

УДК: 57.083.3

СТАБИЛЬНОСТЬ ИФА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО SM БЕЛКА К ВИРУСУ SARS-COV-2 В РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ

Наханова Г.Д.1,2 , Червякова О.В.1 , Жунушов А.Т.2, Наханов А.К. 1 , Ұланқызы А.1, Жақыпбек А.С.1 , Тілеуханова А.А. 1, Шорасева К.А.1* ¹ТОО Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,

АО Национальный холдинг QazBioPharm 080409, Жамбылская область, Республика Казахстан

²Институт биотехнологии, Национальной академия наук Кыргызской Республики, 720071, г. Бишкек, Республика Кыргызстан

*Корреспондент автор: k.shorayeva@biosafety.kz

АННОТАЦИЯ

Оценка стабильности компонентов набора является критически важным этапом при разработке тест-систем для иммуноферментного анализа (ИФА), так как она напрямую определяет точность и воспроизводимость диагностических результатов а процессе хранения и эксплуатации. В данной работе проведено исследование стабильности и воспроизводимости разработанной ИФА тест-системы на основе рекомбинантного химерного белка SM при различных температурных режимах. Стабильность компонентов оценивали по динамике изменения аналитического сигнала оптической плотности (ОП) и межповторной вариабельности результатов коэффициента вариации CV, % в течение контролируемого периода времени при температурах -20°C, 4°C, 22°C и 37°C. Установлено, что стабильность разработанной ИФА тест-системы носит строго температурозависимый характер. Оптимальным режимом хранения определены условия стандартного охлаждения при 4°C, обеспечивающие наилучшую сохранность аналитического сигнала 81,3% от исходного уровня, ОП₄₅₀ = 1,933 при высокой воспроизводимости результатов CV = 1,74%, что стабильно ниже нормативного порога ≤ 5%. Условия глубокого замораживания -20°C продемонстрировали выраженные ограничения, несмотря на относительно высокий сигнал ОП₄₅₀ = 1,623, 68,2% остаточной активности, замораживание и оттаивание реагентов привели к росту аналитической вариабельности данных CV = 5,56%, превышающей критерий приемлемости. Термическое воздействие при 22°C и 37°C температурах оказалось критически деструктивным, вызывая денатурацию белковых компонентов и потерю более 65% исходной активности белка. Полученные результаты показывают, что для долгосрочного сохранения параметров чувствительности, специфичности и воспроизводимости анализа разработанного диагностикума обязательным технологическим показателем является его хранение исключительно при температуре 4°C с соблюдением правил холодовой цепи.

Ключевые слова: ИФА тест-система, стабильность, реагенты, оптическая плотность, рекомбинантный белок.

ВВЕДЕНИЕ

В условиях продолжающейся циркуляции SARS-CoV-2 и появления новых вариантов вируса сохраняется необходимость в разработке и совершенствовании надежных серологических тестов, способных оценивать иммунный статус населения. Вследствие частой мутации основного антигена S-белка вируса SARS-CoV-2 актуальным становится подход, основанный на применении химерных или комбинированных белков, способных повысить диагностическую эффективность ИФА [1, 2].

Рекомбинантные формы S белка и его фрагментов активно используются в производстве серологических тестов, разработке вакцины и исследовании взаимодействия антиген-антитело. Однако экспрессия полноразмерного S белка может быть затруднена из-за его большой молекулярной массы, сложной структуры и склонности к агрегации [3-5]. В связи с этим выбор все чаще отдается химерным конструкциям, в которых сочетаются иммуногенные домены с элементами, повышающими растворимость, стабильность и простоту очистки [6-8]. Химерные белки широко используются в биомедицинских исследованиях и разработке диагностических тест-систем благодаря своей способности совмещать функциональные домены различных белков [9-12]. Одним из ключевых этапов в их получении является оптимизация условий экспрессии в клетках-продуцентах, в частности, *Escherichia*

coli (*E. coli*) [13-14].

Стабильность реагентов ИФА тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 является критически важным параметром и на прямую влияющим на достоверность результатов сероэпидемиологических исследований, мониторинга постинфекционного и поствакцинального иммунитета. Как известно белки имеют низкую стабильность и склонны к потере структуры и функциональности при высоких температурах. Кроме того, было показано, что антигены на пластиковой поверхности имеют более низкие показатели стабильности без охлаждения по сравнению с антигенами в буферном растворе [15-16]. Таким образом, оценка стабильности реагентов ИФА тест-системы позволяет обеспечить сопоставимость данных, снизить риск ложноположительных и ложноотрицательных результатов и повысить точность данных серологических исследований как в клинической практике, так и в научных и эпидемиологических исследованиях [16].

Целью данной работы является оценка стабильности ИФА тест-системы на основе рекомбинантного химерного белка к вирусу SARS-CoV-2 при различных температурных условиях, а также определение оптимальных параметров хранения для обеспечения точности и надежности тестирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В настоящей работе были проведены испытания по изучению стабильности, разработанной ИФА тест-системы для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного химерного белка SM», для качественного определения антител к вирусу SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного химерного SM белка [17].

Краткая характеристика рекомбинантного химерного белка SM

Для создания рекомбинантного химерного SM белка были объединены фрагменты S-белка (аминокислотные остатки 554–593) и M-белка (остатки 1–19), соединенные последовательностью SSGGGGSS. Кодированная последовательность была клонирована в вектор pET32b(+) и экспрессирована в клетках *E. coli* ER2566. После индукции 0,5 мМ IPTG при 37°C в течение 4 ч был получен рекомбинантный белок с расчётной молекулярной массой около 28 кДа. Дополнительная информация представлена со ссылкой на ранее опубликованную работу [17].

Диагностический cut-off ИФА

Для интерпретации результатов исследования использовали диагностический cut-off, ранее установленный и описанный в опубликованной работе [17]. Образцы со значением ОП выше установленного порогового значения использовали как положительные, а образцы со значением ниже cut-off как отрицательные. Установленный диагностический порог cut-off применяли при расчете чувствительности и специфичности ИФА тест-системы.

Иммуноферментный анализ.

Для проведения испытания тест-системы применяли непрямой иммуноферментный анализ, направленный на выявление специфических антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотках крови. В качестве антигена был использован рекомбинантный химерный SM белок, предварительно сенсibilизированный на поверхность лунок полистиролового 96-луночного планшета производство Nunc (Дания). Для работы были использованы сыворотки в разведениях 1:100 в ФБСТ-20 (фосфатно-солевой буфер с добавлением Твин-20) и далее инкубированы в течение 1 часа при температуре 37°C. Затем лунки планшет промывали 5 раз по 300 мкл ФБСТ-20. Вторичные антитела были инкубированы в течение 30 минут при температуре 37°C, после снова промывали лунки планшет раствором ФБСТ-20. В качестве субстрата был использован 3,3',5,5'-тетрамилбензидин (ТМВ), добавляя по 100 мкл в каждую лунку. Планшеты инкубировали в темном месте при комнатной температуре в течение 15 минут. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 М раствора H_2SO_4 на каждую лунку. Оптическую плотность (ОП) измеряли с помощью ридера ImmunoChem-2100 при длине волны 450 нм.

Изучение стабильности ИФА тест-системы.

Стабильность ИФА тест-системы оценивали в соответствии с общепринятыми требованиями к диагностическим методам [19]. Исследование включало оценку долговременной стабильности, стабильности при различных температурных режимах. Долговременную стабильность оценивали при хранении тест-системы в условиях, предусмотренных инструкцией по применению, при темпера-

туре 2–8°C. Контрольные исследования проводили ежемесячно в течение 10 месяцев. Стабильность тест-системы при различных температурных режимах оценивали после ее выдерживания при температуре 22°C и 37°C в течение 10, 20 и 30 суток. Хранение при температуре $22 \pm 2^\circ C$ использовали для оценки стабильности тест-системы при комнатной температуре, а выдерживание при температуре 37°C для оценки ее стабильности в условиях повышенной температуры. Дополнительно проводили исследование устойчивости реагентов к многократным циклам замораживания-оттаивания от 1 до 10 циклов при минус 20°C с последующим оттаиванием при комнатной температуре. По завершении каждого установленного периода хранения оценивали аналитические характеристики тест-системы и сравнивали полученные результаты с показателями образцов, хранившихся при температуре 2–8°C.

Отбор проб. Для определения стабильности иммуноферментного анализа (ИФА) на антитела к вирусу SARS-CoV-2 использовали архивные образцы сыворотки крови, полученные в период пандемии COVID-19 и сохранённые в замороженном виде в биобанке. В исследование включали 20 образцов сыворотки, из которых 10 были положительными, а 10 отрицательными. Для подтверждения статуса образцов, положительные и отрицательные сыворотки были проверены в микронеutralизационном тесте.

Реакция микронеutralизации (РН). Наличие нейтрализующих антител и их титр проводили на монослойной культуре клеток Vero, приготовленной в 96-луночных планшетах. Нейтрализацию вируса оценивали по отсутствию цитопатического эффекта монослоя клеток. Титр вируса и сыворотки крови рассчитывали по Риду и Менча [20–21].

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием GraphPad Prism.

Результаты измерений ОП представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($Mean \pm SD$) трех повторений. Для оценки временной динамики аналитического сигнала при долговременном и ускоренном хранении применяли простую линейную регрессию по средним значениям каждой временной точки. Для каждой температурной группы определяли детерминации (R^2) и p -значение для проверки отличия наклона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Относительное изменение ОП рассчитывали по формуле:

$$\Delta ОП (\%) = (ОП_t - ОП_0) / ОП_0 \times 100,$$

где $ОП_0$ - исходное значение ОП в момент времени $t=0$;

$ОП_t$ – значение ОП реакционной смеси в исследуемой временной точке;

$ОП_t$ — значение в соответствующей временной точке.

Качество анализа оценивали по коэффициенту вариации (CV) [22–23]. Для каждой температурной точки рассчитывали процент остаточной активности ($A_{ост}$), который выражали как отношение полученного значения ОП в опыте к исходному значению ОП в начальный момент времени ($t=0$), принятому за 100%.

Расчет проводили по формуле: $A_{ост} = (ОП_t / ОП_0) \times 100\%$

где: $ОП_t$ - значение ОП реакционной смеси в исследу-

емой временной точке;

ОПО – исходное значение ОП в момент времени $t=0$

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние температуры и времени хранения на аналитический сигнал ИФА тест-системы. В ходе исследований для определения стабильности нами разработанной ИФА тест-системы, была проведена оценка стабильности набора в условиях различных температурных и эксплуатационных факторов, направленных на определение чувствительности и срока годности. Как показано на рисунке 1 и 2, аналитический сигнал ИФА тест-системы существенно зависел от температуры и времени ее хранения.

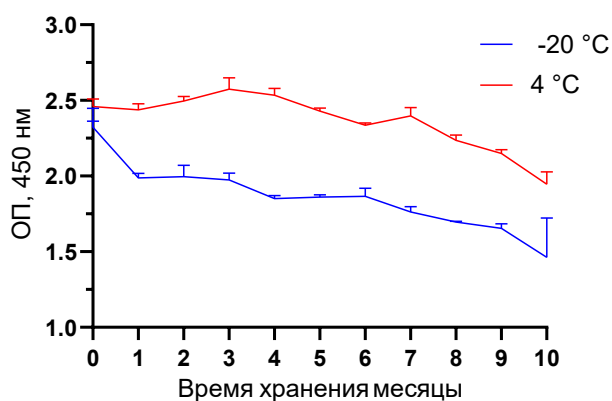


Рисунок 1. Динамика аналитических показателей хранения ИФА тест-системы при долговременном хранении в температурных условиях -20°C и 4°C.

Как видно из рисунка 1, стабильность разработанной ИФА тест-системы оценивали в течении 10 месяцев хранения при -20°C и 4°C. К концу периода наблюдения средняя ОП при -20°C составила $1,462 \pm 0,261$ против исходных $2,323 \pm 0,040$, что соответствует изменению на 37,1%. При 4°C показатель изменился с $2,460 \pm 0,050$ до $1,945 \pm 0,083$, что соответствует изменению на 20,9%. Линейная регрессия выявила тенденцию к снижению аналитических параметров во времени при обеих температурах: -20°C (наклон составил $-0,06315$ ОП/месяц (95% ДИ: $-0,08089-0,04540$; $R^2=0,8781$; $p < 0,0001$); 4°C (наклон составил $-0,04594$ ОП/месяц (95% ДИ: $-0,07052-0,02136$; $R^2=0,6652$; $p < 0,0022$). Таким образом, в условиях долговременного хранения аналитический сигнал сохранялся

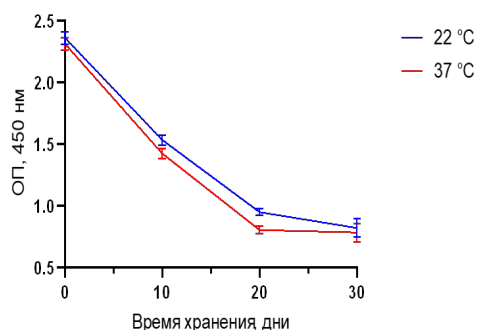


Рисунок 2. Динамика аналитических показателей ИФА тест-системы в условиях ускоренного хранения при температурах 22°C и 37°C.

на максимальном уровне при температуре 4°C, а при -20°C происходило лишь умеренное его снижение, не препятствующее сохранению общей диагностической эффективности ИФА тест-системы.

При ускоренном хранении (Рис.2) разработанной ИФА тест-системы в течение 30 суток наблюдалось выраженное изменение аналитического сигнала при обеих температурах. При 22°C средняя ОП составила $0,823 \pm 0,075$ против исходных $2,365 \pm 0,050$, что соответствует уменьшению на 65,2%. При 37°C показатель изменился с $2,315 \pm 0,050$ до $0,786 \pm 0,075$ что соответствует изменению на 66%. Линейная регрессия выявила тенденцию к снижению аналитических параметров во времени при обеих температурах: 22°C (наклон составил $-0,05212$ ОП/месяц (95% ДИ: $-0,1003-0,003912$; $R^2=0,9154$; $p < 0,0432$); 37°C (наклон составил $-0,05207$ ОП/месяц (95% ДИ: $-0,1120-0,007900$; $R^2=0,8747$; $p < 0,0648$). Таким образом, ускоренное хранение сопровождалось существенной потерей аналитического сигнала, наиболее выраженной в первые 20 суток наблюдения.

Изменение диагностических характеристик ИФА тест-системы при различных температурных режимах хранения.

Для оценки стабильности ИФА тест-системы было показано влияние различных температурных режимов на ее ключевые диагностические характеристики. В каждой температурной точке рассчитывали процент остаточной активности, выражаемый как отношение полученного значения ОП к исходному значению ОП в начальный момент времени [31]. Результаты оценки стабильности ИФА тест-системы по величине аналитических сигналов показали, что ее хранение при температуре 4°C сопровождалось сохранением высоких диагностических показателей на протяжении всего периода наблюдения (Рис. 3).

При температуре хранения 4°C остаточная активность ИФА тест-системы составила не менее 90% на протяжении всего периода хранения, что подтверждает стабильность сохранения диагностической эффективности. Хра-

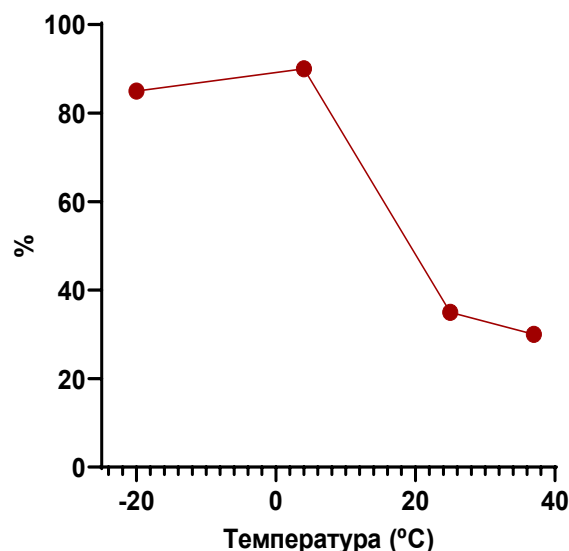


Рисунок 3. Влияние температуры хранения на чувствительность ИФА тест-системы

Таблица 1. Показатели оптической плотности и коэффициенты вариации (CV,%) ИФА тест-системы после хранения

Температурный режим хранения	Повторность 1	Повторность 2	Повторность 3	Среднее ОП ₄₅₀	SD	CV, %
Исходная точка t=0	2,340	2,400	2,396	2,379	0,034	1,41
-20°C	1,687	1,520	1,663	1,623	0,090	5,56
4°C	1,936	1,898	1,965	1,933	0,034	1,74
22°C	0,750	0,840	0,684	0,771	0,078	10,21
37°C	0,802	0,923	0,712	0,815	0,106	13,01

нение ИФА тест-системы при минус 20°C наблюдалось умеренное снижение чувствительности, тогда как при хранении при 22°C и 37°C показатели снижались до 35% и 30% соответственно, что указывает на потерю антигенных свойств химерного SM белка.

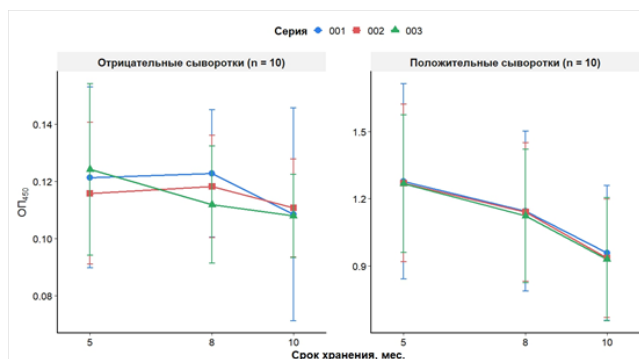
Воспроизводимость ИФА тест-системы.

Для оценки воспроизводимости разработанной ИФА тест-системы в процессе хранения был проведен анализ результатов трехкратных параллельных измерений. Важнейшим критерием выступал коэффициент вариации (CV), нормативный порог которого для тест-системы не должен превышать 5%. Исходные данные ОП, результаты расчета стандартного отклонения (SD) и итоговые показатели для каждого температурного режима представлены в таблице 1.

Анализ экспериментальных данных показал, что оптимальным режимом, обеспечивающим максимальную сохранность аналитических характеристик, является хранение при температуре 4°C. В этих условиях среднее значение ОП₄₅₀ составило 1,933, практически не уступая контрольному показателю исходной точки 2,379. При этом коэффициент вариации составил всего 1,74%, что строго соответствует жестким отраслевым требованиям к воспроизводимости ИФА тест-систем $CV \leq 5\%$. В условиях глубокого замораживания – 20°C отмечалась относительная стабильность ИФА тест-системы. Несмотря на умеренное падение ОП, показатели вариабельности зафиксированы на границе нормативного диапазона $CV=5,56\%$, что подтверждает сохранение достаточной точности анализа. При 22°C и 37°C температурах зафиксировано резкое более чем в 3 раза падение интенсивности аналитического сигнала, до средних значений 0,771 и 0,815 соответственно. Параллельно с падением сигнала наблюдалось закономерное и значительное возрастание вариабельности результатов между лунками. Так коэффициент вариации в условиях тепла увеличился до 10,21% при 22°C и 13,01% при 37%, что существенно превышает допустимый 5% порог.

Оценка стабильности ИФА тест-системы при длительном хранении

Стабильность разработанной ИФА тест-системы оценивали на трех сериях (001, 002, 003) с использованием панели из 20 сывороток крови, включавшей 10 положительных и 10 отрицательных образцов. Исследования проводили на 5, 8 и 10 месяцах хранения. Для каждой серии и срока рассчитывали среднюю ОП₄₅₀, стандартное отклонение и относительное изменение сигнала по сравнению с 5-ым месяцем (Рис. 4).

**Рисунок 4.** Динамика изменений ОП образцов трех серий (серия 001, 002 и 003) на протяжении 5, 8 и 10 месяцев

В группе положительных сывороток наблюдалось последовательное снижение среднего сигнала во всех трех сериях. Для серии 001 среднее ОП₄₅₀ уменьшилось с $1,278 \pm 0,437$ на 5-ом месяце до $1,145 \pm 0,357$ на 8-ом и $0,958 \pm 0,301$ на 10-ом месяце. Аналогическая динамика отмечалась для серии 002: $1,270 \pm 0,352$; $1,141 \pm 0,310$ и $0,929 \pm 0,276$ соответственно, а также для серии 003: $1,268 \pm 0,307$; $1,123 \pm 0,298$ и $0,929 \pm 0,276$. Относительное снижение среднего сигнала к 10 – му месяцу составило 25%, 26,41%, 26,70% для серии 001, 002, 003. Двухфакторный дисперсионный анализ с повторными измерениями выявил значимый эффект времени в группе положительных сывороток $F(2,18) = 78,88$; $p = 1,24 \times 10^{-9}$. Эффект серии $F(2,18) = 0,358$; $p = 0,704$ и взаимодействие времени и серии $F(4,36) = 0,262$; $p = 0,900$ статистически значимыми не были. В группе отрицательных сывороток среднее значения ОП₄₅₀ оставались низкими на протяжении всего периода наблюдения. На 5 и 10 месяцах ОП составляли $0,121 \pm 0,032$ и $0,108 \pm 0,037$ для серии 001; $0,116 \pm 0,025$ и $0,111 \pm 0,017$ для серии 002; $0,124 \pm 0,030$ и $0,108 \pm 0,015$ для серии 003 соответственно. Дисперсионный анализ показал погранично значимый эффект времени $F(2,18) = 3,568$; $p = 0,0495$, тогда как эффект серии $p = 0,740$ и взаимодействие времени и серии $p = 0,291$ не был значимыми. При применении установленного порогового значения ОП₄₅₀ = 0,313 все положительные образцы оставались выше порога, а все отрицательные ниже него во всех трех сериях и на всех исследованных сроках. Таким образом, на данных контрольной панели чувствительности и специфичности составили 100% для каждой серии и срока хранения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка стабильности ИФА тест-системы является важной частью при ее разработке, так как она влияет на ее

надежность и точность при использовании. Реагенты, входящие в состав набора способны сохранять заявленные аналитические и диагностические параметры, такие как чувствительность, специфичность, воспроизводимость и линейность сигнала при постановке теста в течение срока годности, а также при воздействии факторов хранения и эксплуатации [15-16, 24].

Антигены, в особенности рекомбинантные белки, более чувствительны к условиям окружающей среды после прикрепления их к поверхности планшет. Изменение в их вторичной и третичной структуре могут привести к потере конформационных эпитопов и, распознаванию антител, что снижает точность и чувствительность тест-системы [25-26]. Кроме того, стабильность рекомбинантного белка и реагентов, а также условия их хранения могут существенно повлиять на достоверность результатов, что делает эти аспекты критически важными для точности диагностики. Исследование Mai M. El-Daly, акцентирует внимание на значении стабильности тестовых систем и точности их работы в разных условиях [27].

Исследования показывают, что ИФА реагенты, подвергшиеся воздействию повышенной температуры во время транспортировки и хранения [28], давали значительно отличающиеся результаты по сравнению с контролируемыми наборами, что указывает на снижение стабильности и повышение вариабельности измерений при высоких температурах. Антитела в ИФА тест-системах могут терять способность специфически связывать антиген при хранении вне рекомендованных температурных условий, что подчеркивает важность соблюдения температурного режима (2-8°C) для сохранения функциональности реагентов [29].

В наших исследованиях была проведена оценка стабильности ИФА тест-системы при хранении в различных температурных условиях с анализом динамики аналитического сигнала, а также диагностических характеристик, таких как чувствительность и воспроизводимость тест-системы. Стабильность исследуемого набора оценивали по изменению ОП во времени при хранении в различных температурных режимах: -20°C +4°C, +22°C, +37°C [30]. Измерения ОП проводили в одинаковых экспериментальных условиях, что позволило корректно сравнивать значения ОП между временными точками и температурными режимами.

В исходной точке среднее значение ОП₄₅₀ составляло 2,379 при коэффициенте вариации 1,41%, что свидетельствует о высокой однородности результатов до начала хранения. После выдерживания при различных температурах были выявлены выраженные различия в сохранности аналитических характеристик ИФА тест-системы.

Наиболее благоприятным режимом оказалось хранение при 4°C. При этой температуре среднее значение ОП₄₅₀ составило 1,933 или 81,3% от исходного уровня. Снижение сигнала на 18,7% указывает на некоторую потерю активности, но именно при 4°C сохранились наиболее высокие ОП среди всех исследованных условий. Одновременно коэффициент вариации составил 1,74%, что свидетельствует о высокой воспроизводимости результатов между параллельными измерениями. Таким образом, режим хранения при 4°C можно рассматривать как

оптимальный среди исследованных условий, как обеспечивающий наилучшую сохранность аналитического сигнала. Полученные результаты в целом согласуются с опубликованными данными, представленные в статье [32], где также подчеркивается значение регламентированного температурного режима для сохранения функциональной активности иммунологических диагностических систем.

Сравнение показывает, что охлаждение позволяет снизить скорость процессов, способных приводить к изменению структуры белковых компонентов, снижению их иммунореактивности и увеличению вариабельности результатов. При хранении в условиях глубокого замораживания -20°C среднее значение ОП₄₅₀ снизилось до 1,623, что соответствует сохранению 68,2% от исходного уровня аналитического сигнала. Для данного режима коэффициент вариации составил 5,56%, то есть превысил установленный критерий приемлемости в 5%.

Данный температурный режим продемонстрировал менее благоприятные результаты по сравнению с условиями стандартного охлаждения. Негативное влияние в данном случае оказывают процессы локального кристаллообразования, изменение ионной силы раствора при замораживании воды, а также стресс реагентов при последующим оттаивании. В отличие от хранения при 4°C, при котором вариабельность между параллельными измерениями оставалась низкой, замораживание могло привести к неоднородному распределению или частичной инактивации активных компонентов ИФА тест-системы. Данное наблюдение имеет практическое значение, поскольку даже при сохранении достаточно высокого среднего сигнала повышенная вариабельность может снижать надежность интерпретации результатов около диагностического порога.

При температуре 22 и 37°C аналитический сигнал сохранялся лишь на уровне 32,4 и 34,3% от исходного соответственно. Средние значения ОП₄₅₀ составили 0,771 и 0,815, что свидетельствует о существенной утрате функциональной активности ИФА тест-системы. Вероятно, при повышенной температуре ускоряются процессы денатурации белков и разрушения пространственных эпитопов, ответственных за связывание антител. Кроме того, возможно снижение активности ферментной метки или изменение свойств компонентов конъюгата. Близкие значения сигнала при 22 и 37°C могут указывать на то, что основная часть потери активности произошла уже при хранении в условиях комнатной температуры, а дальнейшее повышение температуры не приводило к пропорционально большему снижению сигнала в рамках выбранного наблюдения. Наблюдаемая температурная зависимость согласуется с общими положениями, изложенными в работе [33], посвященной оценке стабильности и воспроизводимости лабораторных иммунологических исследований. Авторы подчеркивают, что надежность результатов ИФА тест-систем определяется не только величиной сигнала, но и стабильностью реагентов, соблюдением условий хранения и контролем аналитической вариабельности.

В настоящем исследовании это подтверждается сочетанным анализом среднего значения ОП₄₅₀ и коэффициента вариации, режима хранения при 4°C обеспечивал

одновременно относительно высокую интенсивность сигнала и низкую межповторную вариабельность. Также следует отметить, что хранение биологических образцов при высоких температурных условиях приводят к ухудшению стабильности аналитических значений, что влияет на диагностические результаты. Кроме того, такие условия хранения могут привести к снижению точности диагностики. Таким образом, результаты исследований демонстрируют, что стабильность ИФА тест-системы является температурозависимой. Оптимальными условиями хранения является +4°C, тогда как хранение при комнатной и повышенной температуре приводит к быстрому снижению аналитического сигнала и ограничивает срок годности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования была проведена оценка влияния температуры хранения на стабильность и аналитические характеристики ИФА тест-системы. Проведенный комплекс исследований показал, что стабильность разработанной ИФА тест-системы носит строго температурозависимый характер. Оптимальным режимом хранения является условия стандартного хранения при 4°C обеспечивающие наилучшую сохранность аналитического сигнала и высокую воспроизводимость результатов. Хранение ИФА тест-системы при температуре -20°C показал менее низкие результаты по сравнению с условиями стандартного хранения. Во время хранения ИФА-тест-системы при 22°C и особенно при 37°C наблюдалось снижение аналитического сигнала ОП, ухудшение диагностических характеристик и увеличение вариабельности результатов. Полученные данные подтверждают необходимость соблюдения рекомендованных температурных условий хранения для обеспечения надежности предлагаемой ИФА-тест-системы, предназначенной для диагностики коронавирусной инфекции на основе рекомбинантного химерного SM-белка вируса SARS-CoV-2.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация, НГД и ШКА; Методология НГД и ШКА; Формальный анализ, НАК; Исследование, ГНД и ТАА, ЖАС, УА, ЖАТ и ШКА; Ресурсы, ЧОВ; Курирование данных, НАК и ШКА; Написание – Подготовка первоначального черновика, НГД; Написание – Рецензирование и редактирование, ШКА и НАК; Визуализация, НГД; Руководство, ШКА; Администрирование проекта, ШКА; Получение финансирования, ТАА.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках НТП «Разработка новых диагностических тест-систем для особо опасных вирусных инфекций» (ИРН: BR24992948) на 2024-2026 годы при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Все авторы ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Выражаем благодарность сотрудникам НИИПББ, которые принимали непосредственное участие в экспериментальных этапах настоящей работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Coronavirus disease (COVID-19) [Electronic resource] / World Health Organization. - URL: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/coronavirus-disease-(covid-19))
2. COVID-19 epidemiological update - 14 March 2025. Edition 177 [Electronic resource] / World Health Organization. - Geneva : WHO, 2025. - URL: <https://www.who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-177>.
3. Expression and characterization of SARS-CoV-2 spike proteins / J.M. Schaub, C.W. Chou, H.C. Kuo [et al.] // Nature Protocols. - 2021. - Vol. 16, No. 11. - P. 5339–5356. - DOI: 10.1038/s41596-021-00623-0.
4. Strategy for the construction of SARS-CoV-2 S and N recombinant proteins and their immunogenicity evaluation / P.H.G. Borges, B. Gregio, H.T. Suzukawa [et al.] // BioTech. - 2025. - Vol. 14, No. 2. - Art. 38. - DOI: 10.3390/biotech14020038.
5. Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications / A. Bhatwa, W. Wang, Y.I. Hassan [et al.] // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. - 2021. - Vol. 9. - Art. 630551. - DOI: 10.3389/fbioe.2021.630551.
6. *Escherichia coli* recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments / B.E. McGuire, J.E. Mela, V.C. Thompson [et al.] // Microbial Cell Factories. - 2022. - Vol. 21. - Art. 21. - DOI: 10.1186/s12934-022-01753-0.
7. Antisera produced using an *E. coli*-expressed SARS-CoV-2 RBD and complemented with a minimal dose of mammalian cell-expressed S1 subunit of the spike protein exhibits improved neutralization / T. Yoshizue, S. Brindha, R. Wongnak [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. - 2023. - Vol. 24, No. 13. - Art. 10583. - DOI: 10.3390/ijms241310583.
8. Wingfield P.T. Overview of the purification of recombinant proteins // Current Protocols in Protein Science. - 2015. - Vol. 80. - P. 6.1.1–6.1.35. - DOI: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
9. B-cell epitopes-based chimeric protein from SARS-CoV-2 N and S proteins is recognized by specific antibodies in serum and urine samples from patients / F.F. Ramos, I.A.G. Pereira, M.M. Cardoso [et al.] // Viruses. - 2023. - Vol. 15, No. 9. - Art. 1877. - DOI: 10.3390/v15091877.
10. Development and validity assessment of ELISA test with recombinant chimeric protein of SARS-CoV-2 / Z. Fernandez, R. de Arruda Rodrigues, J.M. Torres [et al.] // Journal of Immunological Methods. - 2023. - Vol. 519. - Art. 113489. - DOI: 10.1016/j.jim.2023.113489.
11. Validation of a chimeric proteins-based ELISA for the diagnosis of brucellosis in Kazakhstan / A. Bulashev, S. Eskendirova, B. Ingirbay [et al.] // Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. - 2023. - Vol. 47, No. 6. - Art. 10. - DOI: 10.55730/1300-0128.4329.

12. Designing and expression of recombinant chimeric spike protein from SARS-CoV-2 in *Escherichia coli* and its immunogenicity assessment / S. Karimi, S. Nazarian, F. Sotoodehnejadnematalahi [et al.] // Iranian Journal of Pharmaceutical Research. - 2023. - Vol. 22, No. 1. - Art. e137751. - DOI: 10.5812/ijpr-137751.
13. Novel chimeric proteins mimicking SARS-CoV-2 spike epitopes with broad inhibitory activity / M. Cano-Muñoz, D. Polo-Megías, A. Cámara-Artigas [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. - 2022. - Vol. 222, Pt. B. - P. 2467–2478. - DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2022.10.031.
14. Enhancing the stability of COVID-19 serological assay through metal-organic framework encapsulation / Y. Wang, Z. Wang, P. Gupta [et al.] // Advanced Healthcare Materials. - 2021. - Vol. 10, No. 18. - Art. e2100410. - DOI: 10.1002/adhm.202100410.
15. Development of a new indirect ELISA test for the detection of anti-feline coronavirus antibodies in cats / I. Ferrero, S. Dewilde, P. Poletti [et al.] // Veterinary Sciences. - 2025. - Vol. 12, No. 3. - Art. 245. - DOI: 10.3390/vetsci12030245.
16. Development and validation of ELISA for in vitro diagnosis of SARS-CoV-2 infection / L.C.M. Vasconcelos, L. Maia Leony, Á.A.O. Silva [et al.] // COVID. - 2025. - Vol. 5. - Art. 108. - DOI: 10.3390/covid5070108.
17. Nakhanova, G.; Chervyakova, O.; Shorayeva, K.; Issabek, A.; Moldagulova, S.; Zhunushov, A.; Ulankzy, A.; Zhakypbek, A.; Omurtay, A.; Nakhanov, A.; et al. Development of an ELISA Using Recombinant Chimeric SM Protein for Serological Detection of SARS-CoV-2 Antibodies. *Methods Protoc.* 2026, 9, 4. <https://doi.org/10.3390/mps9010004>.
18. ISO 23640:2015. In vitro diagnostic medical devices - Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. - Geneva : International Organization for Standardization, 2015.
19. Evaluation of the humoral immune response in experimental animals to the administration of the recombinant SARS-CoV-2 S-glycoprotein ectodomain with an ISCOM adjuvant / V.A. Evseenko, A.V. Zaikovskaya, A.S. Gudymo [et al.] // Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment. - 2023. - T. 23, № 4. - C. 530–543. - DOI: 10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543.
20. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints // American Journal of Epidemiology. - 1938. - Vol. 27, No. 3. - P. 493–497. - DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
21. Zhang J.-H., Chung T.D.Y., Oldenburg K.R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays // Journal of Biomolecular Screening. - 1999. - Vol. 4, No. 2. - P. 67–73. - DOI: 10.1177/108705719900400206.
22. Molecular and serological tests for SARS-CoV-2 detection in indeterminate serology: can we skip the second sample? / I.N. Sirakov, K. Shishkova, S. Shishkov, I. Alexiev // Current Issues in Molecular Biology. - 2025. - Vol. 47, No. 11. - Art. 919. - DOI: 10.3390/cimb47110919.
23. Richter S.M. [et al.]. The challenges of serology: towards reliable SARS-CoV-2 antibody assays [Electronic resource] // Biocompare. - 2020. - URL: <https://www.biocompare.com/Future-Lab/Diagnostics/>.
24. El-Daly M.M. Advances and challenges in SARS-CoV-2 detection: a review of molecular and serological technologies // Diagnostics. - 2024. - Vol. 14, No. 5. - Art. 519. - DOI: 10.3390/diagnostics14050519.
25. Impact of high temperatures on enzyme-linked immunoassay (ELISA) performance for leptin measurements in human milk stored under varied freeze/thaw conditions / V. Bertacchi, M. Corley, G.P. Aronsen, R.G. Bribiescas // PLOS One. - 2025. - Vol. 20, No. 3. - Art. e0320366. - DOI: 10.1371/journal.pone.0320366.
26. Kang L., Smith S., Wang C. Stabilization of surface-bound antibodies for ELISA based on a reversible zeolitic imidazolate framework-8 coating // Journal of Colloid and Interface Science. - 2021. - Vol. 588. - P. 101–109. - DOI: 10.1016/j.jcis.2020.12.068.
27. El-Daly, M.M. Advances and Challenges in SARS-CoV-2 Detection: A Review of Molecular and Serological Technologies. *Diagnostics* **2024**, *14*, 519. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14050519>.
28. Bertacchi V, Corley M, Aronsen GP, Bribiescas RG. Impact of high temperatures on enzyme-linked immunoassay (ELISA) performance for leptin measurements in human milk stored under varied freeze/thaw conditions. *PLoS One*. 2025 Mar 19;20(3):e0320366. doi: 10.1371/journal.pone.0320366. PMID: 40106448; PMCID: PMC11957766.
29. Lin Kang, Steve Smith, Congzhou Wang. Stabilization of surface-bound antibodies for ELISA based on a reversible zeolitic imidazolate framework-8 coating. / Journal of Colloid and Interface Science, Volume 588, 2021, Pages 101-109, ISSN 0021-9797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.12.068>.
30. Khatkhatay MI, Desai MP, Sankolli GM, Pardhe DK, Joshi UM. Stability studies of the components of a prototype penicillinase (beta-lactamase)-linked ELISA kit. *J Clin Lab Anal.* 1993;7(2):95-9. - doi: 10.1002/jcla.1860070205.
31. Irene Ferrero, Paolo Poletti, Enrica Giachino, Joel Filipe, Alessia Libera Gazzonis, Carolina Allievi, Paola Dall'Ara. A newly developed rapid K39-based LeishmaCHECK Ab ELISA for high-throughput serological screening of canine leishmaniasis. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*. Volume 10, 2026, 100418, ISSN 2667-114X, <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2026.100418>.
32. Ferrero, I.; Dewilde, S.; Poletti, P.; Canepa, B.; Giachino, E.; Dall'Ara, P.; Filipe, J. Development of a New Indirect ELISA Test for the Detection of Anti-Feline Coronavirus Antibodies in Cats. *Vet. Sci.* **2025**, *12*, 245. <https://doi.org/10.3390/vetsci12030245>.
33. M. I. Khatkhatay, M. P. Desai, G. M. Sankolli, D. K. Pardhe, U. M. Joshi. Stability studies of the components of a prototype penicillinase (β-lactamase)-linked ELISA kit. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, Volume 7, Issue 2 pp. 95-99.

STABILITY OF AN ELISA TEST SYSTEM BASED ON A RECOMBINANT CHIMERIC SM PROTEIN FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES TO SARS-COV-2 UNDER DIFFERENT TEMPERATURE CONDITIONS

G.D. Nakhanova^{1,2}, O.V. Chervyakova¹, A.T. Zhunushov², A.K. Nakhanov¹, A. Ulankyzy¹, A.S. Zhakypbek¹, Tileukhanova¹, K.A. Shorayeva¹

¹Research Institute for Biological Safety Problems, QazBioPharm National Holding JSC, 080409, Zhambyl Region, Republic of Kazakhstan

²Institute of Biotechnology, National Academy of Sciences of the Kyrgyz Republic, 720071, Bishkek, Kyrgyz Republic

* Correspondence: k.shorayeva@biosafety.kz

ABSTRACT

Assessment of the stability of kit components is a critical step in the development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems, as it directly determines the accuracy and reproducibility of diagnostic results during storage and routine use. In the present study, the stability and reproducibility of a newly developed ELISA test system based on the recombinant chimeric SM protein were evaluated under different temperature conditions. The stability of the kit components was assessed by monitoring changes in the analytical signal, expressed as optical density (OD), and the variability of replicate measurements, expressed as the coefficient of variation (CV, %), over a controlled period at -20°C, 4°C, 22°C, and 37°C. The results demonstrated that the stability of the developed ELISA test system was strongly temperature-dependent. Standard refrigerated storage at 4°C was identified as the optimal condition, providing the highest preservation of the analytical signal, with 81.3% of the initial signal retained ($OD_{450} = 1.933$), while maintaining high reproducibility ($CV = 1.74\%$), consistently below the pre-defined acceptance threshold of $\leq 5\%$. Storage at -20°C showed notable limitations. Despite maintaining a relatively high analytical signal ($OD_{450} = 1.623$) and 68.2% residual activity, freezing and thawing of the reagents resulted in increased analytical variability ($CV = 5.56\%$), exceeding the established acceptance criterion. Exposure to elevated temperatures of 22°C and 37°C had a pronounced detrimental effect on test-system stability, resulting in degradation of protein components and a loss of more than 65% of the initial activity. These findings demonstrate that, to ensure long-term preservation of the sensitivity, specificity, and reproducibility of the developed ELISA diagnostic kit, storage at 4°C under properly maintained cold-chain conditions is an essential technological requirement.

Keywords: ELISA test system; stability; reagents; optical density; recombinant protein.

ӘРТҮРЛІ ТЕМПЕРАТУРАЛЫҚ ЖАҒДАЙЛАРДА SARS-COV-2 ВИРУСЫНА ҚАРСЫ РЕКОМБИНАНТТЫ ХИМЕРЛІК SM АҚУЫЗЫ НЕГІЗІНДЕГІ ИФТ ТЕСТ ЖҮЙЕСІНІҢ ТҮРАҚТЫЛЫҒЫ

Наханова Г.Д.^{1,2}, Червякова О.В.¹, Жунушов А.Т.², Наханов А.К.¹, Ұланқызы А.¹, Жақыпбек А.С.¹, Тілеуханова А.А.¹, Шораяева К.А.^{1*}

¹Биологиялық қауіпсіздік проблемаларын ғылыми-зерттеу институты «QazBioPharm» Ұлттық холдингі, 25/1, Гвар-дейский, Қордай ауданы, Жамбыл облысы, 080409, Қазақстан

²Қырғыз Республикасының Ұлттық Ғылым академиясы Биотехнология институты, 720071, Бішкек қ., Қырғыз Республикасы

* Корреспондент авторы: k.shorayeva@biosafety.kz

ТҮЙІН

Жинақ компоненттерінің тұрақтылығын бағалау имуноферменттік талдауға (ИФТ) арналған тест-жүйелерді әзірлеудің аса маңызды кезеңдерінің бірі болып табылады, өйткені ол диагностикалық нәтижелердің сақтау және пайдалану барысында дәлдігі мен қайталанғыштығына тікелей әсер етеді. Осы зерттеуде рекомбинантты химерлік SM ақуызы негізінде әзірленген ИФТ тест-жүйесінің әртүрлі температуралық режимдердегі тұрақтылығы мен нәтижелерінің қайталанғыштығы зерттелді. Жинақ компоненттерінің тұрақтылығы -20°C, 4°C, 22°C және 37°C температураларда бақыланатын уақыт кезеңі ішінде оптикалық тығыздық (ОТ) түрінде тіркелген аналитикалық сигналдың өзгеру динамикасы және қайталама өлшемдер нәтижелерінің вариабельділігі, яғни вариация коэффициенті (CV , %) бойынша бағаланды. Зерттеу нәтижелері әзірленген ИФТ тест-жүйесінің тұрақтылығы температуралық режимге айқын тәуелді екенін көрсетті. Оңтайлы сақтау жағдайы ретінде 4°C температурадағы стандартты тоңазытқыш режимі анықталды. Бұл жағдайда бастапқы деңгейдің 81,3%-ын құрайтын аналитикалық сигналдың ең жоғары сақталуы қамтамасыз етілді ($OT_{450} = 1,933$), ал нәтижелердің қайталанғыштығы жоғары деңгейде сақталды ($CV = 1,74\%$), бұл белгіленген $\leq 5\%$ рұқсат етілген шектен тұрақты түрде төмен болды. -20°C температурада сақтау белгілі бір шектеулерді көрсетті. Аналитикалық сигналдың салыстырмалы түрде жоғары деңгейде сақталуына ($OT_{450} = 1,623$) және қалдық белсенділіктің 68,2% болуына қарамастан, реагенттерді мұздату және еріту аналитикалық вариабельділіктің артуына алып келді ($CV = 5,56\%$), бұл белгіленген рұқсат етілетін критерийден жоғары болды. 22°C және 37°C температуралардың әсері тест-жүйе тұрақтылығына айқын теріс ықпал етті, нәтижесінде ақуыздық компоненттердің тұрақтылығы төмендеп,

бастапқы белсенділіктің 65%-дан астамы жоғалды. Алынған нәтижелер әзірленген ИФТ диагностикалық жинағының сезімталдығы, спецификалығы және нәтижелерінің қайталанғыштығы көрсеткіштерін ұзақ мерзім бойы сақтау үшін оны 4°C температурада және суық тізбек талаптарын қатаң сақтай отырып сақтау міндетті технологиялық шарт болып табылатынын көрсетті.

Түйін сөздер: ИФА тест жүйесі, тұрақтылық, реагенттер, оптикалық тығыздық, рекомбинантты ақуыз.