҚАРЖЫЛАНДЫРУ

Бұл зерттеу Қазақстан Республикасы Ғылым және жоғары білім министрлігінің Ғылым комитеті тарапынан қаржыландырылды (IPN: BR24992948).

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР

1. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA // *Peptides*. – 2015. – Vol. 72. – P. 4-15 DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.
2. Crowther J.R. The ELISA guidebook. – 2nd ed. – Totowa, NJ: Humana Press, 2009. – 448 p. – DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4.
3. World Organisation for Animal Health (WOAH). Bluetongue (infection with bluetongue virus) // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. – Paris: WOAH, 2021. – 25 p. – Available at: <https://www.woah.org>
4. Afshar A., Thomas F.C., Wright P.F., Shapiro J.L., Pearson J.E. Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1987. – Vol. 25, № 9. – P. 1705-1710. DOI: 10.1128/jcm.25.9.1705-1710.1987.
5. Reddington J.J., Reddington G.M., MacLachlan N.J. A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1991. – Vol. 3, № 2. – P. 144–147. – DOI: 10.1177/104063879100300206.
6. Kramps J.A., van Maanen C., Mars M.H., et al. Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus antibodies in individual milk samples of dairy cows // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – Vol. 130. – P. 80-87. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.12.008.

7. Thermo Fisher Scientific. TMB Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) – Technical handbook. – Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific, 2018. – 12 p.

8. Harpaz D., Eltzov E., Ng T.S.E., et al. Enhanced colorimetric signal for accurate signal detection in paper-based biosensors // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – Article 28. – DOI: 10.3390/diagnostics10010028.

9. Khramtsov S.V. Investigation of TMB substrate composition and stop solutions for signal enhancement in ELISA // *Analytical Biochemistry*. – 2021. – Vol. 626. – P. 114270. – DOI: 10.1016/j.ab.2021.114270.

10. Исмагамбетов Б.М., Шоманова С.Е., Ахажанова И.А., Ершебулов З.Д. Оптимизация концентрации стоп-реагента для повышения точности и воспроизводимости иммуноферментного анализа // *Особо опасные инфекции и биологическая безопасность*. – Алматы, 2025. – Вып. 11. – С. 32-39.

11. Bosco-Lauth A.M., Hartwig A.E., Porter S.M. et al. Experimental infection of cattle with bluetongue virus: evaluation of diagnostic assays // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, № 9. – P. 461. – DOI: 10.3390/v10090461.

12. Zhao Z., Cui H., Song W. et al. Advances in ELISA technology for infectious disease diagnosis // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12. – P. 365. – DOI: 10.3390/bios12050365.

13. Li X., Wang Y., Shen H. et al. Optimization of colorimetric ELISA signal stability and stop solution effects // *Analytical Methods*. – 2023. – Vol. 15. – P. 2145–2153. – DOI: 10.1039/D3AY00123A.

REFERENCES

1. Aydin S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA // *Peptides*. – 2015. – Vol. 72. – P. 4-15 DOI: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.

2. Crowther J.R. The ELISA guidebook. – 2nd ed. – Totowa, NJ: Humana Press, 2009. – 448 p. – DOI: 10.1007/978-1-60327-254-4.

3. World Organisation for Animal Health (WOAH). Bluetongue (infection with bluetongue virus) // *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. – Paris: WOAH, 2021. – 25 p. – Available at: <https://www.woah.org>

4. Afshar A., Thomas F.C., Wright P.F., Shapiro J.L.,

Pearson J.E. Comparison of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1987. – Vol. 25, № 9. – P. 1705-1710. DOI: 10.1128/jem.25.9.1705-1710.1987.

5. Reddington J.J., Reddington G.M., MacLachlan N.J. A competitive ELISA for detection of antibodies to the group antigen of bluetongue virus // *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. – 1991. – Vol. 3, № 2. – P. 144–147. – DOI: 10.1177/104063879100300206.

6. Kramps J.A., van Maanen C., Mars M.H., et al. Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus antibodies in individual milk samples of dairy cows // *Veterinary Microbiology*. – 2008. – Vol. 130. – P. 80-87. – DOI: 10.1016/j.vetmic.2007.12.008.

7. Thermo Fisher Scientific. TMB Substrate (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) – Technical handbook. – Waltham (MA): Thermo Fisher Scientific, 2018. – 12 p.

8. Harpaz D., Eltzov E., Ng T.S.E., et al. Enhanced colorimetric signal for accurate signal detection in paper-based biosensors // *Diagnostics*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – Article 28. – DOI: 10.3390/diagnostics10010028.

9. Khramtsov S.V. Investigation of TMB substrate composition and stop solutions for signal enhancement in ELISA // *Analytical Biochemistry*. – 2021. – Vol. 626. – P. 114270. – DOI: 10.1016/j.ab.2021.114270.

10. Ismagambetov B.M., Shomanova S.E., Akhazhanova I.A., Yershebulov Z.D. Optimization of stop reagent concentration to improve the accuracy and reproducibility of enzyme immunoassay // *Highly Dangerous Infections and Biosafety*. – Almaty, 2025. – Issue 11. – P. 32–39.

11. Bosco-Lauth A.M., Hartwig A.E., Porter S.M. et al. Experimental infection of cattle with bluetongue virus: evaluation of diagnostic assays // *Viruses*. – 2018. – Vol. 10, № 9. – P. 461. – DOI: 10.3390/v10090461.

12. Zhao Z., Cui H., Song W. et al. Advances in ELISA technology for infectious disease diagnosis // *Biosensors*. – 2022. – Vol. 12. – P. 365. – DOI: 10.3390/bios12050365.

13. Li X., Wang Y., Shen H. et al. Optimization of colorimetric ELISA signal stability and stop solution effects // *Analytical Methods*. – 2023. – Vol. 15. – P. 2145–2153. – DOI: 10.1039/D3AY00123A.

УДК 619:57.083

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТОП-РЕАГЕНТОВ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ОСНОВЕ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ

Исмагамбетов Б.М.^{1*}, Шоманова С.Е.¹, Ахажанова И.А.¹, Есимбекова Н.Б.¹, Ершебулов З.Д.¹¹«OtarBioPharm» жсауанкерушілігі шектеулі серіктестігі, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский кенті, 5 ғимарат, 080409

* Автор-корреспондент: bekza88@mail.ru

РЕЗЮМЕ

В работе проведено сравнительное исследование стоп-реагентов иммуноферментного анализа, приготовленных на основе соляной, ортофосфорной и серной кислот, на модели конкурентного ИФА для выявления антител к вирусу блютанга. Показано, что химическая природа и концентрация кислоты существенно влияют на уровень оптической плотности отрицательного (К-) и положительного (К+) контролей, изменение сигнала во времени и соотношение между отрицательным и положительным контролями.

Растворы на основе соляной кислоты в диапазоне 0,5-4,0 М обеспечивали высокий исходный сигнал для К- (около 2,0 ед. ОП), ограниченное изменение оптической плотности в течение 30 минут (3-8 %) и наибольшее соотношение между контролями (50-90). При использовании ортофосфорной кислоты наблюдался рост сигнала положительного контроля во времени, тогда как серная кислота вызывала снижение сигналов как К-, так и К+, что приводило к сужению динамического диапазона.

Полученные результаты подтверждают, что выбор стоп-реагента является важным этапом стандартизации ИФА и напрямую влияет на аналитическую надежность тест-системы.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, стоп-реагент, минеральные кислоты, соляная кислота, ортофосфорная кислота, серная кислота, конкурентный ИФА, вирус блютанга.

UDC 619:57.083

COMPARATIVE STUDY OF ELISA STOP SOLUTIONS BASED ON MINERAL ACIDS

Ismagambetov B.M.^{1*}, Shomanova S.E.¹, Akhazhanova I.A.¹, Esimbekova N.B.¹, Ershebulov Z.D.¹¹OtarBioPharm LLP, 5 Gvardeysky Settlement, Korday District, Zhambyl Region, 080409, Republic of Kazakhstan

*Corresponding author: bekza88@mail.ru

ABSTRACT

A comparative study of ELISA stop solutions prepared on the basis of hydrochloric, orthophosphoric and sulfuric acids was performed using a competitive ELISA model for detection of antibodies against bluetongue virus. It was demonstrated that the chemical nature and concentration of the acid significantly affect the optical density of negative (K-) and positive (K+) controls, the time-dependent change of the signal, and the ratio between negative and positive controls.

Hydrochloric acid solutions within the range of 0.5-4.0 M provided a high initial signal for K- (approximately 2.0 OD units), limited optical density variation over 30 minutes (3-8%), and the highest control ratio values (50-90). Orthophosphoric acid resulted in an increase of the positive control signal over time, whereas sulfuric acid caused a decrease in both K- and K+ signals, leading to narrowing of the dynamic range.

The findings confirm that the selection of the stop solution is a critical factor in ELISA standardization and directly influences the analytical reliability of the diagnostic test system.

Keyword: enzyme-linked immunosorbent assay, stop solution, mineral acids, hydrochloric acid, orthophosphoric acid, sulfuric acid, competitive ELISA, bluetongue virus.