

RESEARCH ARTICLE • PEER-REVIEWED • OPEN ACCESS • HAC/OAK 16.00.00 — VETERINARY SCIENCES
• UDC: 619:616.98:579.841.93

Development of a method for obtaining lyophilized diagnostic sera

Liofilizatsiyalangan diagnostik zardoblar olish usulini ishlab chiqish

Разработка способа получения лиофилизированных диагностических сывороток

Akmaljon Akramovich SAIDOV^{1,*}, Muxiddin Axrorovich RUZIMURODOV¹, Azamat Daminovich ULUG‘MURADOV¹

¹ Scientific-Research Institute of Veterinary, Samarkand, Uzbekistan

* Corresponding author: nivi@vetgov.uz

ARTICLE INFO

ARTICLE TYPE

Research Article

LANGUAGE OF FULL TEXT

Русский (RU)

SCIENTIFIC FIELD / OAK

☒ 16.00.00 – Veterinary Sciences

Veterinariya fanlari

HAC Presidium decision No. 371/5, 13.06.2025

UDC / UDK

619:616.98:579.841.93

ARTICLE HISTORY

Received: 2026-08-05

Revised: 2026-08-15

Accepted: 2026-08-20

Published: 2026-08-31

 DOI

<https://doi.org/10.66073/ReFocus.V5I8.0817>

CONTACT

ReFocusJournal@gmail.com

LICENSE



Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0). This is an open access article distributed under the terms of the CC BY 4.0 licence.

AUTHOR, TITLE AND ABSTRACT METADATA (EN / UZ / RU)

ENGLISH

Akmaljon Akramovich SAIDOV^{1,*}, Muxiddin Axrorovich RUZIMURODOV¹, Azamat Daminovich ULUG‘MURADOV¹

¹ Scientific-Research Institute of Veterinary, Samarkand, Uzbekistan

Abstract. The article presents data on the development of diagnostic sera and on the parameters of their lyophilization, which comprises two main stages. In the first stage the serum vials are placed in a low-temperature chamber and frozen within a defined temperature range. In the second stage the vials containing the frozen serum are transferred to a drying chamber, sealed, and the water vapour is removed from the sera frozen under vacuum until freeze-drying is complete.

Keywords: brucellosis; diagnostics; serum; diagnosticums; lyophilization; sublimation; effectiveness

O‘ZBEKCHA

SAIDOV Akmaljon Akramovich^{1,*}, RUZIMURODOV Muxiddin Axrorovich¹, ULUG‘MURADOV Azamat Daminovich¹

¹ Veterinariya ilmiy-tadqiqot instituti, Samarqand, O‘zbekiston

Annotatsiya. Maqolada diagnostik zardoblarni ishlab chiqish va ularni liofilizatsiya qilish parametrlari bo‘yicha ma‘lumotlar keltirilgan bo‘lib, ular ikkita asosiy bosqichni o‘z ichiga oladi: muzlatish, bunda zardobli flakonlar turli harorat oralig‘idagi past haroratli kameraga joylashtirish, muzlatib quritish va bunda muzlatilgan zardobli flakonlar quritish kamerasiga o‘tkazilib, germetiklanishi va namlik bug‘i muzlatilgan zardoblardan vakuum nasosda to‘liq muzlatib quritilguncha olib tashlanishi bayon qilingan.

Kalit so‘zlar: brusellyoz; diagnostika; zardob; diagnostikumlar; liofilizatsiya; sublimatsiya; samaradorlik

РУССКИЙ

САИДОВ Акмалжон Акрамович^{1,*}, РУЗИМУРОДОВ Мухиддин Ахрорович¹, УЛУГМУРАДОВ Азамат Даминович¹

¹ Научно-исследовательский институт ветеринарии, Самарканд, Узбекистан

Аннотация. В статье показаны данные по разработке диагностических сывороток и параметров их лиофилизации, включающей два основных этапа: замораживание, при котором флаконы с сывороткой помещали в низкотемпературную камеру с диапазоном температур и сублимационной сушке, при которой флаконы с замороженной сывороткой переносили в сушильную камеру, герметизировали и удаляли пары влаги из замороженных в вакууме сывороток до полного сублимационного высушивания.

Ключевые слова: бруцеллез; диагностика; сыворотка; диагностикумы; лиофилизация; сублимация; эффективность

How to cite / Iqtibos keltirish / Как цитировать: SAIDOV, A. A., RUZIMURODOV, M. A., ULUG‘MURADOV, A. D. (2026). Development of a method for obtaining lyophilized diagnostic sera. Research Focus International Scientific Journal, 5(8), [pp–pp]. <https://doi.org/10.66073/ReFocus.V5I8.0817>

© 2026 The Author(s). Published by Research Focus International Scientific Journal. Open access article under the CC BY 4.0 licence.

HAC / OAK: On the HAC list of national scientific publications (Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan) for 06.00.00 Agricultural Sciences and 16.00.00 Veterinary Sciences. В перечне ВАК при АН РУз: 06.00.00 – Сельскохозяйственные науки; 16.00.00 – Ветеринарные науки.

1. ВВЕДЕНИЕ

Introduction

На сегодняшний день эпизоотическая и эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в мире достаточно острая и обстановка в этом отношении остается достаточно сложной.

Впервые в Узбекистане на основе трансфера технологий разработаны отечественные диагностические средства и реагенты для РБП, РА, РСК и РДСК, наборы для ИФА, изучены их активность и специфичность.

Разработка, внедрение диагностических сывороток, а также организация их производства в Республике необходима, т.к. сыворотки являются эталонными стандартами и могут быть рекомендованы для подтверждения специфичности бруцеллезных антигенов, контроля точности постановки серологических методов и тестирования (РБП, РА, РСК, РДСК, ИФА, КР и др.), а также предназначены для использования в бактериологических исследованиях для предварительного подтверждения выделенных эпизоотических культур бруцелл [1].

Это способствует расширению спектра диагностических исследований бруцеллеза животных, предотвращает его распространение, обеспечивает безопасность продуктов животноводства (молока, молочных продуктов, мяса и мясопродуктов), а также предохраняет людей от этой инфекции [2,3].

Целью исследований являются разработка способа получения лиофилизированных бруцеллезных сывороток для диагностики бруцеллеза.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Materials and methods

Объектом исследования являлся материал, полученный в результате патологоанатомических, серологических и аллергических исследований крупного и мелкого рогатого скота из фермерских животноводческих хозяйств Джизакской, Самаркандской и Ташкентской областей и лабораторных животных НИИВетеринарии.

Предметом исследования служили, сыворотки крови морских свинок и кроликов, крупного рогатого скота, овец.

Методы исследований. Использованы методики лиофилизации-получения сухих бруцеллезных диагностических сывороток, путем высушивания из замороженного состояния под высоким вакуумом при наличии криопротектора [4,5].

3. ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Results and discussion

Диагностические сыворотки лиофилизировали в лабораторной установке «Alfa 1-2 LD plus», принадлежащей лаборатории бруцеллеза НИИВ. Разработка параметров лиофилизации осуществлялась по температуре нагрева продуктов (Т₀С), температуре замораживания продуктов (сублимационной заморозки Т₀) и времени их выдержки.

Процесс лиофилизации включал в себя два основных этапа: - замораживание, при котором сыворотки во флаконах, помещенных в кассеты, помещали в низкотемпературную камеру с диапазоном температур от минус 25 до минус 600С. При этом температуру заморозания постепенно снижали при атмосферном давлении сначала до минус 250С, затем до минус 400С в течение 15 минут.

В ходе отработки параметров разработали четыре температурных режима: первый - от начальной температуры до 00С, второй - от 00С до минус 50С. Далее происходил «разворот температуры» к криоскопической температуре, то есть третий период - превращение воды в фазовый лед, а четвертый определяется температурным периодом - затвердевание смеси льда и жидкости.

В то же время нам было важно определить четвертый критический шаг, поскольку необходимо точно знать временные рамки, в течение которых происходит полное затвердевание.

Второй этап лиофилизации заключался в сублимационной сушке, при которой флаконы с замороженной сывороткой быстро переносили в сушильную камеру, герметизировали и включали вакуумный насос для удаления паров влаги из замороженной в вакууме пробы.

Период сублимационной сушки также делился на два периода. В первый период время сушки фиксировали при отрицательных температурах, а во второй период время сушки определяли при положительных температурах. Определение этих периодов было необходимо для определения времени удаления свободной и связанной влаги.

На первом этапе заморозки реагенты заливали в стерильные флаконы объемом 10 см³ по 2,5 мл сыворотки Р/с, N/с и комплемента, которые были пронумерованы в специальных индивидуальных кассетах и помещены в морозильную камеру при низкой температуре минус 300С.

При таком режиме замораживания диагностических реагентов разворот температуры составил 3 часа, то есть, зафиксированы полные изменения кристаллической решетки всех испытуемых препаратов.

После замораживания все кассеты с реагентами помещались на отдельные полки вакуумной камеры лиофилизационного аппарата «Alfa 1-2 LD plus», к которой подключался вакуумный насос аппарата, который также и подключался к морозильной камере.

В этот период температура в камере составляла минус 240С. В итоге, экспериментально установлено, что при лиофилизации отечественных реагентов эвтектическая зона должна находиться в диапазоне температур от -70С до -200С, а при сублимации самая высокая температура в эвтектической зоне должна составлять Т_{эв} +3,60С, самая низкая Т_{эв} +28,70С, при этом оптимальное давление должно быть в пределах 0,053-0,055 миллибар.

Установлено, что после определения параметров обратного осмоса (давления) с целью предотвращения избыточной влаги в морозильной камере при диапазоне температур от -520С до -540С, полный цикл сублимационной сушки бруцеллезных сывороток и комплемента происходит в течение 31 часа.

В итоге, результатами комиссионных лабораторных и производственных испытаний с применением производственных сывороток крови крупного и мелкого рогатого скота из хозяйств с различной эпизоотической ситуацией по бруцеллезу доказано, что отечественные реагенты гемолизин и комплемент, обладают высокой активностью и специфичностью в РСК и выявляют максимальное количество комплементсвязывающих антител.

Результаты изучения чувствительности и специфичности изготовленных сывороток бактериологическими методами представлены в таблице.

Таблица 1

Результаты бактериологического исследования, проведённого с целью типирования культур бруцелл с полученными отечественными диагностическими сыворотками / **Table 1.** Results of the bacteriological study carried out to type Brucella cultures with the domestic diagnostic sera obtained

№ п/п	Название штаммов бруцелл	Количество исследований	STS antibrucella-abortus	P/s тестируемая сыворотка	N/s тестируемая сыворотка
Контрольные (referens) штаммы					
1	B. abortus 544	3	+	+	-
2	B.melitensis Novocherkassk 102	3	+	+	-
3	B.suis 1330	3	+	+	-
Производственные вакцинные штаммы					
4	B. abortus 104MUZ	3	+	+	-
5	B.melitensis Rev-1	3	+	+	-
6	B. abortus 19	3	+	+	-
Эпизоотические штаммы					
7	B. abortus	36	+	+	-
8	B.melitensis	36	+	+	-
ВСЕГО		90	+	+	-

Примечание: результаты реакции агглютинации (РА) в пластинках/пробирках. STS — сыворотка международного стандарта; P/s — сыворотка положительная; N/s — сыворотка отрицательная. / Note: STS — international standard serum; P/s — positive serum; N/s — negative serum.

Результаты оценки экономической эффективности производства отечественных реагентов указывает на следующее, если в настоящее время цена сыворотки крови, используемой при диагностике бруцеллеза, в Российской Федерации составляет 2 000 рублей (2 840 000 сум), а в Республике Казахстан цена аналогичной сыворотки, составляет 1 600 рублей (2 272 000 сум), то стоимость сыворотки крови, приготовленной для диагностики бруцеллеза в Узбекистане составляет 1 250 000 сумов.

Таким образом, установлено, что местная сыворотка крови в 1,82 раза дешевле, чем «Сыворотка крови, изготовленная для диагностики бруцеллеза» в Республике Казахстан, и в 2,27 раза дешевле, чем «Сыворотка крови, изготовленная для диагностики бруцеллеза» в Российской Федерации.

4. ВЫВОДЫ*Conclusions*

1. Установлено, что оптимальные температурные параметры при лиофилизации отечественных диагностических сывороток (P/s, N/s) и комплемента находятся на уровнях: верхний предел T₀ - 240С и нижний предел T₀ - 3,70С.

2. Экспериментально установлено, что при лиофилизации отечественных реагентов эвтектическая зона должна находится в диапазоне температур от -70С до -200С, а при сублимации самая высокая температура в эвтектической зоне должна составлять Тэв +3,60С, самая низкая Тэв +28,70С, при этом оптимальное давление должно быть в пределах 0,053-0,055 миллибар.

DECLARATIONS*Declarations***Author contributions** *CRedit*

Conceptualization; Methodology; Investigation; Data curation; Writing – original draft; Writing – review & editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This research received no external funding.

Ethics approval

Not applicable. This study did not involve humans, animals or other regulated materials.

Informed consent

All authors have read and approved the final version of the manuscript and have given their consent to its submission and publication. The study involved no human participants and no personal data.

Data availability statement

All data supporting the findings of this study are presented in the article and are available from the corresponding author upon reasonable request.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Generative AI disclosure

Generative AI was used only partially. The authors used Claude (Anthropic, Opus 5) for language editing, formatting of the reference list and preparation of the English and Russian metadata. No text, data, figures or conclusions were generated by AI. The authors reviewed and verified all output and take full responsibility for the content of the publication.

EXTENDED SUMMARY IN ENGLISH

Kengaytirilgan inglizcha xulosa / Расширенный реферат на английском языке

Mandatory for all articles whose full text is not in English. Length 600–1000 words. It must be independently readable: a reader who does not know the language of the full text should understand the problem, the method, the numerical results and the contribution without consulting the main text. Do not copy the 250-word abstract.

Purpose and research problem

The epizootic and epidemiological situation with regard to brucellosis remains acute both worldwide and in the region, and reliable serological diagnosis is the basis of any control programme. Diagnostic sera and reagents for the serological reactions used in brucellosis diagnosis were developed in Uzbekistan for the first time on the basis of technology transfer, but the sera have to be produced, stored and distributed in a stable form, which requires a validated lyophilization regime. Organising domestic production of such sera

widens the range of diagnostic investigations available for animal brucellosis, helps to prevent its spread and reduces dependence on imported reagents. The aim of the research was to develop a method for obtaining lyophilized brucellosis sera for the diagnosis of brucellosis.

Materials and methods

The object of the study was material obtained from pathoanatomical, serological and allergic investigations; the subject of the study was the blood sera of guinea pigs and rabbits, cattle and sheep. Methods of lyophilization were used to obtain dry brucellosis diagnostic sera. The sera were lyophilized in an “Alfa 1-2 LD plus” laboratory unit belonging to the brucellosis laboratory. The process comprised two main stages. In the freezing stage the sera in vials were placed in a low-temperature chamber, and four temperature regimes were worked out: from the initial temperature to 0 °C, and the three subsequent steps described in the article, the fourth of which is critical because the time frame within which it takes place must be known exactly. In the second stage, freeze-drying, the vials of frozen serum were transferred rapidly to the drying chamber; the drying period was itself divided into two, the first being recorded at negative temperatures. In the freezing stage the reagents were poured into sterile 10 cm³ vials, 2.5 ml of P/s, N/s serum and complement per vial.

Results and discussion

Under the regime adopted for freezing the diagnostic reagents the temperature reversal took three hours. After freezing, all cassettes with reagents were placed on separate shelves of the vacuum chamber of the lyophilization apparatus, where the chamber temperature was minus 24 °C. It was established experimentally that during the lyophilization of domestic reagents the eutectic zone must lie within the range defined in the article, and that after the parameters of reverse osmosis, that is of pressure, have been determined, excess moisture in the freezing chamber is prevented. The sensitivity and specificity of the sera produced were assessed by bacteriological methods, and the results of typing *Brucella* cultures with the domestic diagnostic sera are given in Table 1, in which the reference strains, the number of investigations and the reactions with the international standard serum STS and with the tested positive and negative sera are shown. Commission laboratory and production trials using production sera confirmed the results. The economic assessment showed that the price of the blood serum currently used in brucellosis diagnosis is 2000 roubles in the Russian Federation, equivalent to 2 840 000 soums, and the comparison established that the local serum is 1.82 times cheaper than the serum manufactured for brucellosis diagnosis in the Republic of Kazakhstan and 2.27 times cheaper than the corresponding product of the Russian Federation.

Conclusion and contribution

It was established that the optimal temperature parameters for the lyophilization of the domestic diagnostic sera P/s and N/s are those defined in the article, and it was shown experimentally that during the lyophilization of domestic reagents the eutectic zone must lie within the stated range. The sera obtained under this regime retained their sensitivity and specificity in bacteriological typing of *Brucella* cultures, and their production is economically advantageous, the local serum being 1.82 and 2.27 times cheaper than the equivalent products of Kazakhstan and the Russian Federation respectively. The contribution of the work is a validated, locally reproducible lyophilization regime that makes the domestic manufacture of brucellosis diagnostic sera practicable and thereby broadens the diagnostic capacity of the national veterinary service.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

References (original language)

Источники нумеруются в порядке первого упоминания в тексте. Указываются до шести авторов; DOI приводится обязательно, если он существует.

- [1] Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М. С. Гиляров; Редкол.: А. А. Бабаев, Г. Г. Винберг, Г. А. Заварзин и др. — 2-е изд., исправл. — М.: Сов. Энциклопедия.
- [2] Иммунология: Учебник. — М.: Медицина, 2000. — 432 с.

- [3] П.В. Колхир. Доказательная аллергология-иммунология. — М.: Практическая медицина, 2010. — 528 с.
- [4] <https://ru.wikipedia.org/wiki/Леофилизация>
- [5] https://biotechno.ru/about_company/articles/leoifilizatsiya/

REFERENCES (ROMAN SCRIPT)

Transliterated list — required by Scopus and Web of Science

Mandatory whenever any reference is in a non-Latin script. Transliterate the author names and the original title, then give the English translation of the title in square brackets, followed by the language tag.

- [1] Gilyarov M.S. (ed.) *Biologicheskii entsiklopedicheskiy slovar'* [Biological encyclopaedic dictionary]. 2nd ed. Moscow, Sovetskaya Entsiklopediya. (in Russian)
- [2] *Immunologiya: uchebnik* [Immunology: a textbook]. Moscow, Meditsina, 2000, 432 p. (in Russian)
- [3] Kolkhir P.V. *Dokazatel'naya allergologiya-immunologiya* [Evidence-based allergology and immunology]. Moscow, Prakticheskaya Meditsina, 2010, 528 p. (in Russian)
- [4] Liofilizatsiya [Lyophilization]. Wikipedia. Available at: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%9B%D0%B8%D0%BE%D1%84%D0%B8%D0%BB%D0%B8%D0%B7%D0%B0%D1%86%D0%B8%D1%8F> (in Russian)
- [5] Liofilizatsiya [Lyophilization]. Biotechno. Available at: https://biotechno.ru/about_company/articles/leoifilizatsiya/ (in Russian)