

МРНТИ: 68.41.05

Б.М. Исмагамбетов*, С.Е. Шоманова, И.А. Ахажанова, З.Д. Ершебулов
"Otarbiopharm" ЖШС, "QazBioPharm Ұлттық холдингі" АҚ
080409, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қ.ү.к,
5 ғимарат.
* e-mail: bekza88@mail.ru

БЛЮТАНГТЫ БАЛАМАЛАУ ЖҮРГІЗУ ҮШІН ИФТ ҚОЮ ШАРТТАРЫН ОҢТАЙЛАНДЫРУ

Аннотация: Мақалада ірі қара (ІҚМ) және ұсақ (ҰҚМ) малда блютанг вирусына арнайы антиденелерді анықтау үшін әзірленген иммуноферменттік талдауға (ИФТ) арналған отандық жиынтықты қою шарттарын оңтайландыруға арналған зерттеулердің нәтижелері келтірілген. Жұмыста әдістемені жетілдірудің негізгі кезеңдері, соның ішінде антигеннің сорбция жағдайларын таңдау, реагенттердің концентрациясын оңтайландыру, инкубацияның температуралық-уақыттық режимдері және талдау параметрлері егжей-тегжейлі сипатталған. Сорбция үшін рекомбинантты VP7 антигенінің оңтайлы концентрациясы 0,05 М карбонат-бикарбонат буферін (КББ) және $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағат инкубацияны пайдаланған кезде бір ұңғымаға 5 мкг құрайды. Бұл жағдайлар антигеннің антиденелермен тұрақты байланысуын және талдаудың жоғары сезімталдығын қамтамасыз етеді.

Инкубацияның температуралық режимдерін оңтайландыру иммундық кешендердің түзілу жылдамдығын және фермент белсенділігін арттыруға ықпал ететін $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ температурада талдау жүргізу ең тиімді екенін көрсетті. Биотинилденген моноклоналды антиденелер мен стрептавидин-HRP конъюгатын ТМБ субстратымен бірге қолдану әдістің жоғары ерекшелігі мен сезімталдығына қол жеткізді. 0,5N тұз қышқылының ерітіндісін қолдана отырып ферментативті реакцияны тоқтату нәтижелердің нақты көрінісін қамтамасыз ете отырып, тиімділігін растады.

Әзірленген тест-жүйе блютанг диагностикасында қолдану үшін жоғары әлеуетті көрсетеді, бұл әсіресе Қазақстан жағдайында осы ауруды бақылау және алдын алу үшін маңызды. Бұл жинақты ветеринарлық тәжірибеге енгізу импорттық аналогтарға тәуелділікті азайтып қана қоймай, сонымен қатар жануарлардың аса қауіпті жұқпалы ауруларымен күресте елдің диагностикалық мүмкіндіктерін нығайтады. Нәтижелер жануарлардың жұқпалы ауруларын диагностикалау әдістерін жетілдіру саласындағы одан әрі зерттеулердің маңыздылығын көрсетеді, бұл өз кезегінде ауыл шаруашылығын дамытудың және азық-түлік қауіпсіздігін қамтамасыз етудің стратегиялық міндеттеріне сәйкес келеді.

Түйін сөздер: Блютанг, антиген, антидене, иммуноферменттік талдау, конъюгат, тетраметилбензидин (ТМБ) субстрат, тежегіш-реагент.

Кіріспе.

Құс тұмауы, африкалық шошқа обасы, аусыл және басқа да аса қауіпті инфекциялар сияқты вирустық және бактериялық аурулар Қазақстан үшін ерекше қауіп төндіреді. Бұл аурулар мал мен құстың жаппай қырылуына алып келуі мүмкін, бұл ауыл шаруашылығы саласына үлкен зиян келтіруі, азық-түлік қауіпсіздігін төмендетуі және айтарлықтай экономикалық шығынға алып келуі мүмкін.

Осындай жұқпалы экзотикалық аурулардың бірі – күйіс қайыратын жануарларға әсер ететін блютанг – ірі қара, ешкі, қой, бұғы, жануарлар арасында инфекция *culicoides* тұқымдасына жататын қан соратын жәндіктер арқылы таралады. Аурудың белгілері қойларда айқын көрінеді [1].

Блютанг (көк тіл, қой катаральды безгегі, Bluetongue) - күйіс қайыратын жануарлардың ауыз және мұрын қуыстарының шырышты қабығының зақымдалуымен, тілдің ісінуімен,

бастың алдыңғы бөлігінің ісінуімен, безгегімен, аяқ-қолдардың зақымдалуымен сипатталатын вирустық векторлық ауруы. Ірі қара малдың ұсқынсыз төлдерінің болуы мүмкін. Әдебиеттерде клиникалық көрінісі, патогенезі, қоздырғыштың қасиеттері, эпизоотологияның кейбір мәселелері, диагностика және нақты профилактика жеткілікті егжей-тегжейлі сипатталған [2, 3, 4].

Блютанг алғаш рет Оңтүстік Африкада 1876 жылы тіркелген, бастапқыда ол жергілікті тұқымды қойларға әсер етті және жиі симптомсыз болды. Африкаға еуропалық тұқымды жоғары сезімтал қойлардың әкелінуімен ауру қатерлі сипатқа ие болды. 1943 жылдан бастап ауру Африка континентінен тыс жерлерде тіркеле бастады. 1943 жылы Кипр аралында, сол-ақ жылы Палестина мен Сирияда оның ауыр эпизоотиясы байқалды. 1944 жылдан бастап бұл инфекция Түркия мен Иранда байқалды. 1948 жылы - Америкада, ал 1956 жылы - Португалияның оңтүстігінде, Испанияда және 1962-1964 жылдары – Оңтүстік Америка елдерінде пайда болды. 1972 жылы ол Египетте тіркелген. Антиденелер тек қойларда ғана емес, сонымен қатар ірі қара, буйвол және ешкілерде де кездеседі [5, 6].

Шетелдік және отандық зерттеулердің [7-12] деректеріне сәйкес, БТ зертханалық диагностикасы үшін диффузиялық преципитация реакциясы (ДПР), комплементті байланыстыру реакциясы (КБР), бейтараптандыру реакциясы (БР), флуоресцентті антиденелер әдісі (ФАӨ) және полимеразды тізбекті реакция (ПТР) сияқты сенімді құралдар мен әдістер әзірленді және қолданылады. Бұл әдістер 2-3 күн ішінде диагноз қоюға мүмкіндік береді, бірақ олар сезімталдығымен, ерекшелігімен және уақыт шығындарымен ерекшеленеді. Кейбіреулері көп уақытты қажет етеді, ал басқалары төмен сезімталдыққа ие. Осыған байланысты блютанг вирусын зертханалық балаудың неғұрлым сезімтал, спецификалық және экспресс әдістерін әзірлеу бүгінгі күнге дейін өзекті мәселе болып қала береді. Осындай әдістердің бірі – жоғары сезімталдығы, ерекшелігі, әмбебаптығы және автоматтандыру мүмкіндігі бар ИФТ. Осы артықшылықтардың арқасында ИФТ ветеринарлық тәжірибеде жануарлардың вирустық инфекцияларын диагностикалау және бақылау үшін кеңінен қолданылады. Бұл әдіс антигендерді, антиденелерді, токсиндерді, гормондарды және басқа биологиялық белсенді заттарды анықтауда жоғары тиімділікті көрсетеді [7-12].

Қазіргі уақытта Дүниежүзілік денсаулық сақтау ұйымы (ДДСҰ) және Дүниежүзілік жануарлар денсаулығы ұйымы (ДЖДҰ) медицина мен ветеринарияда кеңінен қолданылатын ПТР-НУ, ИФТ және иммунохроматографиялық талдау (ИХТ) негізінде жұқпалы ауруларды диагностикалаудың заманауи әдістерін мақұлдады [13]. Бұл әдістер патогендік геномдар мен арнайы антиденелерді анықтауда тиімді диагностикалық сипаттамаларға ие.

Ауруды диагностикалау үшін қолданылатын ықтимал талдау әдістерін қарастыруда антиденелерді анықтау талдауларын олардың ыңғайлылығын, үлгілерді алу мен дайындаудың қарапайымдылығын, жалпы диагностикалық тиімділіктің жақсы сипаттамаларын, талдауды автоматтандыру мүмкіндігін (жоғары өткізу қабілеттілігін қамтамасыз етеді), төмен құнын және нәтижені алу жылдамдығын ескере отырып қосу маңызды.

Антиденелерді анықтаудың ең көп таралған әдістері – классикалық вирусты БР, қатты фазалы ИФТ, гемагглютинацияны тежеу реакциясы (ГТР) және КБР.

Блютангқа қарсы антиденелерді (серологиялық топқа тән) арнайы анықтауға арналған рекомбинантты ақуызға негізделген қатты фазалы ИФТ – жануарларды жылжытпас бұрын инфекцияның жоқтығын растау үшін ұсынылатын сынақ. Сынақ өте сезімтал және ерекше (ағар геліндегі имунодиффузиямен салыстырғанда), жылдам, арзан және сенімді. Қатты фазалы ИФТ-ның негізгі артықшылығы көп сатылы және көп компонентті имунохимиялық реакцияларды жүргізудің әдістемелік қарапайымдылығында, ал ИФТ-ны кеңінен қолдану оның жоғары сезімталдығы мен ерекшелігімен түсіндіріледі [14-19]. Бәсекеге қабілетті ИФТ-ға негізделген жиынтықтар сезімтал және жануарлардың әртүрлі түрлерін, соның ішінде жабайы күйіс қайыратын жануарларды сынау үшін пайдаланылуы мүмкін. ДЖДҰ бұл әдісті эпидемиологиялық және популяциялық зерттеулерде көптеген үлгілерді өңдеу қажет болған кезде, сондай-ақ жаппай диагностика және қадағалау бағдарламаларында қолдану қажет болған кезде ұсынады. Сонымен қатар, антиденелерді анықтау талдаулары жануарларды

шығару, әкелу және сату процесінде маңызды орын алады. Бұл тестілеу әдістері халықаралық сауда жағдайында олардың маңыздылығын көрсете отырып, ұсынылған ДЖДҰ қатарында қалуды жалғастыруда. Антиденелердің болуын анықтау қабілетінің арқасында мұндай сынақтар жұқпалы аурулардың таралуын болдырмай, жануарлардың денсаулығын бақылауды қамтамасыз етуге көмектеседі. Бұл өз кезегінде жануарлардың денсаулығын қорғауға ғана емес, мал шаруашылығы саласындағы экономикалық тұрақтылықты сақтауға да ықпал етеді. Жаһандану және жануарлардың белсенді саудасы жағдайында бұл талдаулардың рөлі қауіпсіздік стандарттарын сақтау үшін маңызды бола түсуде [9].

Диагностикалық тест-жүйелерге деген үлкен сұранысқа қарамастан, оларды Қазақстанда өндіру жолға қойылмаған. Осыған байланысты отандық диагностикаларды әзірлеу және өндіру мемлекеттің стратегиялық міндеттерінің тізбесіне енгізілген [20].

Жоғарыда айтылғандарды қорытындылай келе, блотанг вирусын серодиагностикалау үшін ИФТ әдісін жетілдіру Қазақстан Республикасының ғалымдары үшін өзекті және маңызды міндет болып табылады. Бұл диагностиканың дәлдігін, сезімталдығы мен ерекшелігін арттыру қажеттілігіне байланысты, бұл өз кезегінде ауру жануарларды тиімдірек анықтауға, аурудың таралуын бақылауға және ауыл шаруашылығындағы экономикалық шығындарды азайтуға мүмкіндік береді. ИФТ-ға заманауи тәсілдерді әзірлеу және енгізу, сондай-ақ халықаралық стандарттар мен талаптарға сәйкес, елде ветеринария ғылымы мен практикасын нығайтуға ықпал ететін болады.

Зерттеу шарттары мен әдістері

Рекомбинантты VP7 антигенін сорбциялау үшін сусыз натрий карбонаты ($\geq 99,5\%$, ACS) және натрий бикарбонаты (AR) негізіндегі ерітінді қолданылды. Биотинилденген антиденелерді анықтау үшін тұрақтандырғышы бар стрептавидин-HRP конъюгаты қолданылды.

Карбонат-бикарбонат буфері (КББ) натрий карбонаты мен натрий бикарбонатын рН 9,4–9,6 дистилденген суда еріту арқылы дайындалды; фосфат-тұз буфері (рН 7,2–7,4) бір алмастырылған натрий фосфатын, қос алмастырылған натрий фосфатын және натрий хлоридін еріту арқылы алынды; блоктаушы ерітінділер (1%, 3%, 5%) бойынша бұқа сарысулы альбуминін (БСА) және майсыздандырылған сүт ұнтағы біртектілікке дейін ерітілді; твинді фосфат-тұз буфері (ФТБ-Т) Tween-20 және рН-ы бақыланатын СБА қосу арқылы дайындалды.

Мақсатты молекулаларды визуализациялау үшін ИФТ-да желкек пероксидазасына негізделген ТМБ-субстраттар жиынтығы қолданылды. Ферментативті реакцияны тоқтатуға арналған ерітінділер ортофосфор қышқылының көмегімен дайындалды (85%, таза РН. Eur., NF) және тұз қышқылы (37%, химиялық таза).

Зерттеулерді орындау үшін StatFax 2600 жуу машинасы ИФТ жүргізу процесінде микропластинкалардың тесіктерін автоматты түрде жуу және инкубацияның әр кезеңінен кейін байланыспаған компоненттерді алып тастау үшін пайдаланылды, бұл фондық сигналды азайтады және талдау дәлдігін жақсартады. ИФТ жүргізу кезінде берілген диапозонда тұрақты температураны ұстап тұру үшін Memmert термостаты пайдаланылды.

Сорбция процесін оңтайландыру блоктаушы ерітінділерді қолдана отырып әртүрлі температура-уақыт режимдерінде жүргізілді: $5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағ, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ температурада 14 ± 1 сағ және $37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 4 ± 1 сағ. Сорбция сапасы құрамында блотангқа қарсы моноклоналды антиденелер бар сарысуларды қолдану арқылы ИФТ көмегімен бақыланды.

Зерттеу ИФТ параметрлерін оңтайландырды, соның ішінде антигендердің қанықпаған антиденелермен максималды байланысуы үшін сарысу концентрациясын таңдау, сондай-ақ антигендердің сорбциясы, антиденелермен байланысуы және конъюгатпен әрекеттесу кезеңдеріндегі температураның инкубацияға әсері. Бұл реакцияның тұрақтылығы мен тиімділігін қамтамасыз ететін оңтайлы температура жағдайларын анықтауға мүмкіндік берді.

Спецификалық емес байланыстыруды азайту және фондық сигналды азайту үшін жуу санын одан әрі оңтайландырылды, сондай-ақ әдістің сезімталдығы мен ерекшелігі арасындағы тепе-теңдікке қол жеткізу үшін конъюгат концентрациясы таңдалды.

Оптикалық тығыздық (ОТ) 450 нм толқын ұзындығында StatFax 4300 автоматты анализаторында өлшенді. Нәтижелердің дұрыстығын қамтамасыз ету үшін барлық өлшеулер үш рет орындалды.

Өлшемдердің дұрыстығын бақылау үшін теріс бақылаудың орташа арифметикалық мәні анықталды және оң бақылау үшін тежелу пайызы (ТП) есептелді. Талдаудың дұрыстығын растағаннан кейін әрбір үлгі үшін ТП төмендегі формула бойынша есептелді:

$$\text{ТП (\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{ОП образца}}{\text{ОП (К-)}} \right) \right] \times 100$$

Алынған мәндерге сүйене отырып, талдау нәтижелері келесідей түсіндірілді: ТП $\geq 50\%$ үлгілері оң, ал ТП $< 50\%$ үлгілері теріс деп саналды.

Зерттеу нәтижелері

Қол жетімді әдебиетті, сондай-ақ әртүрлі өндірушілердің ИФТ негізінде диагностикалық препараттарды қолдану жөніндегі нұсқаулықтарын талдау нәтижесінде әзірленіп жатқан тест-жүйемен талдауларды орындау процесін оңтайландыру бойынша ұсыныстар жасалды.

Осылайша, ИФТ-ны оңтайландыруға ұсынылған тәсіл тесттің сезімталдығын да, ерекшелігін де едәуір арттыруға мүмкіндік береді, бұл диагностиканың жоғары тиімділігі үшін маңызды.

Антигеннің сорбция жағдайларын оңтайландыру

Сорбцияға арналған антиген концентрациясы ИФТ-ны дамыту бойынша ғылыми басылымдардағы ұсыныстарды талдай отырып дайындалды: 1 мкг / ұңғыма, 5 мкг / ұңғыма және 10 мкг/ұңғыма. MediSorp, MultiSorp, PolySorp және MaxiSorp сияқты антигеннің қатты фазаға сорбциясы 0,05 және 0,2 М КББ, фосфат-тұз буфері және 0,05 М Трис-НСІ буферін пайдаланып жүргізілді. Сорбция процесін оңтайландыру температура-уақыт режимін таңдаумен жүргізілді: $5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағат, $23 \pm 2^\circ\text{C}$ температурада 14 ± 1 сағат, $37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада 4 ± 1 сағат.

Рекомбинантты антигеннің сорбция жағдайларын оңтайландыруға бағытталған зерттеулер нәтижесінде ИФТ-ны сәтті жүзеге асырудың ең жақсы параметрлері туралы құнды деректер алынды. Біз mediSorp қатты фазасындағы сорбция үшін рекомбинантты антигеннің оңтайлы концентрациясы бір ұңғымаға 5 микрограмм екенін анықтадық. Бұл жағдайда сапалы сорбцияға ықпал ететін ең тиімді буфер 1-кестеде көрсетілген 0,05 М СББ болды.

1-кесте – Антиген сорбциясы процесін оңтайландыру нәтижелері

Антиген концентрациясы (мкг/ұңғыма)	Планшет	Инкубацияның температуралық-уақыттық режимі	Сорбция буфері	Оң бақылаудың оптикалық тығыздығы
5 мкг/ұңғыма	MediSorp PS	$5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағ	0,05 М КББ	0,039
10 мкг/ ұңғыма	MediSorp PS	$5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағ	0,05 М КББ	0,012
10 мкг/ ұңғыма	MediSorp PS	$5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағ	0,2 М КББ	0,009

Температура-уақыт режимі $5 \pm 3^\circ\text{C}$ температурада 20 ± 2 сағат бойы инкубацияны қамтыды бұл антигеннің антиденемен байланысуының жоғары көрсеткіштерін қамтамасыз етті. Бұл жағдайлар тұрақты иммундық кешендердің қалыптасуына ықпал етті, бұл "антиген-

антидене"кешенінің түзілуінің ұлғаюын көрсететін оптикалық тығыздықтың төмендеуімен расталады.

Бір қызығы, 0,05 М және 0,2 М КББ буферлерін пайдалана отырып, бірдей жағдайларда ұңғымаға рекомбинантты антиген концентрациясы 10 мкг дейін жоғарылағанда да қанағаттанарлық нәтижелер алынды. Алайда, бұл жағдайда антигеннің шығыны екі есе артады, бұл диагностикалық жиынтық құнының өсуіне және талдаудың төмен ерекшелігіне алып келуі мүмкін. Бұл деректер талдау жүргізу шарттарын одан әрі оңтайландыру үшін негіз болады.

ИФТ қою шарттарын оңтайландыру.

ИФТ қою шарттарын оңтайландыру әдістің сезімталдығы мен ерекшелігін арттырудың негізгі кезеңі болып табылады. ИФТ тиімділігі көбінесе көптеген параметрлерді оңтайландыруға байланысты, олардың арасында температура режимі шешуші рөл атқарады. Температура антигеннің антиденелермен байланысу жылдамдығына, ферменттің белсенділігіне және талдауда қолданылатын Реактивтердің тұрақтылығына тікелей әсер етеді.

Зерттеу барысында біз ИФТ-ның әртүрлі кезеңдерінде инкубацияның оңтайлы температурасын анықтауға бағытталған бірқатар эксперименттер жүргіздік. Зерттеулер әртүрлі температура режимдерін қолдана отырып жүргізілді: $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ және $5\pm 3^{\circ}\text{C}$. Алынған мәліметтердің статистикалық дұрыстығын қамтамасыз ету үшін әр эксперимент кемінде үш рет қайталанды.

ИФТ жағдайларын оңтайландыру үшін біз 0,05 М КББ буферін пайдалана отырып дайындалған Medisorp қатты фазасындағы бір ұңғымаға 5 мкг концентрациясында рекомбинантты антигеннің сорбция процесінің нәтижелеріне, сондай-ақ 0,05 М және 0,2 М КББ буфері бар ұқсас қатты фазадағы ұңғымаға 10 мкг концентрациясына негізделген иммуносорбенттерді таңдадық. Бұл параметрлер сорбция процесінде ең жақсы нәтижелерді көрсетті, бұл одан әрі талдаудың жоғары сезімталдығы мен ерекшелігін көрсетеді.

Зерттелетін сарысулардың концентрациясын анықтау үшін бірнеше сұйылту нұсқалары қолданылды. Бірінші нұсқада зерттелетін үлгіге сәйкес келетін ұңғымаларға 50 мкл сарысу енгізілді. Екінші нұсқада 10 мкл буфер және 40 мкл үлгі, ал үшінші нұсқада 30 мкл буфер және 20 мкл үлгі қолданылды. Әр жағдайда сұйылтылған үлгілер ерітіндінің біртектілігін қамтамасыз ететін тамшуыр көмегімен мұқият араластырылды.

Үлгілерді сұйылту үшін бұрын дайындалған буфер қолданылды, ол тұрақты иммундық кешендерді қалыптастыру үшін қажетті рН мен иондық күштің оңтайлы деңгейлерін қамтамасыз етті. Осыдан кейін бақылау және зерттеу үлгілері бар барлық ұңғымаларға биотинмен блотангқа қарсы конъюгацияланған моноклоналды антиденелер қосылды. Антигеннің антиденемен жылдам байланысуын қамтамасыз ету үшін инкубация процесі әртүрлі температура-уақыт режимдерінде жүргізілді: $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ және $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ температурада 60 мин. Инкубацияның барлық кезеңдері арнайы Elisa қақпақтарының астында жүргізілді, бұл буланудың алдын алуға және реакцияның тұрақты жағдайларын қамтамасыз етуге мүмкіндік берді.

Инкубациядан кейін планшеттің тесіктерін жуу байланыспайтын ақуыздар мен нашар түзілген кешендерді кетіру үшін қолданылды. Жуу процесі концентрацияланған 20 есе ерітіндіден алынған бір рет жуу ерітіндісін қолдану арқылы жүргізілді. Оны дайындау үшін концентраттың қажетті көлемі өлшеуіш цилиндрдің көмегімен анықталып, 1:19 қатынасында тазартылған сумен сұйылтылды. Бұл талдаудың келесі кезеңдері үшін қажетті иондық күш пен рН қамтамасыз етті.

Детекция мақсатты антигенге биотинилденген моноклоналды антиденемен байланысқан стрептавидинмен конъюгацияланған желкек пероксидазасының ферментативті белсенділігінің арқасында жүргізілді. Бұл фермент конъюгаттардың құрамында өзінің белсенділігін сақтайды, ұзақ уақыт сақтау кезінде жоғары каталитикалық қабілетке және тұрақтылыққа ие. Оңтайлы конъюгат концентрациясын анықтау эксперименттік жолмен жүзеге асырылатынын ескеру маңызды, өйткені төмен концентрация талдаудың сезімталдығына теріс әсер етуі мүмкін, ал тым жоғары фондық сигнал деңгейін жоғарылату

арқылы спецификалық емес байланыстыруды тудыруы мүмкін. Қолда бар әдеби деректерге сүйене отырып, біздің зерттеуімізде 1:1000, 1:5000 және 1:10000 арақатынасындағы ерітілген конъюгаттар қолданылды, сонымен қатар 1:100 өсіруден бастап шахмат типте титрлеу жүргізілді. Конъюгатты инкубациялау инкубациядан кейінгі ұқсас жуумен алдыңғы кезеңдермен бірдей жағдайларда жүзеге асырылды.

Талдаудың келесі кезеңі планшеттің ұңғымасында ферменті бар конъюгаттың болуын анықтау болды. Әрбір мұқият жуылған шұңқырға 100 мкл бұрын таңдалған субстрат-ТМБ қосылды және әртүрлі жарық концентрациясы бар жағдайларда инкубацияланды. Ферментативті реакцияны тоқтату үшін әр ұңғымаға тұз қышқылына негізделген тоқтату реагенті енгізілді.

ТМБ хромогендік реагент ретінде пайдаланылған кезде ОТ-ны өлшеу 450 нм толқын ұзындығында жүргізілді. Оңтайлы жағдайлар әр ұңғымадағы ОТ-ны бағалау негізінде анықталды, мұнда оңтайландыру критерийлері оң бақылаулардан максималды сигнал және теріс бақылаулардан минималды сигнал болды. Оң және теріс сынамалар сигналдарының арақатынасы әдістің ерекшелігінің көрсеткіші болды.

Ғылыми нәтижелерді талқылау

Антигенді өзіне тән антиденелермен байланыстыру процесінде қатты фазада сорбцияланған рекомбинантты антигенмен байланысу үшін бәсекелес иммундық кешендер түзіледі. Бұл зерттелетін үлгілерде спецификалық антиденелердің болуы мен концентрациясы туралы сенімді ақпарат алуға мүмкіндік береді, бұл нәтижелерді кейінірек түсіндіру және диагностикалық хаттамаларды түзету үшін өте маңызды.

ИФТ тиімділігі температура режимін, жуу санын және реагенттердің концентрациясын қоса алғанда, әртүрлі параметрлерді оңтайландыруға байланысты. Температура антиген мен антиденелердің байланысу жылдамдығына да, ферменттің белсенділігіне де әсер етеді, бұл өз кезегінде талдаудың сезімталдығы мен ерекшелігіне әсер етеді.

ИФТ жүргізу шарттары сынақ жүйесінің компоненттерімен 37 ± 1 температуралық режимде оңтайландырылды, мысалы, VP7 ақуызына қарсы биотинилденген моноклоналды антиденелер, желкек пероксидазасы бар стрептавидин конъюгаты, сондай-ақ 3,3', 5, 5' - тетраметилбензидин (ТМБ) хромогенді субстраты. Ферментативті реакцияны тоқтату үшін 0,5 N тұз қышқылы ерітіндісінің тиімділігі расталды.

Қорытынды

Ірі қара және ұсақ малдарда блютанг диагностикасы үшін ИФТ қою жағдайларын оңтайландыру бойынша жүргізілген зерттеулер ветеринариялық диагностиканың қазіргі заманғы талаптарына сәйкес келетін тиімді тест-жүйені әзірлеуге мүмкіндік берді. Жұмыс барысында антигеннің сорбция шарттарын, реагенттердің концентрациясын, инкубацияның температуралық режимдерін және жуу санын қоса алғанда, талдаудың негізгі параметрлері оңтайландырылды. Сорбция үшін рекомбинантты VP7 антигенінің оңтайлы концентрациясы 0,05 M КББ пайдаланған кезде бір ұңғымаға 5 мкг және $5 \pm 3^\circ\text{C}$ температуралық режимде 20 ± 2 сағ болатыны анықталды. Бұл жағдайлар антигеннің антиденелермен тұрақты байланысуын және талдаудың жоғары сезімталдығын қамтамасыз етеді.

ИФТ-ның әртүрлі кезеңдеріндегі инкубацияның температуралық режимдерін оңтайландыру иммундық кешендердің түзілу жылдамдығын және фермент белсенділігін арттыруға ықпал ететін $37 \pm 1^\circ\text{C}$ температурада талдау жүргізу ең тиімді екенін көрсетті. Биотинилденген моноклоналды антиденелер мен стрептавидин-HRP конъюгатын ТМБ субстратымен бірге қолдану әдістің жоғары ерекшелігі мен сезімталдығына қол жеткізді. 0,5 N тұз қышқылының ерітіндісін қолдана отырып, ферментативті реакцияны тоқтату нәтижелердің нақты көрінісін қамтамасыз ете отырып, тиімділігін растады.

Әзірленген тест-жүйе блютанг диагностикасында қолдану үшін жоғары әлеуетті көрсетеді, бұл әсіресе Қазақстан жағдайында осы ауруды бақылау және алдын алу үшін маңызды. Отандық ИФТ жиынтығын енгізу импорттық аналогтарға тәуелділікті азайтуға,

диагностиканың қолжетімділігін арттыруға және елдің ветеринариялық қызметін нығайтуға мүмкіндік береді. Нәтижелер Ауыл шаруашылығын дамытудың және азық-түлік қауіпсіздігін қамтамасыз етудің стратегиялық міндеттеріне сәйкес келетін жануарлардың жұқпалы ауруларын диагностикалау әдістерін жетілдіру саласындағы одан әрі зерттеулердің маңыздылығын көрсетеді.

Әдебиеттер тізімі

1. Lundervold, M. Milner-Gulland, E.J., O'Callaghan, C.J. et al. A serological survey of ruminant livestock in Kazakhstan during post-Soviet transitions in farming and disease control // *Acta Veterinaria Scandinavica*, – 2004. – № 45. – P. 211-240.
2. Бурова О.А., Захарова О.И., Торопова Н.Н. Блютанг: эпизоотическая ситуация в мире и России (обзор литературы) // *Ветеринария*. – 2022. – № 6. – С. 8-15. DOI: 10.30896/0042-4846.2022.25.6.08-15.
3. Макаров В.В., Шоопала Д., Джупина С.И., Сухарев О.И. Блютанг и блютангоподобные болезни в начале XXI века: эпизоотологические исследования и анализ // *Вестник РУДН. Серия: Агрономия и животноводство*. – 2013. – № 1. – С. 44-60.
4. Gong QL, Wang Q, Yang XY, Li DL, Zhao B, Ge GY, Zong Y, Li JM, Leng X, Shi K, Liu F. Seroprevalence and risk factors of the bluetongue virus in cattle in China from 1988 to 2019: a comprehensive literature review and meta-analysis // *Front Vet Sci*. – 2021. – No. 7. – P. 1179.
5. Бакулов И. А. Эпизоотическая ситуация в мире по особо опасным болезням животных к концу XX-го столетия // *Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных*. – Покров, 2000. – С. 11-17.
6. Бакулов И.А., Котляров В.М. Мировая эпизоотическая ситуация по болезням диких животных: Материалы межд. научно-практ. конф., 16-18 апр. 2002 г. – Покров, 2002. – С. 5-9.
7. Zhigailov, A.V., Perfilyeva, Y.V., Maltseva, E.R., Ostapchuk, Y.O., Cherusheva, A.S., Naizabayeva, D.A., Nizkorodova, A.S., Berdygulova, Z.A., Mashzhan, A.S., Bissenbay, A.O., Kuatbekova, S.A., Koshemetov, Z.K., Abdolla, N., Skiba, Y.A., Mamadaliyev, S.M. Identification and characterization of bluetongue virus in *Culicoides* spp. and clinically healthy livestock in southeastern Kazakhstan // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. – 2022. – P. 90-91. – C. 101895. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101895.
8. Auezova GA. Hosts and trophic specialization of bloodsucking biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, Leptoconopidae) in southeastern Kazakhstan // *Russ Entomol J*. – 2008. – Vol. 17. – P.19-24.
9. Эпизоотическая ситуация: [электронный ресурс]. – 2024. – URL: <https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/> (дата обращения 11.11.2024).
10. Zaher, K.S., Ahmed, W.M. Observations on the Epidemiology of Bluetongue Disease // *Global Veterinaria*. – 2015. – T. 14, № 6. – P. 800-804.
11. Aubakirova KM. Fauna and ecology of biting midges in the high mountain pastures of the South Western Altai // *Bull Altai State Agrar Univ*. – 2017. – Vol. 10(156). – P. 92-95.
12. Lundervold M., Milner-Gulland E.J., O'Callaghan C.J., Hamblin C. First evidence of bluetongue virus in Kazakhstan // *Vet Microbiol*. – 2003. – Vol. 92(3). – P. 281-287.
13. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition – 2023 // <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>.
14. Hamblin C., Armstrong R. M., Hedger R. S. A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and mouth disease virus in epithelial tissues // *Veterinary Microbiology*. – 1984. - Vol. 9. – No. 5. – P. 435–443.
15. Ouldrige E. J., Barnett P. V., Hingley J., Rweyemamu M. M. The differentiation of foot and mouth disease virus strains using an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay saturation model // *Journal of Biological Standardization*. – 1984. – Vol. 12. – No. 4. – P. 367–377.

16. Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis // *Research in Veterinary Science*. – 1987. – Vol. 43. – No. 2. – P. 225–232.
17. Pattnaik B., Venkataramanan R. “Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of FMDV antigen” // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 1989. – Vol. 59. – P. 317–322.
18. Pattnaik B., Venkataramanan R. “A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for subtype analysis of foot-and-mouth disease virus isolate” // *Indian Journal of Animal Sciences*. – 1989. – Vol. 59. – P. 1363–1368.
19. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных // М., "Агропромиздат"- 1991. – С. 434 – 463.
20. Стратегия «Казахстан-2050», п. 3. Новые принципы социальной политики. Здоровье нации – основа нашего будущего. 10. Закон Республики Казахстан «О биологической безопасности» от 21 мая 2022 года № 122-VII. Ст. 27, п. 2, пп. 4.

References

1. Lundervold, M. Milner-Gulland, E.J., O’Callaghan, C.J. et al. A serological survey of ruminant livestock in Kazakhstan during post-Soviet transitions in farming and disease control // *Acta Veterinaria Scandinavica*, – 2004. – № 45. – P. 211-240.
2. Burova O.A., Zaharova O.I., Toropova N.N. Blyutang: epizooticheskaya situatsiya v mire i Rossii (obzor literatury) // *Veterinariya*. – 2022. – № 6. – S. 8-15. DOI: 10.30896/0042-4846.2022.25.6.08-15.
3. Makarov V.V., SHoopala D., Dzhupina S.I., Suharev O.I. Blyutang i blyutangopodobnye bolezni v nachale XXI veka: epizootologicheskie issledovaniya i analiz // *Vestnik RUDN. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo*. – 2013. – № 1. – S. 44-60.
4. Gong QL, Wang Q, Yang XY, Li DL, Zhao B, Ge GY, Zong Y, Li JM, Leng X, Shi K, Liu F. Seroprevalence and risk factors of the bluetongue virus in cattle in China from 1988 to 2019: a comprehensive literature review and meta-analysis // *Front Vet Sci*. – 2021. – No. 7. – P. 1179.
5. Bakulov I. A. Epizooticheskaya situatsiya v mire po osobo opasnym boleznym zhivotnyh k koncu XX-go stoletiya // *Diagnostika, profilaktika i mery bor’by s osobo opasnymi, ekzoticheskimi i zooantroponoznymi boleznymi zhivotnyh*. – Pokrov, 2000. – S. 11-17.
6. Bakulov I.A., Kotlyarov V.M. Mirovaya epizooticheskaya situatsiya po boleznym dikih zhivotnyh: Materialy mezhd. nauchno-prakt. konf., 16-18 apr. 2002 g. – Pokrov, 2002. – S. 5-9.
7. Zhigailov, A.V., Perfilyeva, Y.V., Maltseva, E.R., Ostapchuk, Y.O., Cherusheva, A.S., Naizabayeva, D.A., Nizkorodova, A.S., Berdygulova, Z.A., Mashzhan, A.S., Bissenbay, A.O., Kuatbekova, S.A., Koshemetov, Z.K., Abdolla, N., Skiba, Y.A., Mamadaliyev, S.M. Identification and characterization of bluetongue virus in *Culicoides* spp. and clinically healthy livestock in southeastern Kazakhstan // *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. – 2022. – P. 90-91. – S. 101895. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101895.
8. Auezova GA. Hosts and trophic specialization of bloodsucking biting midges (Diptera: Ceratopogonidae, Leptoconopidae) in southeastern Kazakhstan // *Russ Entomol J*. – 2008. – Vol. 17. – P.19-24.
9. Epizooticheskaya situatsiya: [elektronnyj resurs]. – 2024. – URL: <https://fsvps.gov.ru/jepizooticheskaja-situacija/> (data obrashcheniya 11.11.2024).
10. Zaher, K.S., Ahmed, W.M. Observations on the Epidemiology of Bluetongue Disease // *Global Veterinaria*. – 2015. – T. 14, № 6. – P. 800-804.
11. Aubakirova KM. Fauna and ecology of biting midges in the high mountain pastures of the South Western Altai // *Bull Altai State Agrar Univ*. – 2017. – Vol. 10(156). – P. 92-95.
12. Lundervold M., Milner-Gulland E.J., O’Callaghan C.J., Hamblin C. First evidence of bluetongue virus in Kazakhstan // *Vet Microbiol*. – 2003. – Vol. 92(3). – P. 281-287.
13. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition – 2023 // <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-manual-online-access/>.

14. Hamblin C., Armstrong R. M., Hedger R. S. A rapid enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of foot-and mouth disease virus in epithelial tissues // Veterinary Microbiology. – 1984. – Vol. 9. – No. 5. – P. 435–443.
15. Ouldrige E. J., Barnett P. V., Hingley J., Rweyemamu M. M. The differentiation of foot and mouth disease virus strains using an indirect sandwich enzyme-linked immunosorbent assay saturation model // Journal of Biological Standardization. – 1984. – Vol. 12. – No. 4. – P. 367–377.
16. Roeder P. L., Le Blanc Smith P. M. Detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis // Research in Veterinary Science. – 1987. – Vol. 43. – No. 2. – P. 225–232.
17. Pattnaik B., Venkataramanan R. “Indirect enzyme linked immunosorbent assay for the detection of FMDV antigen” // Indian Journal of Animal Sciences. – 1989. – Vol. 59. – P. 317–322.
18. Pattnaik B., Venkataramanan R. “A sandwich enzyme linked immunosorbent assay for subtype analysis of foot-and-mouth disease virus isolate” // Indian Journal of Animal Sciences. – 1989. – Vol. 59. – P. 1363–1368.
19. Syurin V.N., Belousova R.V., Fomina N.V. Diagnostika virusnyh boleznej zhivotnyh // M., "Agropromizdat"- 1991. – S. 434 – 463.
20. Strategiya «Kazakhstan-2050», p. 3. Novye principy social'noj politiki. Zdorov'e natsii – osnova nashego budushchego. 10. Zakon Respubliki Kazakhstan «O biologicheskoy bezopasnosti» ot 21 maya 2002 goda № 122-VII. St. 27, p. 2, pp. 4.

Б.М.Исмагамбетов^{1*}, С.Е. Шоманова¹, И.А. Ахажанова¹, З.Д. Ершебулов¹.

^{1*}ТОО «OtarBioPharm», АО «Национальный холдинг QazBioPharm»
Жамбылская область, Кордайский район, ПГТ Гвардейский, Здание 5.
080409, Казахстан

*e-mail: bekza88@mail.ru

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ПОСТАНОВКИ ИФА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ БЛЮТАНГА

Аннотация: В статье представлены результаты исследований, посвященных оптимизации условий постановки отечественного набора для иммуноферментного анализа (ИФА), разработанного для выявления специфических антител к вирусу блютанга у крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота. В работе подробно описаны ключевые этапы совершенствования методики, включая подбор условий сорбции антигена, оптимизацию концентраций реагентов, температурно-временных режимов инкубации и параметров анализа. Установлено, что оптимальная концентрация рекомбинантного антигена VP7 для сорбции составляет 5 мкг на лунку при использовании 0,05 М карбонатно-бикарбонатного буфера (КББ) и инкубации в течение 20 ± 2 ч при температуре $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Эти условия обеспечивают стабильное связывание антигена с антителами и высокую чувствительность анализа.

Оптимизация температурных режимов инкубации показала, что наиболее эффективным является проведение анализа при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, что способствует повышению скорости образования иммунных комплексов и активности фермента. Использование биотинилированных моноклональных антител и стрептавидин-HRP конъюгата в сочетании с ТМБ-субстратом позволило достичь высокой специфичности и чувствительности метода. Остановка ферментативной реакции с использованием 0,5N раствора соляной кислоты подтвердила свою эффективность, обеспечивая четкую визуализацию результатов.

Разработанная тест-система демонстрирует высокий потенциал для применения в диагностике блютанга, что особенно важно для контроля и профилактики данного заболевания в условиях Казахстана. Внедрение данного набора в ветеринарную практику не только снижает зависимость от импортных аналогов, но и укрепляет диагностические возможности страны в борьбе с особо опасными инфекционными заболеваниями животных. Полученные результаты подчеркивают значимость дальнейших исследований в области совершенствования методов диагностики инфекционных заболеваний животных, что соответствует стратегическим задачам развития сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности.

Ключевые слова: Блютанг, антиген, антитела, иммуноферментный анализ, конъюгат, тетраметилбензидин (ТМБ) субстрат, стоп-реагент.

B. Ismagambetov^{1*}, S. Shomanova¹, I. Akhazhanova¹, Z. Yershebulov¹.

^{1*}OtarBioPharm LLP, JSC National Holding QazBioPharm
Zhambyl region, Kordai district, Gvardeysky,
Building 5, 080409, Kazakhstan

*e-mail: bekza88@mail.ru

OPTIMIZATION OF ELISA CONDITIONS FOR BLUETONGUE DIAGNOSTICS

Abstract: The article presents the results of research on optimizing the conditions for setup a domestic enzyme immunoassay kit (ELISA) designed to detect specific antibodies to the bluetongue virus in cattle and small cattle. The paper describes in detail the key stages of improving the technique, including the selection of antigen sorption conditions, optimization of reagent concentrations, temperature-time incubation modes and analysis parameters. It was found that the optimal concentration of recombinant VP7 antigen for sorption is 5 micrograms per well using 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (BB) and incubation for 20 ± 2 hours at a temperature of $5 \pm 3^\circ\text{C}$. These conditions ensure stable binding of the antigen to the antibodies and high sensitivity of the analysis.

Optimization of incubation temperature regimes has shown that the most effective analysis is at $37 \pm 1^\circ \text{C}$, which helps to increase the rate of formation of immune complexes and enzyme activity. The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin-HRP conjugate in combination with a TMB substrate made it possible to achieve high specificity and sensitivity of the method. Stopping the enzymatic reaction using 0.5N hydrochloric acid solution proved its effectiveness, providing a clear visualization of the results.

The developed test system demonstrates a high potential for use in the diagnosis of bluetongue, which is especially important for the control and prevention of this disease in Kazakhstan. The introduction of this kit into veterinary practice not only reduces dependence on imported analogues, but also strengthens the country's diagnostic capabilities in the fight against particularly dangerous infectious diseases of animals. The results obtained emphasize the importance of further research in the field of improving diagnostic methods for infectious animal diseases, which corresponds to the strategic objectives of agricultural development and food security.

Keywords: *Bluetongue, antigen, antibodies, enzyme immunoassay, conjugate, tetramethylbenzidine (TMB) substrate, stop reagent.*

Авторлар туралы мәліметтер

Исмагамбетов Бекзат Миллиардович^{1*} – а.ш.ғ.м., «OtarBioPharm» жауапкершілігі шектеулі серіктестігінің Ғылыми-техникалық бөлімінің басшысы, 080409, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қ.ү.к., 67-үй, 12-пәтер, e-mail: bekza88@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4399-4725

Шоманова Сандугаш Ералиевна^{*} - «OtarBioPharm» жауапкершілігі шектеулі серіктестігінің Ғылыми-техникалық бөлімінің кіші ғылыми қызметкері, 080409, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қ.ү.к., 67-үй, 55-пәтер, e-mail: shomanova_sandugash@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-2239-2204

Ахажанова Индира Алибаевна^{*} – «OtarBioPharm» жауапкершілігі шектеулі серіктестігінің Ғылыми-техникалық бөлімінің кіші ғылыми қызметкер, 080409, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қ.ү.к., 67-үй, 51-пәтер, e-mail: indi.axazh@mail.ru, ORCID ID: 0000-0001-6938-6667

Ершебулов Закир Джапарович^{*} – PhD, «OtarBioPharm» жауапкершілігі шектеулі серіктестігінің Бас директоры, 080409, Қазақстан Республикасы, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, Гвардейский қ.ү.к., 67-үй, 25-пәтер, e-mail: ershebulov@mail.ru, ORCID: 0000-0002-4733-9971

Сведения об авторах

Исмагамбетов Бекзат Миллиардович^{1*} – магистр сельскохозяйственных наук, руководитель Научно-технического отдела; Товарищество с ограниченной ответственностью «OtarBioPharm» Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, ПГТ Гвардейский, д.67, кв. 12; e-mail: bekza88@mail.ru. ORCID ID: 0000-0002-4399-4725.

Шоманова Сандугаш Ералиевна^{*} - младший научный сотрудник Научно-технического отдела; Товарищество с ограниченной ответственностью «OtarBioPharm» Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, ПГТ Гвардейский, д.67, кв.55; e-mail: shomanova_sandugash@mail.ru. ORCID ID: 0000-0003-2239-2204.

Ахажанова Индира Алибаевна^{*} – младший научный сотрудник Научно-технического отдела; Товарищество с ограниченной ответственностью «OtarBioPharm», Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, ПГТ Гвардейский, д. 67, кв. 51; e-mail: indi.axazh@mail.ru. ORCID ID: 0000-0001-6938-6667.

Ершебулов Закир Джапарович^{*} – PhD, Генеральный директор; Товарищество с ограниченной ответственностью «OtarBioPharm», Республика Казахстан, Жамбылская область, Кордайский район, ПГТ Гвардейский, д.67, кв. 25; e-mail: ershebulov@mail.ru, ORCID: 0000-0002-4733-9971.

Information about the authors

Bekzat Ismagambetov^{1*} – master of agricultural sciences, Head of the Scientific and Technical Department of Limited Liability Partnership «OtarBioPharm», 67/12, village of Gvardeysky, Korday district, Zhambyl region, Republic of Kazakhstan, 080409, tel.: 87788154114, e-mail: bekza88@mail.ru, ORCID ID: 0000-0002-4399-4725.

Sandugash Shomanova^{*} – junior researcher of the Scientific and Technical Department of Limited Liability Partnership «OtarBioPharm», 67/55, village of Gvardeysky, Korday district, Zhambyl region, Republic of Kazakhstan, 080409, tel.: 87077119702, e-mail: shomanova_sandugash@mail.ru, ORCID ID: 0000-0003-2239-2204.

Indira Akhazhanova^{*} - junior researcher of the Scientific and Technical Department of Limited Liability Partnership «OtarBioPharm», 67/51, village of Gvardeysky, Korday district, Zhambyl region, Republic of Kazakhstan, 080409, tel.: 87758535050, e-mail: indi.axazh@mail.ru, ORCID ID: 0000-0001-6938-6667.

Zakir Yershebulov^{*} – PhD, Director General of Limited Liability Partnership «OtarBioPharm», 67/25, village of Gvardeysky, Korday district, Zhambyl region, Republic of Kazakhstan, 080409, tel.: 87788814683, e-mail: ershebulov@mail.ru, ORCID: 0000-0002-4733