



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-82-89>
УДК 619:616.98:579.882.11:616-078



Отработка режима лиофилизации гипериммунной хламидийной сыворотки

В. В. Евстифеев^{1, 2}, С. И. Яковлев¹, Ф. М. Хусаинов¹, И. Р. Акбашев¹, С. В. Садыкова¹

¹ ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия

² ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н. Э. Баумана» (ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ), ул. Сибирский Тракт, 35, г. Казань, 420029, Республика Татарстан, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Современный ареал хламидийной инфекции сельскохозяйственных и диких животных охватывает почти все континенты. В настоящее время для постановки первичного диагноза, проведения скрининговых исследований и отдельных этапов эпизоотологических обследований с целью выявления хламидионосителей в нашей стране применяют «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных». При производстве средств диагностики важной задачей является обеспечение стабильности различных компонентов тест-систем в процессе их хранения и транспортировки. Одним из путей решения этой проблемы является стабилизация различных компонентов диагностических препаратов посредством лиофилизации.

Цель исследования. Отработка режима лиофилизации специфической хламидийной сыворотки, оценка ее соответствия характеристикам, заявленным в технических условиях на контроль тест-системы, и испытание стабильности этого компонента.

Материалы и методы. Сыворотку получали из крови овец, иммунизированных эмульсионным вакцинным препаратом штамма «АМК-16» *Chlamydia psittaci*. До проведения процедуры сублимации гипериммунные сыворотки замораживали до температуры минус 60 °С. Лيوфилизацию сывороток проводили на аппарате Scientz 30F (Китай) двумя способами, различающимися температурными режимами и давлением в камере. Готовые препараты сывороток крови оценивали на соответствие техническим условиям диагностического набора. Полученные сублиматы закладывали на хранение на срок 24 мес. и исследовали в реакции связывания комплемента на протяжении этого периода.

Результаты. В ходе проведенных исследований было установлено, что наиболее эффективным оказался способ лиофилизации специфических сывороток, при котором процесс сублимации проходил при более низком давлении и наиболее высокой температуре нагрева. Оценка соответствия полученного препарата характеристикам, заявленным в технических условиях на тест-систему, показала, что качество сыворотки отвечало всем требованиям. Результаты изучения стабильности гипериммунной сыворотки продемонстрировали, что высушенный усовершенствованным способом препарат не теряет своей специфичности на протяжении 24 мес.

Заключение. В результате проведенной работы был отработан оптимальный режим лиофилизации специфической хламидийной сыворотки для диагностической тест-системы. Полученный препарат полностью соответствует характеристикам, заявленным в технических условиях на диагностикум. Установлено, что длительность хранения лиофилизированной сыворотки составляет не менее двух лет, в течение данного периода ее активность и физико-химические свойства не снижаются.

Ключевые слова: хламидиоз, *Chlamydia psittaci*, сублимация, лиофилизация, сыворотка крови, тест-система

Благодарности: Работа выполнена за счет средств ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в рамках научно-исследовательской работы по теме «Разработка диагностических наборов для диагностики вирусных и бактериальных инфекций сельскохозяйственных животных».

Для цитирования: Евстифеев В. В., Яковлев С. И., Хусаинов Ф. М., Акбашев И. Р., Садыкова С. В. Отработка режима лиофилизации гипериммунной хламидийной сыворотки. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (1): 82–89. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-82-89>

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Яковлев Сергей Игоревич, канд. вет. наук, научный сотрудник лаборатории вирусных антропоонозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», Научный городок-2, г. Казань, 420075, Республика Татарстан, Россия, arena176@rambler.ru

Optimization of freeze-drying process for anti-*Chlamydia* hyperimmune serum

Vitaliy V. Evstifeev^{1, 2}, Sergey I. Yakovlev¹, Fidail M. Khusainov¹, Ilgizar R. Akbashev¹, Svetlana V. Sadykova¹

¹ Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia

² Kazan State Academy of Veterinary Medicine named after N. E. Bauman, 35 Sibirskiy trakt str., Kazan 420029, Republic of Tatarstan, Russia

ABSTRACT

Introduction. The distribution area of *Chlamydia* infection in livestock and wild animals currently extends across almost all continents. At present, initial diagnosis, screening tests and certain stages of epizootiological investigations aimed at *Chlamydia* carrier detection are conducted in the Russian Federation using the “Antigen and Serum Kit for Serological Diagnosis of Chlamydiosis in Livestock”. It is important in the production of diagnostics to ensure stability of different test kit components during their storage and transportation. One way of addressing this issue is to stabilize diagnosticum components by freeze-drying.

© Евстифеев В. В., Яковлев С. И., Хусаинов Ф. М., Акбашев И. Р., Садыкова С. В., 2025

Objective. The study was aimed at optimization of freeze-drying process for specific anti-*Chlamydia* serum, the serum assessment for compliance with characteristics laid down in the technical specifications for the test kit control and testing of the serum for its stability.

Materials and methods. The serum was prepared using blood from sheep immunized with emulsion vaccine based on *Chlamydia psittaci* AMK-16 strain. Prior to freeze-drying, the hyperimmune sera were subjected to freezing to a temperature of minus 60 °C. The sera were freeze-dried using a Scientz 30F freeze-dryer (China). Two freeze-drying procedures with different temperature conditions and chamber pressures were applied. The resulting sera were tested for compliance with the technical specifications for the diagnostic test kit. The freeze-dried sera were put into storage for 24 months and tested with complement fixation test during this period.

Results. Based on the test results, the freeze-drying procedure employing a lower pressure and the highest heating temperature was found to be the most effective for the specific sera. The serum tests for compliance with characteristics laid down in the technical specifications for the test kit showed that the serum quality met all relevant requirements. The stability test results demonstrated that the hyperimmune serum freeze-dried using the improved procedure remains specific during 24 months.

Conclusion. The work performed allowed for optimization of freeze-drying process for specific anti-*Chlamydia* serum intended for the diagnostic test kit. The resulting serum is fully compliant with characteristics laid down in the technical specifications for the diagnosticum. It was established that the freeze-dried serum shelf life is at least two years, during this period the serum retains its activity and physico-chemical properties.

Keywords: chlamydiosis, *Chlamydia psittaci*, sublimation, freeze-drying (lyophilization), serum, test kit

Acknowledgements: The study was funded by the Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety within research activities on the topic "Development of test kits for diagnosis of viral and bacterial infections in livestock".

For citation: Evstifeev V. V., Yakovlev S. I., Khusainov F. M., Akbashev I. R., Sadykova S. V. Optimization of freeze-drying process for anti-*Chlamydia* hyperimmune serum. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (1): 82–89. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-82-89>

Conflict of interests: The authors declare no conflict of interests.

For correspondence: Sergey I. Yakovlev, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Researcher, Laboratory for Viral Anthroponoses of Animals, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchnyi gorodok-2, Kazan 420075, Republic of Tatarstan, Russia, arena176@rambler.ru

ВВЕДЕНИЕ

Хламидиоз – зооантропонозная инфекционная болезнь, этиологическим фактором которой являются грамотрицательные бактерии семейства *Chlamydiaceae* рода *Chlamydia* [1, 2, 3, 4]. Попадая в организм животного (крупный рогатый скот, овцы, свиньи, лошади, грызуны, птицы, кошки, собаки и многие другие), хламидии поражают различные его системы [5], в том числе и иммунную, что, в свою очередь, способствует последующему заражению этих животных возбудителями инфекционных заболеваний, сопутствующих хламидиозу [1]. Наложение различных клинических признаков у животных с хламидиозом и сопутствующей инфекцией на практике мешает правильной и своевременной постановке диагноза [6]. Инфекционный процесс при хламидиозе чаще протекает в хронической форме, что также препятствует своевременному выявлению инфицированных животных после заноса возбудителя в стадо [7].

Современный ареал хламидийной инфекции сельскохозяйственных и диких животных охватывает все континенты, в связи с этим проблема ее диагностики на сегодняшний день является актуальной [8, 9].

В настоящее время для постановки первичного диагноза, проведения скрининговых исследований и отдельных этапов эпизоотологических обследований с целью выявления хламидионосителей в нашей стране применяют «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (РОСС RU Д-RU. PA01.B.19342/23) [10, 11].

При производстве средств диагностики важной задачей является обеспечение стабильности биологических свойств различных компонентов тест-систем в процессе изготовления, хранения и транспортировки [12, 13]. Одним из путей решения этой проблемы

является стабилизация белковых молекул различных компонентов диагностических препаратов посредством лиофилизации [14, 15, 16].

«Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Россия) укомплектован двумя антигенами (специфическим и контрольным) и двумя видами сывороток крови животных (положительной и отрицательной к хламидийному антигену). Все компоненты набора выпускаются в лиофилизированном состоянии [10].

В процессе разработки тест-системы для каждого компонента набора подобраны специальные режимы лиофилизации, причем режим лиофилизации отрабатывается для каждого сушильного аппарата в зависимости от модели и характеристик, параметры процесса лиофильной сушки каждого компонента могут варьироваться.

В ходе обновления технической базы производственной площадки для изготовления диагностических тест-систем была закуплена камерная лиофильная сушилка Scientz 30F (Китай). Данная модель обладает более мощным вакуумным насосом и холодильным агрегатом. В результате появилась возможность сократить время сушки препаратов, сохраняя загружаемый объем серии. К тому же благодаря наличию в конструкции аппарата электронного блока управления параметрами сушки регулировка температурного режима и силы вакуума стала более точной, что позволило выставить больше контрольных точек процесса. Поэтому прежний режим сушки, используемый на устаревшем оборудовании меньшей мощности при отсутствии точного контроля параметров процесса, стал неприемлем – следовало отработать новые параметры и критерии контроля процесса лиофилизации. Научная новизна работы заключается в разработке новых

параметров лиофилизации специфической хламидийной сыворотки на новом оборудовании с сохранением заявленных в технических условиях (ТУ) характеристик.

В связи с этим целью настоящего исследования явилась отработка режима лиофилизации специфической хламидийной сыворотки, оценка ее соответствия характеристикам, заявленным в ТУ на контроль тест-системы, и испытание стабильности этого компонента.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в условиях лаборатории вирусных заболеваний животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Штамм. Для получения инактивированного антигена использовали штамм «АМК-16» *Chlamydia psittaci* с инфекционным титром $10^{-5.4}$ ЛД₅₀/0,3 мл, депонированный в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (рег. № 11 от 5 сентября 2017 г.).

Биологические модели. Культивирование хламидий для изготовления антигена осуществляли на 6–7-суточных куриных эмбрионах. Для получения гипериммунных сывороток использовали овец романовской породы в возрасте 1,5 года, живой массой 45–50 кг.

В ходе проведения экспериментальных манипуляций с животными были соблюдены требования Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях.

Тест-системы. При постановке реакции связывания комплемента (РСК) использовали «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань).

Оборудование. Сублимацию гипериммунных сывороток проводили в камерной лиофильной сушилке Scientz 30F (Китай).

Методы. Антиген для иммунизации овец готовили из инфицированных желточных оболочек эмбрионов кур, павших на 4–7-е сут после заражения, путем их гомогенизирования в фосфатно-солевом буфере (pH 7,2) в соотношении 1:9 с последующим дифференциальным центрифугированием для удаления балластных веществ, инактивации формалином и концентрации [17].

Сыворотку получали из крови овец, которых иммунизировали специфическим хламидийным антигеном, эмульгированным в оригинальном маслорасололиновом адьюванте. Антигенную активность сывороток устанавливали в РСК со специфическим хламидийным антигеном согласно ТУ 9388-020-00492374-2007.

Обескровливание овец проводили под анестезией. Взятие крови производили из яремной вены. Кровь собирали в стерильные стеклянные флаконы, внутренняя поверхность которых была смочена физиологическим раствором. Для отделения сыворотки крови флаконы с кровью помещали в термостат на 40–60 мин, после чего сгустки отделяли от стенок посуды и помещали флаконы в холодильную камеру при температуре 4 °С на 24 ч. Отделившуюся сыворотку крови декантировали от сгустков, центрифугировали при 3,5 тыс. об/мин в течение 20 мин для удаления эритроцитов и консервировали борной кислотой.

Полученные сыворотки разливали в спаренные стеклянные ампулы ОСТ 64-2-485-85 (Россия) в объеме 1,0 см³ с использованием одноканального диспенсера BioHit (Финляндия). Всего для исследования было получено три серии гипериммунных сывороток крови овец.

Все серии сыворотки были разделены на две равные части и высушены (сублимированы) при двух разных технологических режимах лиофилизации.

До проведения процедуры лиофилизации сыворотку в ампулах замораживали в камере лиофильной сушилки при температуре минус 60 °С с экспозицией 14 ч.

Лиофилизированный препарат закладывали на хранение на срок 24 мес. при температуре 18–22 °С. Каждый месяц проводили исследования высушенной гипериммунной сыворотки в РСК с целью оценки ее активности и определения срока хранения.

Антигенную активность сывороток крови до и после лиофилизации (сублимации) определяли в РСК в соответствии с «Инструкцией по применению набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных», утвержденной директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 19.05.2016 (РОСС RU Д-РУ.РА01.В.19342/23).

Реакцию ставили в объеме 1,0 см³ в пробирках Флоринского. Антиген при постановке реакции применяли в рабочей дозе, сыворотки инактивировали 30 мин и титровали путем двукратных разведений начиная с 1:5. Перед постановкой реакции проводили титрование комплемента в гемолитической системе, используя его удвоенную дозу, с целью контроля специфичности реакции применяли иммунную хламидийную и заводом отрицательную сыворотку, а также контрольный антиген. Гемолитическую систему готовили из 2,5%-й смеси отмытых эритроцитов барана и стандартной гемолитической сыворотки в двойном титре. Реакцию проводили на водяной бане при 37 °С. За диагностический титр принимали разведение сыворотки 1:10, разведение 1:5 считали сомнительным результатом [18].

Готовый препарат должен был соответствовать характеристикам, описанным в ТУ 9388-020-00492374-2007.

Полученную сыворотку оценивали по следующим показателям: внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей и плесени, массовая доля влаги, растворимость, активность и специфичность в РСК и длительность хранения.

Внешний вид, цвет и наличие посторонних примесей и плесени определяли визуально.

Для определения растворимости полученных лиофилизированных препаратов в ампулы вносили по 1,0 см³ физиологического раствора, после чего ампулы встряхивали и замеряли время полного растворения сублимированных сывороток.

Определение массовой доли влаги в лиофилизированном препарате проводили в соответствии с правилами, описанными в ГОСТ 24061-2012. Сублимированные сыворотки крови массой 0,1 г измельчали до порошкообразного состояния. Полученные пробы равномерно распределяли по дну заранее взвешенной бюксы. После взвешивания бюксы с препаратом помещали в сушильный шкаф и выдерживали при температуре 105 °С при экспозиции 60 мин. Далее препарат охлаждали и взвешивали.

Массовую долю влаги вычисляли по формуле [19]:

$$X = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M_0} \times 100,$$

где X – массовая доля влаги, %;

M_1 – масса бюксы с пробой до высушивания, г;

M_2 – масса бюксы с пробой после высушивания, г;

M_0 – масса бюксы без пробы, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследований определяли антигенную активность полученных сывороток крови овец. Все три серии сывороток реагировали в РСК с хламидийным антигеном в титре 1:160.

Далее сыворотки, разлитые в ампулы по 1,0 см³ и замороженные до температуры минус 60 °С, лиофилизировали двумя разными способами.

Показатели температурных режимов и вакуума при лиофилизации гипериммунных сывороток крови овец первым способом представлены на рисунке 1.

Данный способ лиофилизации включал в себя выдерживание сывороток крови под вакуумом в течение 26 ч при плавном понижении давления с 148 до 100 Па в первые 25 ч и до 40 Па в следующий час. Охлаждение полок осуществляли в течение первых 7 ч. Далее в течение последующих 6 ч (с 8 до 13 ч после начала сублимации) полки нагревали до температуры 0,2–0,8 °С и с 14-го по 21-й ч от начала сушки температура полок находилась в этих пределах. Полки аппарата переводили в режим нагрева (до температуры 35 °С) на 22-й ч лиофилизации. Сыворотку в таком режиме сушили еще 4 ч, пока ее температура в ампулах не достигла 25 °С.

Показатели температурных режимов и вакуума при лиофилизации гипериммунных сывороток крови овец вторым способом представлены на рисунке 2.

Отличие второго способа заключалось в том, что в 1-й ч после загрузки препарата в аппарат вакуум поддерживался на уровне 11 Па. На протяжении следующих 3 ч давление в камере аппарата плавно повышалось до 43 Па и находилось на этом уровне в течение дальнейших 5 ч. С 9-го по 11-й ч после начала сушки давление в камере повышалось до 47 Па. Начиная с 13-го и по 20-й ч процесса лиофилизации давление в камере понижалось до 2,2 Па. Охлаждение полок лиофильного аппарата длилось 1 ч. С 2-го по 9-й ч полки плавно нагревали до температуры 0,6 °С. На этом уровне температура полок находилась в течение последующих 10 ч (начиная с 10-го ч и заканчивая 20-м ч после начала сушки). В последние 2 ч сушки сыворотки полки аппарата нагревали до температуры от 1 до 54 °С, пока температура продукта в ампулах не поднималась до 25 °С.

На рисунке 3 представлены фотографии гипериммунных сывороток крови, лиофилизированных двумя вышеописанными способами.

В таблице отражены результаты оценки соответствия лиофилизированных сывороток заявленным характеристикам.

Установлено, что сублимированная первым способом сыворотка не соответствовала заявленным характеристикам. В ампуле не образовалась гомогенная

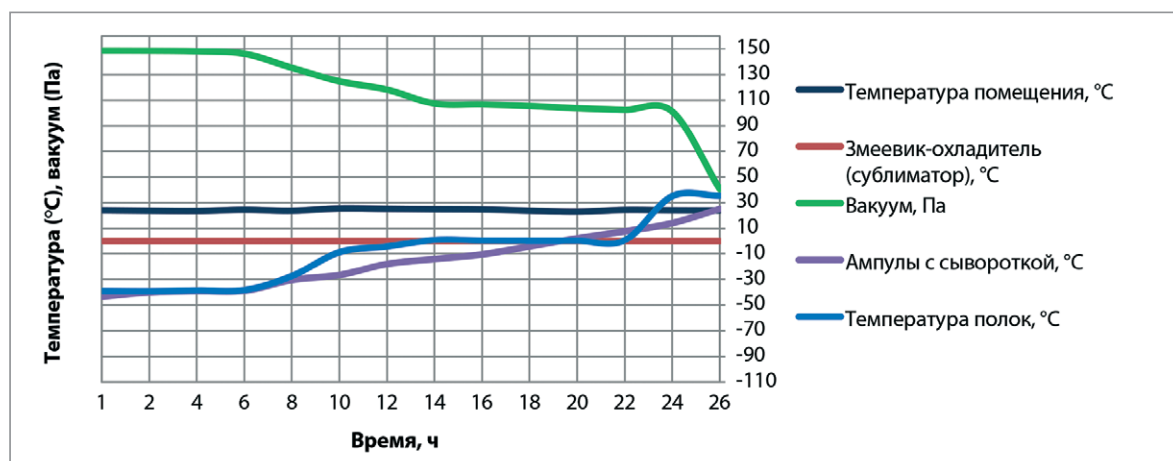


Рис. 1. Температурный режим и вакуум при лиофилизации гипериммунной сыворотки первым способом

Fig. 1. Temperature conditions and vacuum pressure during hyperimmune serum freeze-drying using procedure 1

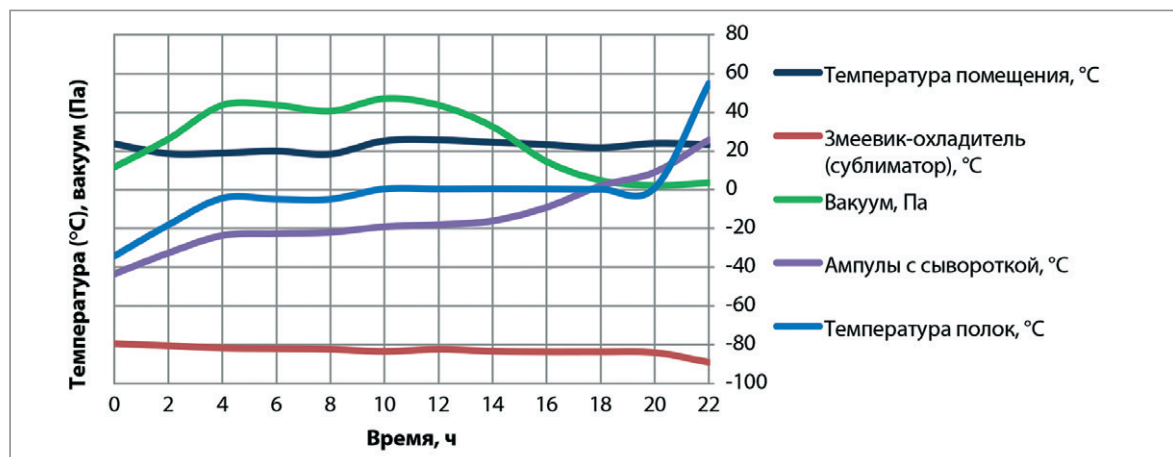


Рис. 2. Температурный режим и вакуум при лиофилизации гипериммунной сыворотки вторым способом

Fig. 2. Temperature conditions and vacuum pressure during hyperimmune serum freeze-drying using procedure 2

Таблица
Физико-химические и биологические показатели лиофилизированных хламидийных гипериммунных сывороток и их соответствие характеристикам, описанным в технических условиях

Table
Physico-chemical and biological parameters of freeze-dried anti-*Chlamydia* hyperimmune sera and their compliance with characteristics laid down in technical specifications

Наименование показателя	Требуемая характеристика сыворотки согласно ТУ 9388-020-00492374-2007	Сыворотка, сублимированная первым способом	Сыворотка, сублимированная вторым способом
Внешний вид	Сухая гомогенная аморфная масса в виде таблетки	–	+
Цвет	Светло-кремовый	+	+
Наличие посторонних примесей, плесени	Не допускается	+	+
Массовая доля влаги, % не более	4	+	+
Растворимость	Содержимое ампул должно растворяться в течение 2–5 мин в физиологическом растворе и представлять собой гомогенную взвесь	– (по истечении 10 мин остаются нерастворенные фрагменты)	+
Активность: титр в РСК не ниже	1:80	+	+
Специфичность в РСК	Должна реагировать только со специфическим хламидийным антигеном	+	+

масса в виде таблетки, и полученный препарат плохо растворялся в воде. Сыворотка, высушенная по второму способу, полностью соответствовала заявленным характеристикам.

Далее для оценки активности гипериммунной сыворотки в процессе длительного хранения использовали образец, сублимированный по второму способу.



Рис. 3. Внешний вид лиофилизированных двумя разными способами сывороток крови одной серии

Fig. 3. Appearance of sera from the same batch freeze-dried using two different procedures

Результаты оценки антигенной активности лиофилизированной хламидийной гипериммунной сыворотки в течение 24 мес. после сублимирования представлены на рисунке 4.

Выявлено, что на протяжении двух лет после лиофилизации активность гипериммунных сывороток крови овец не опускалась ниже заявленного в ТУ титра анти-тел (1:40). На 4, 12 и 21-й мес. хранения по одной сыворотке из трех прореагировали в титре 1:80, в связи с этим средний титр на данном сроке исследования был равен 1:133. В последующие месяцы все сыворотки реагировали в титре 1:160. Предположительно, снижение титра хламидийных антител на один титр, выявляемое на некоторых сроках исследования, связано с погрешностями в постановке РСК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как показывает практика, наиболее оптимальным способом консервации для длительного хранения сывороток крови является лиофилизация [20]. Ранее для сублимации специфической хламидийной сыворотки, которая является одним из компонентов

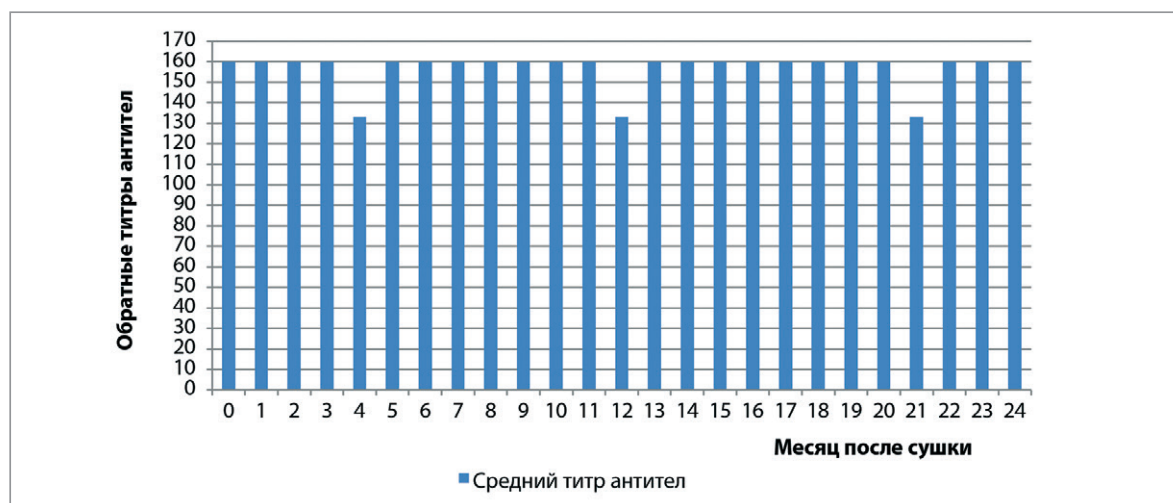


Рис. 4. Активность хламидийной гипериммунной сыворотки крови овец в процессе длительного хранения (24 мес.)

Fig. 4. Anti-*Chlamydia* hyperimmune ovine serum activity during its long-term storage (24 months)

производимого диагностического набора, нами был отработан оптимальный режим сушки для имеющегося на тот момент оборудования. Препараты, сублимированные согласно этому технологическому режиму, соответствовали характеристикам ТУ для производимой тест-системы. В ходе обновления технической базы производственной площадки была закуплена новая современная лиофильная сушилка, обладающая более мощными характеристиками, большим объемом сушильной камеры и имеющая электронный блок управления, позволяющий отслеживать и регулировать температурный режим и силу вакуума.

В настоящей работе представлены два технологических режима лиофилизирования специфической хламидийной сыворотки. Первый был максимально приближен к режиму, применяемому для сушки на старом оборудовании. Данный способ сублимации оказался не подходящим для нового оборудования. В связи с этим был разработан новый технологический режим (второй способ сублимации).

В научной литературе представлены сведения о разработке режимов сублимирования специфических сывороток и иммуноглобулинов для диагностических тест-систем. Продолжительность сушки этих препаратов находится в пределах от 24 до 30 ч [14, 16, 21, 22]. Первый способ сублимации, применяемый в работе, по времени занимал 26 ч. Технологический режим, разработанный для нового оборудования (второй способ сублимации), позволил сократить срок сушки до 22 ч, что явилось первым отличием между двумя способами.

Другое отличие – температурные режимы нагрева полок аппарата. При первом способе сублимации специфической сыворотки первые 6 ч температура полок аппарата колебалась в пределах от минус 39 до минус 38 °С. Тогда как при втором способе лиофилизации сыворотки загружали в охлажденную до температуры минус 35 °С камеру аппарата и с первого часа начинали нагрев полок сначала до температуры минус 4 °С (первые 8 ч), потом до плюс 0,5 °С (следующие 10 ч). Процесс возгонки при заданных параметрах в первом случае протекал в течение 22 ч, во втором случае – в течение 20 ч. В первом случае процесс возгонки в течение первых 6 ч после начала лиофилизации протекал слишком медленно в связи с очень низкой температурой и относительно низким вакуумом. Далее при нагреве полок вакуум на протяжении всего процесса сушки также имел достаточно низкие значения (от 135 до 101 Па на этапе сублимации), что в купе не позволило всей влаге испариться из препарата за заданный промежуток времени. Остаточная влага в процессе досушивания конденсировалась и растворила часть таблетки сублимированной сыворотки в ампуле (рис. 3). При сублимации вторым способом были подобраны оптимальный температурный режим и вакуум, которые позволили получать лиофилизированную специфическую сыворотку надлежащего качества.

В работе А. В. Комиссарова и соавт. представлены данные о корреляции времени лиофилизации сывороток крови с объемом сублимируемого препарата, которые указывают на сокращение продолжительности сушки при уменьшении объема загружаемой в аппарат сыворотки [14]. В нашем исследовании было установлено, что первый способ сублимации не позволял всей влаге возгнаться и конденсироваться на змеевике-

охладителе в установленный временной промежуток, хотя для предыдущего аппарата этот технологический режим лиофилизации являлся оптимальным. Это связано с увеличением объема сублимируемого препарата на новом оборудовании, имеющем больший объем сушильной камеры. Исходя из этого, для оптимизации процесса лиофилизации можно увеличить продолжительность охлаждения полок аппарата, что позволило бы усовершенствовать процесс сушки, но значительно увеличило бы время сублимации. Однако существует способ сокращения длительности лиофилизации различных препаратов путем подбора оптимального режима ускоренного нагревания полок аппарата в пределах минусовых температур на этапе возгонки [23]. Данный принцип был использован при втором способе лиофилизации специфической хламидийной сыворотки. Новый технологический режим сублимационного высушивания сыворотки позволил получить качественный компонент для диагностического набора в больших объемах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы был отработан оптимальный режим сублимационной сушки специфической хламидийной сыворотки для диагностической тест-системы. Полученный данным способом препарат полностью соответствует характеристикам, заявленным в ТУ 9388-020-00492374-2007 «Набора антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных».

Отличием оптимизированного технологического режима от используемого ранее явилось уменьшение времени нагрева полок аппарата в пределах минусовых температур и увеличение вакуума, что, в свою очередь, позволило сократить срок сублимации препарата и получить качественный компонент для изготовления тест-системы.

Установлено, что длительность хранения лиофилизированной сыворотки составляет не менее двух лет, а ее активность и физико-химические свойства за указанный период не снижаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федорова В. А., Ляпина А. М., Хижнякова М. А., Зайцев С. С., Салтыков Ю. В., Субботина И. А. и др. Хламидиозы животных и человека. М.: Наука; 2019. 135 с. <https://doi.org/10.7868/9785020402492>
2. Равилов Р. Х. Клинико-эпизоотологические особенности хламидиоза у сельскохозяйственных животных. *Труды ВИЭВ*. 2021; 82 (1): 174–177. <https://elibrary.ru/qmaazo>
3. Красочко П. А., Максимович В. В., Синица Н. В., Красочко П. П., Конотоп Д. С., Яромчик Я. П. и др. Хламидиоз сельскохозяйственных животных: учебно-методическое пособие. Витебск: ВГАВМ; 2020. 44 с. <https://repo.vsavm.by/handle/123456789/14804>
4. Cheong H. C., Lee C. Y. Q., Cheok Y. Y., Tan G. M. Y., Looi C. Y., Wong W. F. *Chlamydiaceae: diseases in primary hosts and zoonosis. Microorganisms*. 2019; 7 (5):146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>
5. Мустафаева Н. А., Сафарова С. А., Джумшудова Ф. А., Бабанлы Л. Т., Мамедова М. А. Хламидиоз сельскохозяйственных животных. *Прикаспийский вестник ветеринарии*. 2023; (1): 24–28. <https://elibrary.ru/vvhsy>
6. Borel N., Sachse K. Zoonotic transmission of *Chlamydia* spp.: Known for 140 years, but still underestimated. In: *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Ed. by A. Sing. Cham: Springer; 2023; 1–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85877-3_53-1
7. Caspe S. G., Hill H. Chlamydiosis in animals. *Animals*. 2024; 14 (21):3130. <https://doi.org/10.3390/ani14213130>
8. Равилов А. З., Гаффаров Х. З., Равилов Р. Х. Хламидиоз животных. Казань: Фэн АН РТ; 2004. 368 с.
9. Marti H., Jelocnik M. Animal *Chlamydiae*: A concern for human and veterinary medicine. *Pathogens*. 2022; 11 (3):364. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030364>

10. Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Хусаинова Г. И., Акбашев И. Р., Яковлев С. И. Оценка эффективности различных специфических хламидийных антигенов для серологической диагностики. *Инновационные решения актуальных вопросов безопасности: сборник материалов международной научно-практической конференции (Казань, 11–12 ноября 2021 г.)*. Казань: ФЦТРБ-ВНИВИ; 2021; 47–51. <https://elibrary.ru/cbsurg>
 11. Евстифеев В. В., Хусаинов Ф. М., Хусаинова Г. И., Акбашев И. Р., Яковлев С. И., Хамидуллина Р. З. Изучение активности компонентов набора для диагностики хламидиоза сельскохозяйственных животных после лиофилизации и длительного хранения. *Молодежная наука – развитию агропромышленного комплекса: материалы Всероссийской (национальной) научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Курск, 3–4 декабря 2020 г.)*. Часть 2. Курск: Курская ГСА имени И. И. Иванова; 2020; 476–480. <https://elibrary.ru/psgqhb>
 12. Жданова Е. В., Русанова Д. В., Семирчева А. А., Геогджаян А. С., Жарникова И. В. Контроль стабильности диагностикума эритроцитарного бруцеллезного антигенного жидкого в процессе хранения. *Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы: материалы XIII Ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням имени академика В. И. Покровского (Москва, 24–26 мая 2021 г.)*. М.: Медицинское маркетинговое агентство; 2021; 189. <https://elibrary.ru/kxkxaj>
 13. Комиссаров А. В., Бибииков Д. Н., Бадарин С. А., Синицына Н. В., Костылева Н. И., Овчинникова М. В. и др. Разработка расчетной зависимости для оценки величины потери массы при лиофилизации диагностических препаратов. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2020; 10 (3): 506–514. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514>
 14. Комиссаров А. В., Бадарин С. А., Бибииков Д. Н., Синицына Н. В., Костылева Н. И., Глазкова Е. А. и др. Совершенствование сублимационной сушки холерных диагностических сывороток в ампулах. *Бактериология*. 2023; 8 (2): 34–41. <https://elibrary.ru/hzodwc>
 15. Невская Л. В., Воропаев А. А., Фадейкина О. В., Петрова Н. Э., Капитанова В. К., Трегубова В. Е. и др. Способ получения лиофилизированной формы стандартного образца сыворотки, содержащего аллергенспецифический иммуноглобулин Е (варианты). Патент № 2802333 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/395 (2006.01), А61К 9/19 (2006.01), А61К 38/00 (2006.01). ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения». № 2022132754. Заявл. 14.12.2022. Опул. 24.08.2023. Бюл. № 24.
 16. Иванова С. В., Мельникова Л. А., Родионов А. П., Евстифеев В. В. Способ получения и хранения гипериммунной сибиреязвенной сыворотки. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 215–221. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221>
 17. Яковлев С. И. Усовершенствование средств специфической профилактики хламидиоза животных: дис. ... канд. вет. наук. М.; 2022; 87–88.
 18. Евстифеев В. В. Разработка и усовершенствование биологических препаратов для диагностики и специфической профилактики хламидиоза животных: дис. ... д-ра биол. наук. Казань; 2015. 417 с.
 19. ГОСТ 24061-2012 Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги. <https://docs.cntd.ru/document/1200103299>
 20. Fissore D., McCoy T. Editorial: Freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Frontiers in Chemistry*. 2018; 6:622. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00622>
 21. Комиссаров А. В., Овчинникова М. В., Бадарин С. А., Бибииков Д. Н., Синицына Н. В., Костылева Н. И., Плотников И. А. Экспериментальное обоснование новой формы выпуска холерных диагностических сывороток. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (4): 38–40. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40>
 22. Кочкалова Н. Н., Абрамова Е. Г., Никифоров А. К., Киреев М. Н., Лобовикова О. А., Савицкая Л. В. и др. Оптимизация формы выпуска и потребительской тары иммуноглобулина антирабического из сыворотки крови лошади. *Бюллетень ВШЦ СО РАМН*. 2012; (5-1): 236–238. <https://elibrary.ru/piwdvz>
 23. Алексеев К. В., Блынская Е. В., Тишков С. В. Теоретические и практические основы лиофилизации лекарственных препаратов: монография. М.: Типография «Миттель пресс»; 2019. 219 с.
- ## REFERENCES
1. Feodorova V. A., Lyapina A. M., Khizhnyakova M. A., Zaitsev S. S., Saltykov Yu. V., Subbotina I. A., et al. Chlamydioses in animals and humans. Moscow: Nauka; 2019. 135 p. <https://doi.org/10.7868/9785020402492> (in Russ.)
 2. Ravilov R. Kh. Kliniko-ehpizootologicheskie osobennosti khlamidioza u sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh = Clinical and epizootological features of chlamydiosis in livestock. *Proceedings of the VIEV*. 2021; 82 (1): 174–177. <https://elibrary.ru/qmaazo> (in Russ.)
 3. Krasochko P. A., Maksimovich V. V., Sinita N. V., Krasochko P. P., Konotop D. S., Yaromchik Ya. P., et al. Chlamydiosis in livestock: a study guide. Vitebsk: Vitebsk the Order of “the Badge of Honor” State Academy of Veterinary Medicine; 2020. 44 p. <https://repo.vsavm.by/handle/123456789/14804> (in Russ.)
 4. Cheong H. C., Lee C. Y. Q., Cheok Y. Y., Tan G. M. Y., Looi C. Y., Wong W. F. *Chlamydiaceae: diseases in primary hosts and zoonosis. Microorganisms*. 2019; 7 (5):146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>
 5. Mustafayeva N. A., Safarova S. A., Dzhumshudova F. A., Babanly L. T., Mammadova M. A. Chlamydiosis of agricultural animals. *Prikspijskij vestnik veterinarii*. 2023; (1): 24–28. <https://elibrary.ru/lvvhsy> (in Russ.)
 6. Borel N., Sachse K. Zoonotic transmission of *Chlamydia* spp.: Known for 140 years, but still underestimated. In: *Zoonoses: Infections Affecting Humans and Animals*. Ed. by A. Sing. Cham: Springer; 2023; 1–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-85877-3_53-1
 7. Caspe S. G., Hill H. Chlamydiosis in animals. *Animals*. 2024; 14 (21):3130. <https://doi.org/10.3390/ani14213130>
 8. Ravilov A. Z., Gaffarov H. Z., Ravilov R. H. Chlamydiosis in animals. Kazan: Feng Publishing House of the Academy of Sciences of the Republic of Tatarstan; 2004. 368 p. (in Russ.)
 9. Marti H., Jelocnik M. Animal *Chlamydiae*: A concern for human and veterinary medicine. *Pathogens*. 2022; 11 (3):364. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030364>
 10. Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Khusainova G. I., Akbashev I. R., Yakovlev S. I. Otsenka effektivnosti razlichnykh spetsificheskikh khlamidinykh antigenov dlya serologicheskoi diagnostiki = Evaluation of various specific *Chlamydia* antigens intended for serological diagnosis for their effectiveness. *Innovatsionnye resheniya aktual'nykh voprosov bezopasnosti: sbornik materialov mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii (Kazan, 11–12 noyabrya 2021 g.) = Innovative solutions to topical safety issues: proceedings of the International Research-to-Practice Conference (Kazan, 11–12 November 2021)*. Kazan: Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; 2021; 47–51. <https://elibrary.ru/ikekgw> (in Russ.)
 11. Evstifeev V. V., Khusainov F. M., Khusainova G. I., Akbashev I. R., Yakovlev S. I., Khamidullina R. Z. Activity and specificity of lyophilized antigens and sera for serological diagnosis of *Chlamydia*. *Molodezhnaya nauka – razvitiyu agropromyshlennogo kompleksa: materialy Vserossiiskoi (natsional'noi) nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh (Kursk, 3–4 dekabrya 2020 g.)*. Chast' 2 = Early career researchers – for the development of agroindustry: proceedings of the All-Russia (National) Research-to-Practice Conference of Students, Postgraduate Students and Early Career Researchers (Kursk, 3–4 December 2020). Part 2. Kursk: Kursk State Agricultural Academy; 2020; 476–480. <https://elibrary.ru/psgqhb> (in Russ.)
 12. Zhdanova E. V., Rusanova D. V., Semircheva A. A., Geogdjayan A. S., Zharnikova I. V. Kontrol' stabil'nosti diagnostikuma eritrotsitarnogo brutselleznogo antigenennogo zhidkogo v protsesse khraneniya = Storage stability tests of liquid erythrocyte brucellosis diagnosticum. *Infektsionnye bolezni v sovremennom mire: evolyutsiya, tekushchie i budushchie ugrozy: materialy XIII Ezhegodnogo vserossiiskogo kongressa po infektsionnym boleznyam imeni akademika V. I. Pokrovskogo (Moskva, 24–26 maya 2021 g.) = Infectious diseases in the world today: evolution, current and future threats: proceedings of the XIII Annual All-Russia Congress on Infectious Diseases named after Academician V. I. Pokrovsky (Moscow, 24–26 May 2021)*. Moscow: Meditsinskoe marketingovoe agentstvo; 2021; 189. <https://elibrary.ru/kxkxaj> (in Russ.)
 13. Komissarov A. V., Bibikov D. N., Badarin S. A., Sinityna N. V., Kostyleva N. I., Ovchinnikova M. V., et al. Calculation of dependences for estimating the amount of weight loss during lyophilization of diagnostic preparations. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2020; 10 (3): 506–514. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2020-10-3-506-514> (in Russ.)
 14. Komissarov A. V., Badarin S. A., Bibikov D. N., Sinityna N. V., Kostyleva N. I., Glazkova E. A., et al. Improvement freeze-drying of diagnostic cholera sera in ampoules. *Bacteriology*. 2023; 8 (2): 34–41. <https://elibrary.ru/hzodwc> (in Russ.)
 15. Nevskaya L. V., Voropaev A. A., Fadeikina O. V., Petrova N. E., Kapitanova V. K., Tregubova V. E., et al. Method of obtaining lyophilized form of serum reference sample containing allergen-specific immunoglobulin E (versions). Patent No. 2802333 C1 Russian Federation, Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01), A61K 9/19 (2006.01), A61K 38/00 (2006.01). Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products' of the Ministry of Health of the Russian Federation. No. 2022132754. Date of filing: 14.12.2022. Date of publication: 24.08.2023. Bull. No. 24. (in Russ.)
 16. Ivanova S. V., Melnikova L. A., Rodionov A. P., Evstifeev V. V. Method of obtaining and storing hyperimmune anthrax serum. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 215–221. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-215-221>

17. Yakovlev S. I. Improvement of tools for specific prevention of chlamydiosis in animals: Author's thesis for degree of Cand. Sci. (Veterinary Medicine). Moscow; 2022; 87–88. (in Russ.)

18. Evstifeev V. V. Development and improvement of biologicals for diagnosis and specific prevention of chlamydiosis in animals: Author's thesis for degree of Dr. Sci. (Biology). Kazan; 2015. 417 p. (in Russ.)

19. GOST 24061-2012 Medicine remedies biological lyophilized for veterinary use. Method for determination mass moisture. <https://docs.cntd.ru/document/1200103299> (in Russ.)

20. Fissore D., McCoy T. Editorial: Freeze-drying and process analytical technology for pharmaceuticals. *Frontiers in Chemistry*. 2018; 6:622. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00622>

21. Komissarov A. V., Ovchinnikova M. V., Badarin S. A., Bibikov D. N., Sinitsyna N. V., Kostyleva N. I., Plotnikov I. A. Experimental substantiation

of new presentation form of cholera diagnostic sera. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2017; (4): 38–40. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-4-38-40> (in Russ.)

22. Kochkalova N. N., Abramova E. G., Nikiforov A. K., Kireyev M. N., Lobovikova O. A., Savitskaya L. V., et al. Optimization of presentation and consumer container of anti-rabies immunoglobulin obtained from horse serum. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of the Academy of Medical Sciences*. 2012; (5-1): 236–238. <https://elibrary.ru/piwdvz> (in Russ.)

23. Alekseev K. V., Blynskaya E. V., Tishkov S. V. Theory and practice of medicinal product freeze-drying: a monograph. Moscow: Printing House "Mittel Press"; 2019. 219 p.

Поступила в редакцию / Received 22.10.2024

Поступила после рецензирования / Revised 15.01.2025

Принята к публикации / Accepted 10.02.2025

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Евстифеев Виталий Валерьевич, д-р биол. наук, доцент, главный научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, vit.evstifeev@yandex.ru

Яковлев Сергей Игоревич, канд. вет. наук, научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4944-6559>, arena176@rambler.ru

Хусаинов Фидайль Миннигалеевич, д-р вет. наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных антропозоонозов животных, ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3101-7740>, fidail63@mail.ru

Акбашев Ильгизар Расилович, канд. вет. наук, научный сотрудник лаборатории вирусных заболеваний животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8587-3713>, akbashev92@mail.ru

Садыкова Светлана Васильевна, младший научный сотрудник лаборатории вирусных заболеваний животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань, Республика Татарстан, Россия; <https://orcid.org/0009-0004-8301-851X>, ssadykova51@gmail.com

Vitaliy V. Evstifeev, Dr. Sci. (Biology), Associate Professor, Chief Researcher, Laboratory for Viral Anthrozooses of Animals, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9882-3475>, vit.evstifeev@yandex.ru

Sergey I. Yakovlev, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Researcher, Laboratory for Viral Anthrozooses of Animals, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4944-6559>, arena176@rambler.ru

Fidail M. Khusainov, Dr. Sci. (Veterinary Medicine), Associate Professor, Leading Researcher, Laboratory for Viral Anthrozooses of Animals, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3101-7740>, fidail63@mail.ru

Ilgizar R. Akbashev, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Researcher, Laboratory for Animal Viral Diseases, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8587-3713>, akbashev92@mail.ru

Svetlana V. Sadykova, Junior Researcher, Laboratory for Animal Viral Diseases, Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Republic of Tatarstan, Russia; <https://orcid.org/0009-0004-8301-851X>, ssadykova51@gmail.com

Вклад авторов: Евстифеев В. В. – подготовка и редактирование текста, утверждение окончательного варианта; Яковлев С. И. – проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Хусаинов Ф. М. – формулировка ключевых целей и задач; Акбашев И. Р. – проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных; Садыкова С. В. – проведение исследований, анализ и интерпретация полученных данных.

Contribution of the authors: Evstifeev V. V. – text preparation and editing, approval of the final version; Yakovlev S. I. – conducting tests, data analysis and interpretation, text preparation and editing; Khusainov F. M. – formulation of overarching goals and aims; Akbashev I. R. – conducting tests, data analysis and interpretation; Sadykova S. V. – conducting tests, data analysis and interpretation.