

УДК 619:615:57.084.1
МРНТИ 68.41.63

DOI 10.52578/2305-9397-2024-4-1-163-172

Майлыбаева А. М., магистр ветеринарных наук, научный сотрудник, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-4722-0495>

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт.Гвардейский, ул. Б. Момышулы 15, 080409, Казахстан, a.mailybayeva@biosafety.kz

Рыскельдинова Ш. Ж., магистр биологии, ведущий научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0002-9578-5140>

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт.Гвардейский, ул. Б. Момышулы 15, 080409, Казахстан, sh.ryskeldinova@biosafety.kz

Кожамкулов Е. М., магистр биологии, старший научный сотрудник, <https://orcid.org/0000-0003-4105-2889>

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт.Гвардейский, ул. Б. Момышулы 15, 080409, Казахстан, e.kozhamkulov@biosafety.kz

Асанжанова Н. Н., к.м.н., заведующий лабораторией, <https://orcid.org/0000-0001-7267-3931>

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт.Гвардейский, ул. Б. Момышулы 15, 080409, Казахстан, n.assanzhanova@biosafety.kz

Табынов К. К., профессор, <https://orcid.org/0000-0001-5823-1280>

Международный центр вакцинологии Казахского национального аграрного университета (КазНАИУ), Алматы, Казахстан, tabynov_81@mail.ru

Mailybayeva A. M., Master of Veterinary Science, researcher, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0002-4722-0495>

RSE «Scientific Research Institute of Biological Safety Problems», v. Gvardeysky, st. B. Momyshuly 15, 080409, Kazakhstan, a.mailybayeva@biosafety.kz

Ryskeldinova Sh. Zh., Master of Biology, leading researcher, <https://orcid.org/0000-0002-9578-5140>

RSE«Scientific Research Institute of Biological Safety Problems», v. Gvardeysky, st. B. Momyshuly 15, 080409, Kazakhstan, sh.ryskeldinova@biosafety.kz

Kozhamkulov E. M., Master of Biology, senior researcher, <https://orcid.org/0000-0003-4105-2889>

RSE«Scientific Research Institute of Biological Safety Problems», v. Gvardeysky, st. B. Momyshuly 15, 080409, Kazakhstan, e.kozhamkulov@biosafety.kz

Asanzhanova N. N., candidate of medical sciences, Head of Laboratory, <https://orcid.org/0000-0001-7267-3931>

RSE «Scientific Research Institute of Biological Safety Problems», v. Gvardeysky, st. B. Momyshuly 15, 080409, Kazakhstan, n.assanzhanova@biosafety.kz

Tabynov K. K., professor, <https://orcid.org/0000-0001-5823-1280>

International Center for Vaccinology, Kazakh National Agrarian University (KazNAIU), Almaty, Kazakhstan, tabynov_81@mail.ru

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ КОМПЛЕКСНЫХ СТАБИЛИЗИРУЮЩИХ СРЕД ДЛЯ
ГРИППОЗНЫХ ВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ БРУЦЕЛЛЕЗНЫЕ
АНТИГЕНЫ
SELECTION OF OPTIMAL COMPLEX STABILIZING MEDIA FOR INFLUENZA VIRAL
VECTORS EXPRESSING BRUCELLOSIS ANTIGENS**

Аннотация

В данной статье приведены результаты по выбору стабилизирующих сред для лиофилизации и хранения гриппозных вирусных векторов, экспрессирующих бруцеллезные антигены. В связи с этим в данной работе рассмотрены четыре стабилизирующих сред, состоящих из: пептон (6 %) с лактозой (3 %); пептон (6 %) с сахарозой (3 %); пептон (6 %) с трегалозой (3 %), пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %). Соотношение вирусодержащих материалов и стабилизатора составляло 1:1, с последующим добавлением 500000 ЕД пеницилина и стрептомицина 0,5 г на 1 л смеси. Сохраняемость рекомбинантных

штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены, содержащих различные стабилизирующие составы, оценивали по уровню биологической активности вирусов, после их лиофилизации и хранении в различных температурно-временных режимах.

Стабилизирующие среды обладают значительным протективным действием к рекомбинантным штаммам вируса гриппа А, экспрессирующим бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD в процессе лиофилизации. При лиофилизации вирусных векторов пептон (6 %) с лактозой (3 %), пептон (6 %) с сахарозой (3 %) оказали наилучшее защитное действие. При температуре хранения ($37,0 \pm 0,5$) °C в течение 20 сут лучшая сохраняемость рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD наблюдалась в образцах вакцин с защитной средой пептон (6 %) с сахарозой (3 %), при этом снижение инфекционной активности составило от 1,83 до 2,00 log₁₀ ЭИД₅₀/см³.

В результате проведенных исследований установлено, что комплексная среда, состоящая из пептона-сахарозы в конечной концентрации 6 % и 3 % соответственно, являются эффективными стабилизаторами при лиофилизации и хранении гриппозных вирусных векторов.

ANNOTATION

This article presents the results on the selection of stabilizing media for lyophilization and storage of influenza viral vectors expressing brucellosis antigens. In this regard, we observe four stabilizing media consisting of: peptone (6%) with lactose (3%); peptone (6%) with sucrose (3%); peptone (6%) with trehalose (3%), peptone (6%) with sucrose (3%) and gelatin (0.5 %). The ratio of virus-containing materials and stabilizer was 1:1, followed by the addition of 500,000 units of penicillin and streptomycin 0.5 g per 1 liter of the mixture. The persistence of recombinant strains of influenza A virus expressing brucellosis antigens containing various stabilizing compounds was assessed by the level of biological activity of viruses after their lyophilization and storage in various temperature and time regimes.

Stabilizing media have a significant protective effect against recombinant strains of influenza A virus expressing brucellosis antigens Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD during lyophilization. During lyophilization of viral vectors, peptone (6%) with lactose (3%), peptone (6%) with sucrose (3%) had the best protective effect. At a storage temperature (37.0 ± 0.5) °C for 20 days, the best preservation of recombinant strains of influenza A virus expressing brucellosis antigens Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD was observed in samples of vaccines with the protective medium peptone (6%) with sucrose (3%), while the decrease in infectious activity ranged from 1.83 to 2.00 lg₁₀ EID₅₀/cm³.

The research undertaken showed that a complex medium consisting of peptone sucrose in a final concentration of 6% and 3%, respectively, are effective stabilizers during lyophilization and storage of influenza viral vectors.

Ключевые слова: стабилизирующая среда, пептон, сахароза, бруцеллезные антигены, *B.mellitensis*, бруцеллез.

Key words: stabilizing medium, peptone, sucrose, brucellosis antigens, *B.mellitensis*, brucellosis.

Введение. Бруцеллез – распространенное хроническое инфекционное заболевание, вызванное грамотрицательными коккобациллами рода *Brucella*. В настоящее время известно 12 видов этих бактерий, которые могут поражать различных хозяев. При диагностике бруцеллеза наиболее важным является определение специфичности хозяина [1]. Козы и овцы являются предпочтительными хозяевами для *Brucella melitensis*, тогда как бараны – для *Brucella ovis*, хотя мелкие домашние жвачные животные могут быть инфицированы другими видами *Brucella* [2]. В особенности вспышка болезни среди сельскохозяйственных животных, приводит к экономическим убыткам, вызывающей аборты и бесплодие, снижением продуктивности. По

этим причинам необходимо использовать эффективную вакцину для животных, чтобы в первую очередь предотвратить заболевание.

Борьба с эндемическим бруцеллезом достижима путем массовой вакцинации животных, хотя это сопряжено со многими трудностями из-за значительных недостатков существующих вакцин. Все вакцины являются живыми и они обладают остаточной вирулентностью у животных и могут вызывать аборт. Поэтому для решения проблемы бруцеллеза необходимо разработать безопасную и эффективную вакцину против *Brucella melitensis*.

При разработке вакцины, важнейшую роль играет сохранение ее высокой иммунологической эффективности. Сохранение биологических свойств вирусов при проведении процесса лиофилизации во многом зависит от компонентов искусственной среды, которые применяются для защиты вирусодержащего материала [3].

В многочисленных научно-производственных центрах по всему миру проводятся исследования, направленные на стабилизацию вируса для последующего использования в производстве живой вакцины. В процессе этой стабилизации применяются различные методы, оказывающие протективное действие как при лиофилизации, так и в условиях различных температур хранения. Основным принципом, на который ориентируются исследователи, является сохранение биологической активности вируса [4-8].

С целью осуществления процесса высушивания вирусодержащего материала, в настоящее время используются различные составы защитной среды. При проведении исследований, исходя из научных публикаций, на первых этапах определялось защитное действие как однокомпонентных, так и комплексных составов защитных сред в процессе лиофилизации.

Цель данного исследования заключалась в определении оптимального состава защитной среды для гриппозных вирусных векторов, экспрессирующих бруцеллезные антигены.

Материалы и методы исследований. В работе использовались гриппозные вирусные векторы Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-SOD и стабилизирующие защитные среды пептон (6 %) с лактозой (3 %); пептон (6 %) с сахарозой (3 %); пептон (6 %) с трегалозой (3 %), пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %).

Культивирование гриппозных вирусных векторов.

Культивирование гриппозных вирусных векторов проводили на 10 сут куриных эмбрионах, инфицируя их в аллантоисную полость в объеме 0,2 мл. Для этого эмбрионы помещали вертикально тупым концом вверх и в скорлупе эмбрионов на 3-4 мм выше границы воздушной камеры пробойником делали отверстие диаметром 1-2 мм. Через это отверстие шприцом с иглой вводили вирусодержащий материал параллельно продольной оси на глубину 10-12 мм. После инъекции вирусодержащего материала иглу извлекали, а отверстие в скорлупе закрывали каплей расплавленного стерильного парафина или кусочком лейкопластыря.

Инфицированные РКЭ инкубировали при температуре $(32,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $55 \pm 5\%$ в течение 48 час. Овоскопирование инфицированных РКЭ проводили через 24 часа после заражения. Гибель эмбрионов в течение этого срока считали неспецифической и утилизировали. РКЭ по истечении 48 ч инкубации помещали на охлаждение при температуре $(2-4)^\circ\text{C}$ в течение 16-18 ч. После охлаждения ножницами убрали скорлупу в области воздушной камеры, удаляли подскорлуповую оболочку и вскрывали хориоаллантоисную оболочку РКЭ. Пипеткой отбирали аллантоисную жидкость (АЖ) в стерильные флаконы. Из каждого флакона отбирали пробы АЖ в объеме 5-6 мл для проверки на контаминацию бактериальной и грибковой микрофлорой и для определения инфекционной и гемагглютинирующей активности.

Определение инфекционной активности гриппозных вирусных векторов.

Определение инфекционной активности гриппозных вирусных векторов проводили методом титрования в РКЭ 10-11 сут возраста. В десять пробирок вносили по $4,5\text{ см}^3$ физиологического раствора, затем в первую из них добавляли $0,5\text{ см}^3$ исходного материала, получая разведение вирусного вектора 1:10 (10^{-1}). Пипетку заменяли стерильной и из первой пробирки переносили во вторую $0,5\text{ см}^3$, получая разведение вирусных векторов 1:100 (10^{-2}) и

т.д. до разведения 1:1000000000 (10^{-10}) в десятой пробирке. Каждым разведением вирусного вектора, начиная с наибольшего (10^{-10}), заражали по 4 РКЭ в аллантоисную полость по 0,2 см³. В качестве контроля использовали 4 РКЭ с той же партии, в которые инокулировали по 0,2 см³ только физиологического раствора. Инфицированные РКЭ инкубировали при температуре $(34,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха $(55 \pm 5) \%$ в течение 48 час. РКЭ, погибшие в течение 24 час после заражения выбраковывали и утилизировали, в дальнейшем овоскопирование эмбрионов проводили через каждые 3-4 часа. Погибшие эмбрионы помещали на охлаждение при температуре $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$. После окончания срока инкубирования оставшиеся живыми эмбрионы также помещали на охлаждение при вышеуказанной температуре. Учет результатов титрования проводили по методу Рида и Менча и выражали в логарифмах ЭИД₅₀/см³.

Определение гемагглютинирующей активности гриппозных вирусных векторов.

Готовили двукратные разведения гриппозного вирусного вектора, начиная с 1:2 до 1:4096 на стерильном физиологическом растворе. С этой целью в лунки планшета наливали по 0,05 мл физиологического раствора. Далее в первую лунку вносили 0,05 мл испытуемого вирусного вектора и переносили пипеткой последовательно из первой лунки во вторую и т.д. Затем во все лунки добавляли по 0,05 мл 1 % взвеси эритроцитов, встряхивали и через 15 - 20 мин учитывали результаты реакции.

Выбора оптимальных стабилизирующих сред использованы следующие стабилизирующие среды в конечных концентрациях: пептон (6 %) с лактозой (3 %); пептон (6 %) с сахарозой (3 %); пептон (6 %) с трегалозой (3 %), пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %).

Лиофилизация вирусодержащих материалов. Для лиофилизации к вирусодержащей жидкости добавляли стабилизирующую среду в соотношении 1:1, пенициллин 500000 ЕД и стрептомицин 0,5 г на 1 дм³ смеси. Содержимое сосуда тщательно перемешивали и полученную смесь разливали по 1 см³ в стерильные ампулы и высушивали на сублимационной установке «Usifrua» при отработанных для такого состава вакцинных жидкостей параметрах лиофилизации. Общая продолжительность технологического процесса (замораживание, сублимация и досушивание) составила от 40 до 60 ч в зависимости от состава среды высушивания и применяемого технологического режима.

Наличие вакуума. Наличие вакуума в ампулах определяли согласно ГОСТ 28083-89 с помощью аппарата типа «Д Арсонваль». Массовую долю влаги, которая быть не более 3%, определяли по ГОСТ 24061-89.

Результаты и их обсуждение. Учитывая географическое разнообразие Республики Казахстан, наличие отдаленных пунктов животноводства и связанные с ними проблемы доставки вакцин в экстремальных температурных условиях, для разработки векторной вакцины против бруцеллеза МРС на основе рекомбинантных штаммов, предоставляется возможность использования оптимальной стабилизирующей среды, состоящей из комбинации пептона и сахарозы, чтобы обеспечить максимальную сохраняемость вируса гриппа А, включающего бруцеллезные антигены.

Надежность и стабильность сухих биопрепаратов обеспечивается использованием эффективных защитных средств и стабилизаторов в процессе их приготовления. Эти вещества играют ключевую роль в предотвращении повреждения микроорганизмов во время замораживания, обезвоживания и длительного хранения в сухом состоянии при различных температурах.

На начальном этапе исследования определяли защитное действие различных добавок для гриппозных вирусных векторов в процессе лиофилизации. По разнице показателей инфекционной активности исходных и лиофилизированных материалов судили о защитном эффекте испытанных сред. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что все испытанные стабилизирующие среды обладают значительным протективным действием к рекомбинантным штаммам вируса гриппа А, экспрессирующим бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD в процессе лиофилизации. При лиофилизации

вирусных векторов пептон (6 %) с лактозой (3 %), пептон (6 %) с сахарозой (3 %) оказали наилучшее защитное действие.

Таблица 1 – Протективный эффект разных стабилизирующих сред на сохраняемость рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены в процессе лиофилизации

Наименование штамма	Стабилизирующие среды	Инфекционная активность, $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см ³		
		Исходная	После лиофилизации	Снижение титра
Flu-NS1-124-Omp16	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$6,95 \pm 0,22$	$6,53 \pm 0,08$	0,42
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$6,95 \pm 0,22$	$6,62 \pm 0,22$	0,33
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$6,95 \pm 0,22$	$6,53 \pm 0,14$	0,42
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$6,95 \pm 0,22$	$6,37 \pm 0,30$	0,58
	Без защитной среды (контроль)	$6,95 \pm 0,22$	$5,37 \pm 0,17$	1,58
Flu-NS1-124-L7/L12	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$7,95 \pm 0,14$	$7,37 \pm 0,08$	0,58
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$7,95 \pm 0,14$	$7,70 \pm 0,22$	0,25
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$7,95 \pm 0,14$	$7,62 \pm 0,14$	0,33
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$7,95 \pm 0,14$	$7,28 \pm 0,30$	0,67
	Без защитной среды (контроль)	$7,95 \pm 0,14$	$6,28 \pm 0,08$	1,67
Flu-NS1-124-Omp19	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$7,03 \pm 0,30$	$6,62 \pm 0,08$	0,41
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$7,03 \pm 0,30$	$6,70 \pm 0,14$	0,33
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$7,03 \pm 0,30$	$6,53 \pm 0,30$	0,50
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$7,03 \pm 0,30$	$6,28 \pm 0,08$	0,75
	Без защитной среды (контроль)	$7,03 \pm 0,30$	$5,28 \pm 0,22$	1,75
Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$6,70 \pm 0,08$	$6,37 \pm 0,08$	0,33
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$6,70 \pm 0,08$	$6,45 \pm 0,14$	0,25
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$6,70 \pm 0,08$	$6,28 \pm 0,30$	0,42
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$6,70 \pm 0,08$	$6,03 \pm 0,22$	0,67
	Без защитной среды (контроль)	$6,70 \pm 0,08$	$5,03 \pm 0,08$	1,67

Протективные возможности пептона (6 %) с лактозой (3 %) и пептона (6 %) с сахарозой (3 %), пептона (6%) с трегалозой (3%) примерно одинаковые, при этом снижение инфекционной активности в результате замораживания и лиофилизации составляло в пределах от 0,25 до 0,58 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³. Наименьшими защитными свойствами обладал пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %); титр вируса снижался до 0,58 и 0,67 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³. Наибольшее снижение инфекционной активности отмечалось в образцах вакцины без защитной среды (от 1,58 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³ до 1,75 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³). Все испытанные среды обеспечивали хороший товарный вид препаратов при лиофилизации.

В последующих опытах определяли устойчивость лиофилизированных образцов с комплексными стабилизирующими средами при воздействии температуры ($37,0 \pm 0,5$) °С. Для этого пробы выдерживали в термостате при указанной температуре в течение 10 сут и 20 сут, после чего по снижению инфекционной активности вируса судили об эффективности использованных протективных сред. Результаты опытов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Влияние разных защитных сред на сохраняемость гриппозных вирусных векторов при температуре хранения ($37,0 \pm 0,5$) °C

Наименование штамма	Стабилизирующие среды	Инфекционная активность, $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см ³				
		Исходная	Через 10 сут	Снижение титра	Через 20 сут	Снижение титра
Flu-NS1-124-Omp16	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$6,53 \pm 0,08$	$5,28 \pm 0,22$	1,25	$4,45 \pm 0,14$	2,08
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$6,62 \pm 0,22$	$5,37 \pm 0,30$	1,25	$4,70 \pm 0,22$	1,92
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$6,53 \pm 0,14$	$5,12 \pm 0,14$	1,41	$4,37 \pm 0,14$	2,16
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$6,37 \pm 0,30$	$5,03 \pm 0,08$	1,34	$4,12 \pm 0,08$	2,25
	Без защитной среды (контроль)	$5,37 \pm 0,17$	0,00	5,37	0,00	5,37
Flu-NS1-124-L7/L12	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$7,37 \pm 0,08$	$6,03 \pm 0,08$	1,34	$5,12 \pm 0,22$	2,25
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$7,70 \pm 0,22$	$6,53 \pm 0,14$	1,17	$5,87 \pm 0,08$	1,83
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$7,62 \pm 0,14$	$6,12 \pm 0,30$	1,50	$5,28 \pm 0,14$	2,34
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$7,28 \pm 0,30$	$5,70 \pm 0,08$	1,58	$4,87 \pm 0,17$	2,41
	Без защитной среды (контроль)	$6,28 \pm 0,08$	$1,45 \pm 0,22$	4,83	0,00	6,28
Flu-NS1-124-Omp19	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$6,62 \pm 0,08$	$5,20 \pm 0,14$	1,42	$4,45 \pm 0,08$	2,17
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$6,70 \pm 0,14$	$5,37 \pm 0,08$	1,33	$4,70 \pm 0,22$	2,00
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$6,53 \pm 0,30$	$5,12 \pm 0,22$	1,41	$4,28 \pm 0,08$	2,25
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$6,28 \pm 0,08$	$4,78 \pm 0,08$	1,50	$3,95 \pm 0,14$	2,33
	Без защитной среды (контроль)	$5,28 \pm 0,22$	0,00	5,28	0,00	5,28
Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD	Пептон (6 %) с лактозой (3 %)	$6,37 \pm 0,08$	$5,03 \pm 0,22$	1,34	$4,37 \pm 0,08$	2,00
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %)	$6,45 \pm 0,14$	$5,20 \pm 0,14$	1,25	$4,53 \pm 0,22$	1,92
	Пептон (6 %) с трегалозой (3 %)	$6,28 \pm 0,30$	$4,87 \pm 0,30$	1,41	$4,20 \pm 0,14$	2,08
	Пептон (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %)	$6,03 \pm 0,22$	$4,53 \pm 0,08$	1,50	$3,78 \pm 0,30$	2,25
	Без защитной среды	$5,03 \pm 0,08$	0,00	5,03	0,00	5,03

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что при температуре хранения ($37,0 \pm 0,5$) °C в течение 20 сут лучшая сохраняемость рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-

124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD наблюдалась в образцах вакцин с защитной средой пептон (6 %) с сахарозой (3 %), при этом снижение инфекционной активности составило от 1,83 до 2,00 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³. Стабилизирующий эффект пептона (6 %) с лактозой (3 %), пептона (6 %) с трегалозой (3 %) и пептона (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %) тоже был значителен, снижение инфекционной активности вирусных векторов в образцах вакцин с этими стабилизирующими средами при хранении в экстремальной температуре составило от 2,08 до 2,41 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³. На 10 и 20 сут образцы вирусных конструкций без защитной среды (контроль) полностью инактивировались.

Согласно литературным данным [9-13] и результатам предварительных исследований [14-18] по использованию защитных сред в Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности (НИИПББ) проверены протективные возможности пептона (6 %) с лактозой (3 %); пептона (6 %) с сахарозой (3 %); пептона (6 %) с сахарозой (3 %) и желатином (0,5 %). По результатам исследований установлено, что все испытанные стабилизирующие среды оказывают значительный протективный эффект при лиофилизации и хранении вакцин при температуре 37 °С. Однако наилучшие результаты сохраняемости вируса получены при использовании пептона (6 %) с сахарозой (3 %), при этом снижение инфекционной активности после лиофилизации от 0,25 до 0,42 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³, после хранения при 37 °С в течение 20 дней от 1,17 до 1,33 $\log_{10}$ ЭИД₅₀/см³. Учитывая результаты исследования в качестве стабилизирующей среды для рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-SOD выбрана стабилизирующая среда, содержащая 6 % пептон с 3 % сахарозой.

Устойчивость лиофилизированных вирусных препаратов при хранении является одним из важных моментов в технологической цепи [9, 11, 19]. В доступной нам литературе мы не встречали данных об устойчивости лиофилизированных и нативных вирусных конструкций при разных температурно - временных условиях хранения. Векторная вакцина против *B. melitensis* разрабатывается впервые и процесс транспортировки и хранения при температурах (4 °С, 20 °С, 37 °С) и (минус - 20 °С, - 40 °С, - 80 °С) вызывает определенную научную и практическую ценность. Анализ полученных данных показал, что устойчивость лиофилизированных гриппозных вирусных векторов при различных температурах хранения совпадает с уровнем устойчивости других рекомбинантных штаммов вируса гриппа, полученных в НИИПББ [20], добавленные стабилизирующие среды обеспечивали существенную защиту инфекционной активности вакцины, позволяя хранить и использовать без существенного снижения активности при температурах 4 °С и минус (- 20; -70) °С в течение 3 мес. Опыты по устойчивости векторной вакцины против *B. melitensis* при разных температурных временных режимах хранения согласуются с данными других авторов [11-13,19].

Закключение. В результате исследования, проведенного с целью определения оптимальной стабилизирующей среды для рекомбинантных штаммов вируса гриппа А, экспрессирующих бруцеллезные антигены Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19 и Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD, была выбрана комплексная среда. Эксперименты показали, что при лиофилизации и последующем хранении при температуре 37 °С наиболее эффективной оказалась смесь пептона (6 %) с сахарозой (3 %). Данная комбинация компонентов значительно способствовала сохранению стабильности и активности вирусных антигенов в условиях стресса, вызванного высокой температурой.

Тщательный анализ показал, что пептон обеспечивает необходимое питание и аминокислоты для поддержания жизнеспособности клеток, в то время как сахароза выступает в роли стабилизационной молекулы, позволяющей минимизировать повреждения клеточных структур в процессе лиофилизации. Результаты исследования открывают новые горизонты в разработке вакцин и диагностики заболеваний, связанных с вирусом гриппа, подчеркивая важность выбора подходящей среды для сохранения их функциональности на протяжении длительного времени.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам лабораторий «Профилактика инфекционных болезней» оказанную помощь при выполнении научно-исследовательской работы по теме статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Rajendhran J. Genomic insights into Brucella [Text] / Rajendhran J //Infection, Genetics and Evolution. – 2021. - №87. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104635.
- 2 Rossetti C.A., Comparative Review of Brucellosis in Small Domestic Ruminants [Text] / Rossetti C.A [and etc.] // Front. Vet. Sci. – 2022. - №9. doi: 10.3389/fvets.2022.887671
- 3 Мазурина М.Г. Защитная среда для лиофилизации вируса инфекционного бронхита кур [Текст] / Мазурина М.Г // Ветеринария. - 1980. - №5. - С.40.
- 4 Phillips G.O., Harmor R., Wedlock D.I. Study of water binding in lyophilized viral vaccine systems [Text]/ Phillips G.O. [and etc.] // Cryobiology. -1981. – №18. –P.414-419.
- 5 Suzuki M. Protectants in the freeze-drying and the preservation of vaccinia virus [Text] /Suzuki M.// Cryobiology. -1973. –V.10. – P. 435-439.
- 6 Опарин Ю.Г. Поиск оптимальных методов лиофилизации [Текст] /Опарин Ю.Г. и др// Биотехнологии. – 1996. -№ 7. – С. 3-13.
- 7 Литвяков С.А. Отработка оптимальной защитной среды для лиофилизации и хранения вирус вакцины против инфекционной бурсальной болезни птиц [Текст] /Литвяков С.А. и др// Вирусные болезни сельскохозяйственных животных. Тезисы и докладов Всероссийской научно-практической конференции. Владимир. – 1995. – С.11-14.
- 8 Хрипунов Е.М. Комплексные защитные среды при лиофилизации вакцины против чумы плотоядных [Текст] / Хрипунов Е.М., Савукова В.Я. и др. // Ветеринария. – 2009. - №1 – С.52-55.
- 9 Алиева А. Б. Разработка режима замораживания и высушивания биологических препаратов [Текст] /Алиева А. Б. и др.// Биобезопасность и биотехнология. – 2021. - №8. – С.25-30.
- 10 Кобатов А.К. Сублимационное высушивание вирусных препаратов [Текст] /Кобатов А.К. и др.//Архив ветеринарных наук. – 1998.
- 11 Мазурина М.Г. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания - высушивания биологических препаратов [Текст]/Мазурина М.Г. и др.// Москва. – 1981. – С.34.
- 12 Никитин Е.Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов [Текст]/ Никитин Е.Е. и др.//Москва. – Колос. – 1971. – С.343.
- 13 Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения [Текст]/Файбич М.М.//Микробиологии эпидемиологии и иммунологии. – 1968. – С.59-66
- 14 Tabynov K. Prime-booster vaccination of cattle with an influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces a long-term protective immune response against Brucella abortus infection [Text]/Tabynov K. [and etc.]//Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – P. 438-444.
- 15 Tabynov K. An influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces good cross-protection against Brucella melitensis infection in pregnant heifers [Text]/ Tabynov K. [and etc.]//Vaccine. – 2015. – Vol. 33 (31). – P. 3619-23.
- 16 Tabynov K. First evaluation of an influenza viral vector based Brucella abortus vaccine in sheep and goats: Assessment of safety, immunogenicity and protective efficacy against Brucella melitensis infection [Text] /Tabynov K.//Vet Microbiol. – 2016. – Vol. 197. – P. 15-20.
- 17 Tabynov K. The safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine [Text] /Tabynov K. [and etc.]// Aust Vet J. – 2014. – Vol. 92 (11). – P. 450-457.
- 18 Mailybayeva A. Improved influenza viral vector based Brucella abortus vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against Brucella melitensis infection in pregnant sheep and goats [Text] /Mailybayeva A., [and etc.]//PLoS One. – 2017. – Vol. 12(10). – P. 0186484.
- 19 Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов [Текст] /Долинов К.Е.// Москва. - 1969. – С. 231.
- 20 Кожамкулов Е.М. Подбор оптимальных стабилизирующих сред для лиофилизации и хранения холодоадаптированного штамма А/НК/Otar/6:2/2010 (H3N8) [Текст] /Кожамкулов Е.М. и др.//Матер. науч.-практ. конф. молод. Учен. «Актуальные проблемы и перспективы биологической безопасности» - Гвардейский. - 2012. – С. 87-93.

REFERENCES

- 1 Rajendhran J. Genomic insights into Brucella [Text] / Rajendhran J //Infection, Genetics and Evolution. – 2021. - №87. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104635.

- 2 Rossetti C.A., Comparative Review of Brucellosis in Small Domestic Ruminants [Text] / Rossetti C.A [and etc.] // Front. Vet. Sci. – 2022. - №9. doi: 10.3389/fvets.2022.887671
- 3 Mazurina M.G. Protective medium for lyophilization of chicken infectious bronchitis virus [Text] / Mazurina M.G. // Veterinary medicine. - 1980. - No. 5. - P.40.
- 4 Phillips G.O., Horror R., Wedloch D.I. Study of water binding in lyophilized viral vaccine systems [Text]/ Phillips G.O. [and etc.] // Cryobiology. -1981. – №18. –P.414-419.
- 5 Suzuki M. Protectants in the freeze-drying and the preservation of vaccinia virus [Text] /Suzuki M.// Cryobiology. -1973. –V.10. – P. 435-439.
- 6 Oparin Yu.G. Search for optimal methods of lyophilization [Text] / Oparin Yu.G. [and etc.] // Biotechnology. – 1996. -No. 7. – P. 3-13.
- 7 Litvyakov S.A. Development of an optimal protective environment for lyophilization and storage of vaccine virus against infectious bursal disease of birds [Text] / Litvyakov S.A. [and etc.]// Viral diseases of farm animals. Theses and reports of the All-Russian Scientific and Practical Conference. Vladimir. – 1995. – P.11-14.
- 8 Khripunov E.M. Complex protective media for lyophilization of canine distemper vaccine [Text] / Khripunov E.M. [and etc.]// Veterinary medicine. – 2009. - No. 1 – P.52-55.
- 9 Alieva A. B. Development of a regime for freezing and drying biological preparations [Text] /Alieva A. B. [and etc.]// Biosafety and biotechnology. – 2021. - No. 8. – P.25-30.
- 10 Kobatov A.K. Freeze-drying of viral preparations [Text] / Kobatov A.K. [and etc.]//Archive of Veterinary Sciences. – 1998.
- 11 Mazurina M.G. Methodological recommendations for the development of freezing and drying regimes for biological preparations [Text]/Mazurina M.G. [and etc.]// Moscow. – 1981. – P.34.
- 12 Nikitin E.E. Freezing and drying of biological preparations [Text]/ Nikitin E.E. [and etc.]//Moscow. - Kolos. – 1971. – P.343.
- 13 Faibich M.M. Stabilization of vaccine preparations during drying and storage [Text]/Faibich M.M.//Microbiology of epidemiology and immunology. – 1968. – P.59-66
- 14 Tabynov K. Prime-booster vaccination of cattle with an influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces a long-term protective immune response against Brucella abortus infection [Text]/Tabynov K. [and etc.]//Vaccine. – 2016. – Vol. 34. – P. 438-444.
- 15 Tabynov K. An influenza viral vector Brucella abortus vaccine induces good cross-protection against Brucella melitensis infection in pregnant heifers [Text]/ Tabynov K. [and etc.]//Vaccine. – 2015. – Vol. 33 (31). – P. 3619-23.
- 16 Tabynov K. First evaluation of an influenza viral vector based Brucella abortus vaccine in sheep and goats: Assessment of safety, immunogenicity and protective efficacy against Brucella melitensis infection [Text] /Tabynov K.//Vet Microbiol. – 2016. – Vol. 197. – P. 15-20.
- 17 Tabynov K. The safety and immunogenicity of a novel cold-adapted modified-live equine influenza virus vaccine [Text] /Tabynov K. [and etc.]// Aust Vet J. – 2014. – Vol. 92 (11). – P. 450-457.
- 18 Mailybayeva A. Improved influenza viral vector based Brucella abortus vaccine induces robust B and T-cell responses and protection against Brucella melitensis infection in pregnant sheep and goats [Text] /Mailybayeva A., [and etc.]//PLoS One. – 2017. – Vol. 12(10). – P. 0186484.
- 19 Dolinov K.E. Fundamentals of the technology of dry biological products [Text] / Dolinov K.E.// Moscow. - 1969. – C. 231.
- 20 Kozhamkulov E.M. Selection of optimal stabilizing media for lyophilization and storage of cold-adapted strain A/HK/Otar/6:2/2010 (H3N8) [Text] / Kozhamkulov E.M. [and etc.]// Mater. scientific-practical conf. young Scientist “Current problems and prospects for biological safety” - Gvardeisky. - 2012. – P. 87-93.

ТҮЙІН

Бұл мақалада бруцеллез антигендерін экспрессиялаушы тұмау вирустық векторларын лиофилизациялау және сақтау үшін тұрақтандырғыш ортаны таңдау нәтижелері келтірілген. Осыған байланысты біз төрт тұрақтандырғыш ортаны қарастырамыз: лактозасы (3 %) бар пептон (6 %); сахарозасы (3 %) бар пептон (6 %); трегалозасы (3 %) бар пептон (6 %), сахарозасы (3 %) бар пептон (6 %) және желатині (0,5 %) бар. Құрамында вирусы бар материалдар мен тұрақтандырғыштың арақатынасы 1:1 болды, содан кейін қоспаның 1 литріне 500000 бірлік пеницилин мен стрептомицин 0,5 г қосылды. Құрамында әртүрлі тұрақтандырғыш құрамдары

бар бруцеллезді антигендерді экспрессиялайтын А тұмауы вирусының рекомбинантты штамдарының сақталуы вирустардың биологиялық белсенділік деңгейі бойынша, олар лиофилизацияланғаннан және әртүрлі температура-уақыт режимдерінде сақталғаннан кейін бағаланды.

Тұрақтандырғыш орталар лиофилизация процесінде Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD бруцеллез антигендерін экспрессиялайтын А тұмауы вирусының рекомбинантты штамдарына айтарлықтай протективті әсер етеді. Вирустық векторларды лиофилизациялау кезінде лактозасы (3 %) бар пептон (6 %), сахарозасы (3 %) бар пептон (6 %) ең жақсы қорғаныс әсерін көрсетті. 20 күн ішінде ($37,0 \pm 0,5$) °C сақтау температурасы Flu-NS1-124-Omp16, Flu-NS1-124-L7/L12, Flu-NS1-124-Omp19, Flu-NS1-124-Cu-Zn SOD бруцеллез антигендерін экспрессиялайтын А тұмауы вирусының рекомбинантты штамдарының жақсы сақталуы сахарозасы (3 %) бар пептон (6 %) қорғаныс ортасы бар вакциналардың үлгілерінде байқалды, сонымен қатар инфекциялық белсенділіктің төмендеуі $1,83$ -тен $2,00 \cdot \log_{10}$ ЭИД₅₀/см³-ге дейінді құрады.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде, соңғы концентрациясында 6% және 3% пептон-сахарозадан тұратын кешенді орта тұмау вирустық векторларын лиофилизациялау және сақтау кезінде тиімді тұрақтандырғыштар болып табылатыны анықталды.

УДК: 619.631.22

DOI 10.52578/2305-9397-2024-4-1-172-180

МРНТИ: 68.41.31

Алимов А. А., кандидат ветеринарных наук, доцент, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0003-1028-0408>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, пр. Абая 8, 050010, Республика Казахстан, aitbai.65@mail.ru

Хусайнов Д. М., кандидат ветеринарных наук, доцент, <https://orcid.org/0000-0002-0244-8381>
НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, ул. Абая 8, 050010, Республика Казахстан, doctor-vet@mail.ru

Бупебаева Л. К., кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, <https://orcid.org/0000-0003-3838-6685>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, ул. Абая 8, 050010, Республика Казахстан, ms.bupebaeva@mail.ru

Козықан С., кандидат технических наук, ассоциированный профессор, <https://orcid.org/0000-0002-2385-3917>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, ул. Абая 8, 050010, Республика Казахстан, ms.bupebaeva@mail.ru

Зарханова А. Ж., Магистр ветеринарных наук, докторант 1 курса, <https://orcid.org/0000-0003-3291-3122>

НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», г. Алматы, ул. Абая 8, 050010, Республика Казахстан, zarhanova@inbox.ru

Alimov A. A., candidate of Veterinary Sciences, docent, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0003-1028-0408>

NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, st. Abay 8, 050010, Kazakhstan, aitbai.65@mail.ru

Khusainov D. M., candidate of Veterinary Sciences, docent, <https://orcid.org/0000-0002-0244-8381>
NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, st. Abay 8, 050010, Kazakhstan, doctor-vet@mail.ru

Bupebayeva L. K., candidate of Agricultural Sciences, docent, <https://orcid.org/0000-0003-3838-6685>
NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», Almaty, st. Abay 8, 050010, Kazakhstan, ms.bupebaeva@mail.ru

Kozykan S., candidate of Technical Sciences, associate Professor <https://orcid.org/0000-0002-2385-3917>