

ОЦЕНКА МЕТОДОВ ИНАКТИВИРОВАНИЯ АДЕНОВИРУСА ПТИЦ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Н. Н. Савина¹✉, А. А. Екимов¹, В. П. Трухин¹, А. Э. Евтушенко¹, Е. Н. Жиренкина¹, Е. О. Синегубова², А. В. Слита²¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

При производстве инактивированных гриппозных вакцин на стадии инактивации должен быть инактивирован как вирус гриппа, так и возможные вирусные загрязнители (например, аденовирус птиц), которые могут попасть в вакцину из сырья (куриных эмбрионов). Инактиваторы должны обеспечивать гарантированное снижение вирусной нагрузки загрязнителя не менее чем на 4 lg (БОЕ)/мл, что обеспечит его отсутствие в готовой вакцине. Целью работы было выбрать клеточную линию для наработки аденовируса и оценить снижение титра аденовируса в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии инактиваторов. Были подобраны оптимальные условия наработки аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes в культуре клеток, в качестве оптимальной выбрана культура клеток Vero; рассмотрены основные используемые инактиваторы: β -пропиолактон и УФ-излучение. Титры аденовируса определяли методом бляшкообразования. Спустя 10 ч инактивации β -пропиолактоном аденовирус штамма CELO показал снижение вирусной нагрузки на $4,12 \pm 0,06$ lg, а аденовирус штамма Fontes — на $4,20 \pm 0,19$ lg, что указывает на эффективное действие β -пропиолактона при инактивации. Проведение инактивации УФ-излучением позволяет снизить вирусную нагрузку штамма CELO на $4,69 \pm 0,89$ lg, а штамма Fontes — на $4,44 \pm 1,06$ lg за 5 мин. Отмечено, что добавление детергента на стадии расщепления также снижает вирусную нагрузку на $0,93 \pm 0,15$ lg и $1,04 \pm 0,12$ lg для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- β -D-глюкопиранозида и на $1,18 \pm 0,17$ lg и $1,12 \pm 0,38$ lg при использовании тетрадецилтриметиламмоний бромида.

Ключевые слова: гриппозные вакцины, инактивация, аденовирус птиц, пропиолактон, УФ-излучение**Вклад авторов:** все авторы внесли равнозначный вклад в разработку методики исследования, получение, анализ и интерпретацию данных, в написание и редактирование статьи.**Соблюдение этических стандартов:** исследование проведено с соблюдением этических принципов Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации 1964 г. и последующих ее пересмотров.✉ **Для корреспонденции:** Наталья Николаевна Савина
ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, г. Санкт-Петербург, 198320; n.n.savina@spbnivs.ru**Статья получена:** 18.08.2021 **Статья принята к печати:** 12.09.2021 **Опубликована онлайн:** 26.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.032

EVALUATION OF AVIAN ADENOVIRUS INACTIVATION METHODS USED IN THE PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES

Savina NN¹✉, Ekimov AA¹, Trukhin VP¹, Evtushenko AE¹, Zhirenkina EN¹, Sinigubova EO², Slita AV²¹ Saint Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums, FMBA, Russia² Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russia

Inactivation of influenza virus and other potential contaminants like avian adenoviruses coming from embryonated chicken eggs is a critical step in the production of inactivated influenza vaccines. Inactivation must lead to a guaranteed reduction in contaminant titers by at least 4 lg (PFU)/ml. The aim of this study was to identify an optimum cell line for adenovirus propagation and to estimate a reduction in adenovirus titers in vaccine intermediates after inactivation. In a series of experiments, we identified the optimum conditions and the optimum cell line for the propagation of avian adenovirus (strains CELO and Fontes). The most commonly used inactivation methods were analyzed, including inactivation by β -propiolactone and UV light. Viral titers were measured by plaque assays. After 10 h of inactivation with β -propiolactone, CELO titers fell by 4.12 ± 0.06 lg, whereas Fontes titers, by 4.20 ± 0.19 lg, suggesting that β -propiolactone is an effective inactivating agent. Exposure to UV light led to a reduction in CELO titers by 4.69 ± 0.89 lg and a reduction in Fontes titers by 4.44 ± 1.06 lg after 5 min. N-octyl- β -D-glucopyranoside added at the splitting step reduced CELO titers by 0.93 ± 0.15 lg and Fontes titers by 1.04 ± 0.12 lg, whereas tetradecyltrimethylammonium bromide led to a reduction in CELO and Fontes titers by 1.18 ± 0.17 lg and 1.12 ± 0.38 lg, respectively.

Keywords: influenza vaccine, inactivation, avian adenovirus, propiolactone, UV radiation**Author contribution:** all authors have equally contributed to the methodology of the study, analysis and interpretation of the results and manuscript preparation.**Compliance with ethical standards:** the study complied with the principles of the Declaration of Helsinki (1964) and its revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Natalya N. Savina
Svobody, 52, Krasnoye Selo, Saint Petersburg, 198320; n.n.savina@spbnivs.ru**Received:** 18.08.2021 **Accepted:** 12.09.2021 **Published online:** 26.09.2021**DOI:** 10.47183/mes.2021.032

Процесс производства гриппозных инактивированных вакцин включает стадию инактивации вируса гриппа для обеспечения безопасности готового препарата. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения и Европейского медицинского агентства [1, 2], стадия инактивации должна обеспечивать полную инактивацию вируса гриппа, однако, кроме вируса гриппа полупродукты могут содержать и загрязнители, наиболее значимые из которых — вирус лейкоза птиц, аденовирус птиц,

микоплазма. Согласно регламентирующей документации, процесс инактивации должен быть эффективен и в отношении перечисленных загрязнителей.

Инактивация в технологическом процессе производства может быть проведена как физическими методами, так и химическими. В качестве физического метода чаще всего используют облучение УФ-излучением, а химического — воздействием алкилирующих реагентов, таких как β -пропиолактон [3].

Аденовирусная инфекция птиц протекает хронически у птиц и летальна у куриных эмбрионов (КЭ). Аденовирусы птиц объединены в род *Aviadenovirus*. В настоящее время насчитывают 12 различных серотипов аденовирусов птиц, относящихся к группам CELO (Chicken Embryo Lethal Orphan), GAL (Gallus Adeno-Like virus), и один тип — возбудитель синдрома снижения яйценоскости EDS-76 [4].

Аденовирусная инфекция у кур проявляется как гепатит с тельцами включения, синдром гепатита-гидроперикарда и эрозия желудка, а также респираторными заболеваниями, отставанием в росте, воспалением суставов [5].

Аденовирусная инфекция птиц часто выступает в роли вторичного фактора при иных инфекционных болезнях, особенно при инфекционном бронхите кур, микоплазмозе и других заболеваниях дыхательных путей птицы.

Важно также отметить, что в птицеводствах Российской Федерации периодически возникают вспышки болезней, причиной которых являются и аденовирусы птиц [6, 7].

В литературе описаны методы инактивации аденовируса при помощи формальдегида [8], однако данные исследования затрагивают культивирование вируса гриппа и аденовируса с использованием культур клеток MDCK, что не может быть экстраполировано на эмбриональную технологию получения гриппозных вакцин. Известно также, что использование формальдегида в большей степени, чем β -пропиолактон, снижает иммуногенность вакцины из-за инактивации, β -пропиолактон обладает большей эффективностью в отношении инактивации вируса гриппа [9].

Приоритетное использование β -пропиолактона в отличие от формальдегида в качестве инактивирующего агента обусловлено тем, что β -пропиолактон гидролизует до 3-гидроксипропионовой кислоты, которая является промежуточным метаболитом липидного обмена человека [10], что непосредственно влияет на безопасность вакцины.

Целью настоящего исследования было выбрать оптимальный агент для инактивирования контаминанта гриппозных вакцин — аденовируса птиц, в частности наиболее распространенных групп CELO и GAL (штамм Fontes), а также выбрать минимальную длительность стадии инактивации для гарантированного снижения вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg (БОЕ)/мл [11].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Аденовирус птиц *Adenoviridae*, *Aviadenovirus*, Fowl adenovirus A, Fowl adenovirus 1, штамм Phelps (CELO), ATCC VR-432 (коллекция ATCC; США).

Аденовирус птиц *Adenoviridae*, *Aviadenovirus*, Fowl adenovirus D, Fowl adenovirus 2, штамм Fontes, ATCC VR-280 (коллекция ATCC; США).

Клетки HEp-2 (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

Клетки MA-104 (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

Клетки Vero (коллекция клеточных линий НИИЭМ им. Пастера; Россия).

Культивирование аденовирусов птиц штаммов CELO и Fontes и определение их инфекционной активности

Эксперименты по определению оптимальной культуры клеток для накопления вирусов проводили на линиях

клеток Vero B, MA-104 и HEp-2. Клетки культивировали в ростовой среде альфа-MEM с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco), 2 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина. Для эксперимента использовали поддерживающую питательную среду (ППС), которая отличалась от ростовой тем, что в ее состав входило не 10, а 2% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Для исследования клетки выращивали во флаконах (площадь дна 25 см²) для культуральных работ при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂; посевная доза составила 500 тыс. клеток/мл. Клетки культивировали в течение ночи до формирования монослоя.

Клетки инфицировали изучаемыми вирусными агентами и культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ до деструкции 80–90% монослоя. Флаконы замораживали при –20 °C и после оттаивания определяли инфекционный титр вирусов, как описано ниже.

Клетки изучаемых линий рассевали на 24-луночные планшеты (посевная доза — 500 тыс. клеток/мл) и культивировали при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ в течение ночи до формирования монослоя. Из вирусосодержащего материала готовили серию 10-кратных разведений от 10⁻¹ до 10⁻⁷. Полученными разведениями инфицировали клетки в лунках планшета и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. По истечении указанного времени клетки промывали средой и вносили среду MEM с жидким ацицеллом (SigmaAldrich; США) в соотношении 1 : 1. После этого планшеты инкубировали 96 ч при 37 °C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По истечении этого времени в лунки вносили по 1 мл 0,1%-го спиртового раствора кристалвиолета и окрашивали в течение 15 мин, после чего лунки промывали дистиллированной водой, подсушивали при комнатной температуре и подсчитывали число вирусных бляшек в каждой лунке. На основании полученных данных рассчитывали титр вируса по методу Рида и Менча [12], который выражали в БОЕ/мл.

Получение вирусосодержащей аллантоисной жидкости

Для культивирования вируса гриппа использовали 9–11-дневные куриные эмбрионы. Заражение куриных эмбрионов проводили дозой 0,2 мл с инфекционной активностью 102,0–104,5 и эффективной инфекционной дозой, равной 50 (ЭИД₅₀). Инкубацию куриных эмбрионов осуществляли при 35 °C в течение 48 ч для вируса гриппа типа А и в течение 72 ч — для вируса гриппа типа В. После инкубации эмбрионы охлаждали и собирали вирусосодержащую аллантоисную жидкость (ВАЖ).

Получение вирусных концентратов (ВК)

ВАЖ подвергали фильтрации через каскад фильтров с диаметром пор 10, 6 и 1 мкм с последующим концентрированием с использованием ультрафильтрационной установки с пределом отсеивания 300 кДа. Сконцентрированную вирусосодержащую аллантоисную жидкость подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы (60–20%). Собирали фракции сахарозного градиента в диапазоне 40–25% сахарозы.

Таблица 1. Инфекционная активность аденовирусов птиц CELO и Fontes в клеточных линиях различного генеза

Вирус	Титр вируса в клеточной линии, БОЕ/мл		
	Vero	HEp-2	MA-104
CELO	$4,3 \pm 2,3 \times 10^5$	$6,5 \pm 3,0 \times 10^3$	$1,1 \pm 0,2 \times 10^3$
Fontes	$3,3 \pm 1,5 \times 10^6$	$9,7 \pm 3,8 \times 10^3$	$2,0 \pm 0,7 \times 10^3$

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов осуществляли при помощи программного пакета Microsoft Excel 365 (Microsoft corp.; США), а также Minitab 19 (Minitab Inc.; США). Доверительные интервалы рассчитаны для доверительной вероятности 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выбор оптимальной клеточной линии для культивирования аденовирусов птиц

Для оптимизации процесса культивирования аденовирусов птиц были использованы три клеточные линии: Vero, MA-104 и HEp-2 как наиболее часто применяемые для культивирования аденовирусов. Результаты изучения инфекционной активности вирусов в этих линиях представлены в табл. 1.

Оба аденовируса птиц репродуцировались в клетках Vero более чем на два порядка более эффективно, чем в линиях MA-104 и HEp-2. Полученные данные свидетельствуют, что линия Vero является наиболее перmissive для обоих аденовирусов птиц.

Изучение динамики инактивации аденовируса птиц в вирусосодержащей аллантоисной жидкости β-пропиолактоном

Для моделирования инфицирования вирусосодержащей аллантоисной жидкости (ВАЖ) аденовирусами птиц и их инактивации к образцам ВАЖ добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так, чтобы конечное его содержание составляло не менее 10^5 БОЕ/мл. Полученную смесь подвергали инактивации β-пропиолактоном (0,09% в

конечной смеси) и определяли значение титра аденовируса птиц в образцах. Динамика инактивации представлена на рис. 1.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg БОЕ/мл происходило не менее чем через 10 ч после добавления β-пропиолактона, что обуславливает необходимость проведения инактивации вирусосодержащей аллантоисной жидкости в технологическом процессе получения гриппозных препаратов не менее 10 ч.

Изучение динамики инактивации аденовируса птиц в вирусных концентратах с помощью ультрафиолетового облучения

Для моделирования инфицирования ВК аденовирусами птиц и их инактивации к образцам ВК добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так чтобы конечное его содержание составляло не менее 10^5 БОЕ/мл. Контаминированный ВК помещали в чашки Петри с диаметром 90 мм. Чашки с образцами устанавливали под установкой из четырех ультрафиолетовых ламп (общей мощностью 60 Вт) на расстоянии 20 см. Проводили облучение по схеме:

- 1-я чашка — 0 с;
- 2-я чашка — 30 с;
- 3-я чашка — 1 мин;
- 4-я чашка — 2 мин;
- 5-я чашка — 5 мин.

Через указанные промежутки времени из чашек отбирали пробы ВК объемом 1 мл, в которых определяли инфекционный титр вируса при помощи бляшкообразования. Динамика инактивации представлена на рис. 2.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg БОЕ/мл происходит не менее чем через 5 мин действия УФ-

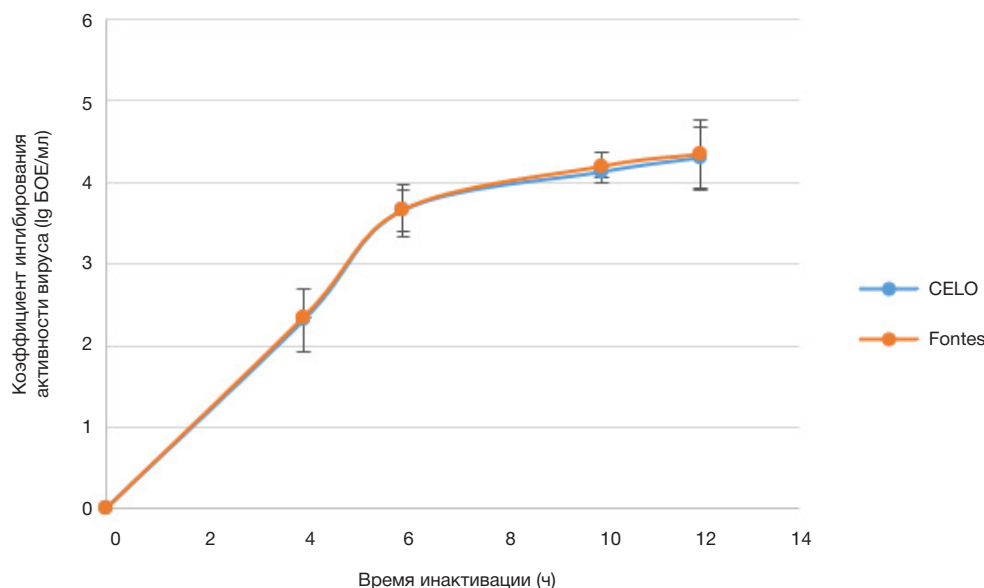


Рис. 1. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии β-пропиолактона

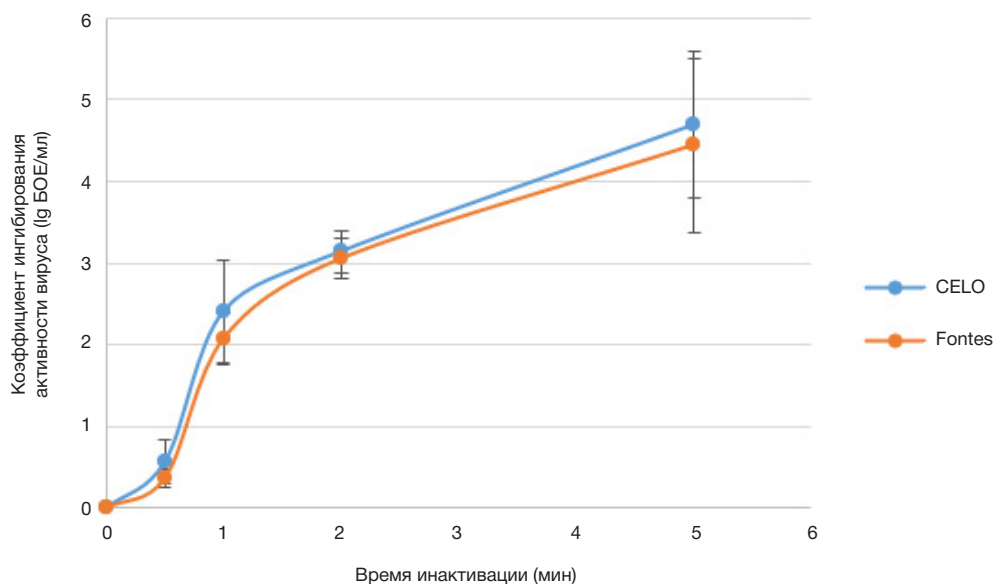


Рис. 2. Динамика инaktivации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии УФ-излучения

излучения, что обуславливает необходимость проведения инaktivации вирусосодержащей аллантоисной жидкости в технологическом процессе получения гриппозных препаратов не менее 5 мин действия УФ-излучения.

Изучение динамики инaktivации аденовируса птиц в вирусных концентратах с использованием детергентов

Для моделирования инфицирования ВК аденовирусами птиц и их инaktivации к образцам ВК добавляли 10% по объему предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий аденовирус птиц, так, чтобы конечное его содержание составляло не менее 10^5 БОЕ/мл. К контаминированным ВК добавляли предварительно растворенные в фосфатно-солевом буфере детергенты н-октил- β -D-глюкопиранозид (соотношение общего белка к детергенту — 1/8) и тетрадецилтриметиламмоний бромид (ТДТАБ) (соотношение общего белка к детергенту — 1/0,5) и определяли значение титра аденовируса птиц в образцах. Динамика инaktivации представлена на рис. 3 и 4.

Снижение титра аденовируса при действии детергентов на 1 lg БОЕ/мл происходило спустя 1 ч расщепления вируса гриппа детергентами, а именно на $0,93 \pm 0,15$ lg и $1,04 \pm 0,12$ lg для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- β -D-глюкопиранозид и $1,18 \pm 0,17$ lg и $1,12 \pm 0,38$ lg при использовании тетрадецилтриметиламмония бромида.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

По результатам исследования, инaktivация как β -пропиолактоном, так и УФ-излучением эффективна в отношении контаминанта — аденовируса штаммов Fontes и CELO, однако вариабельность результатов при действии УФ-излучения выше (табл. 2).

Полученные данные могут свидетельствовать о меньшей стабильности процесса инaktivации и как следствие — повышении риска выпуска некачественной гриппозной вакцины. Большинство фармацевтических производителей, как отечественных, так и зарубежных, инaktivировать вирус гриппа химическим способом.

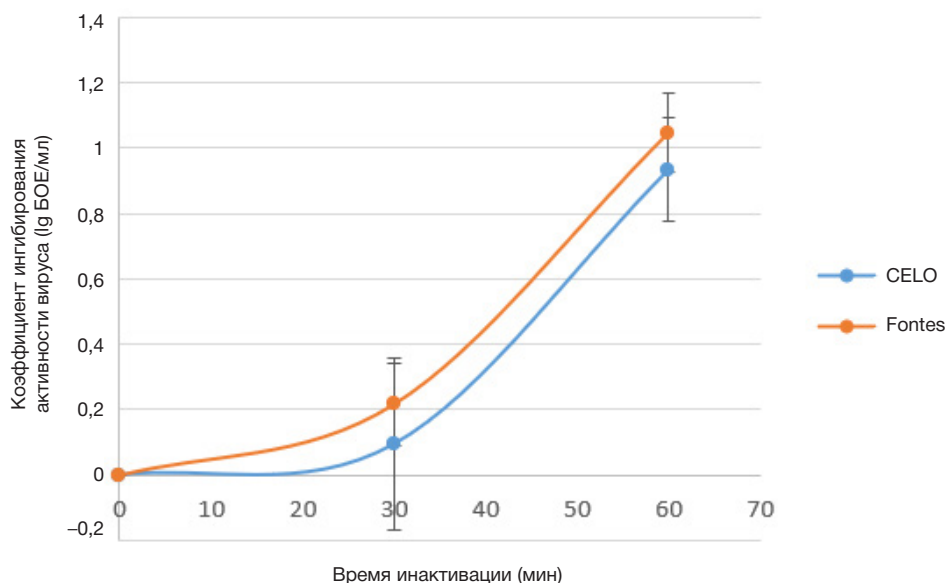


Рис. 3. Динамика инaktivации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии н-октил- β -D-глюкопиранозидом

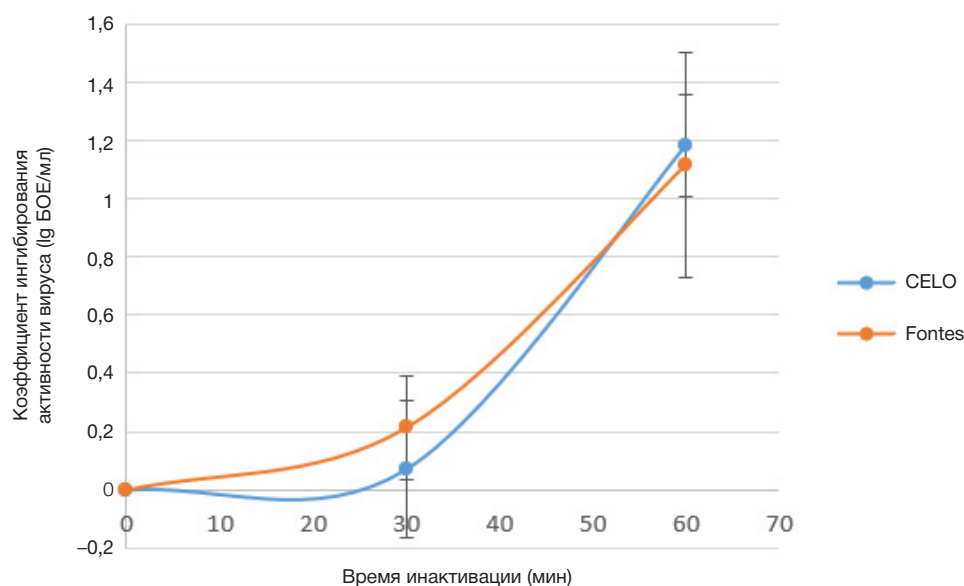


Рис. 4. Динамика инактивации аденовируса птиц штаммов CELO и Fontes при действии ТДТАБ

В частности, компании Novartis, ID Biomedical Corp of Quebec и ФГУП СГБНИИВС ФМБА России для производства гриппозной вакцины используют инактивацию β -пропиолактоном [13–15]. Таким образом, используемый способ инактивации может гарантированно инактивировать не только вирус гриппа, но и возможный контаминант — аденовирус птиц.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования была выбрана оптимальная клеточная линия для культивирования аденовирусов птиц Fontes и CELO. Показано, что линия Vero обеспечивает репродукцию вирусов примерно на два порядка выше по сравнению с линиями клеток Нер-2 и МА-104. Выявлено, что минимальное время инактивирования аденовируса содержащей аллантоисной жидкости с использованием β -пропиолактона при получении

гриппозных вакцин, составляет 10 ч, что гарантированно снижает нагрузку аденовируса птиц на 4 lg БОЕ/мл. В случае использования УФ-излучения для инактивации вирусных концентратов время инактивации должно составлять не менее 5 мин экспозиции, что гарантированно снижает нагрузку аденовируса птиц на 4 lg БОЕ/мл. Дополнительное снижение нагрузки аденовируса птиц на 1 lg БОЕ/мл происходит после добавления детергентов при получении гриппозных расщепленных вакцин. Таким образом, технология получения гриппозных вакцин, включающая стадии инактивирования аллантоисной жидкости β -пропиолактоном в течение 10 ч с последующим добавлением детергента через 1 ч, гарантированно обеспечивает полное инактивирование аденовирусов птиц. Однако аденовирус является не единственным возможным контаминантом и на следующем этапе представляется необходимым изучение кинетики инактивации β -пропиолактоном вируса лейкоза птиц и микоплазмы.

Таблица 2. Снижение вирусной нагрузки аденовируса при действии различными инактиваторами

Инактиватор	Наименование штамма	
	CELO	Fontes
β -Пропиолактон (время инактивации 10 ч)	4,12 $\pm$ 0,06 lg	4,20 $\pm$ 0,19 lg
УФ-излучение (время инактивации 5 м)	4,69 $\pm$ 0,89 lg	4,44 $\pm$ 1,06

Литература

- Guideline on Influenza vaccines — Quality module. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), 2017. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1_en.pdf.
- Серия технических докладов ВОЗ, № 927, 2005 год. Приложение 3. Рекомендации по производству и контролю вакцин против гриппа (инактивированных).
- Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. Rev Med Virol. 2019 Nov; 29 (6): e2074.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Leftkowitz EJ, editors. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2012; 1327 p.
- Qing Pan, Jing Wang, Yulong Gao, Qi Wang, Hongyu Cui, Changjun Liu, et al. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism, Emerging Microbes & Infections. 2020; 9 (1): 586–96.
- Бакулин В. А., Мурый В. А. Аденовирусный гепатит с включениями-гидроперикардит кур: эпизоотология, диагностика и специфическая профилактика. Био. 2011; 12: 28–30.
- Борисов В. В. Разработка средств и методов диагностики и специфической профилактики аденовирусных болезней кур [диссертация]. Иваново, 2007.

8. Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking*. 2013; 11 (4): 229–34.
9. Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*. 2019; 37 (12): 1630–7.
10. Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018; 8 (6): 373–7.
11. Руководство по исследованию валидации вирусной очистки: проектирование, вклад и интерпретация исследований, использующих инактивацию и удаление вирусов. EMA CPMP/BWP/268/95; 1996.
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
13. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG, assignee. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. United States patent US № US6986808P. 18.03.2008.
14. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF, assignee. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. United States patent US № US18247600P. 15.02.2000.
15. Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Красильников И. В., Савина Н. Н., Быков Д. Г., Уйба С. В., Васильев А. Н., Рыськова Е. В., Начарова Е. П., Аракелов С. А., авторы; Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России), патентообладатель. Способ получения антигена или антигенов для производства противогриппозной вакцины и вакцина на его основе. Патент РФ № RU2019118695A. 14.06.2019.

References

1. Guideline on Influenza vaccines — Quality module. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP), 2017. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-influenza-vaccines-quality-module-revision-1_en.pdf.
2. Serija tehničkih doklada VOZ, # 927, 2005 god. Priloženje 3. Rekomendacij po proizvodstvu i kontrolju vakcin protiv grippa (inaktivirovanih). Russian.
3. Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol*. 2019 Nov; 29 (6): e2074.
4. King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Leifkowitz EJ, editors. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, 2012; 1327 p.
5. Qing Pan, Jing Wang, Yulong Gao, Qi Wang, Hongyu Cui, Changjun Liu, et al. Identification of chicken CAR homology as a cellular receptor for the emerging highly pathogenic fowl adenovirus 4 via unique binding mechanism, *Emerging Microbes & Infections*. 2020; 9 (1): 586–96.
6. Bakulin V. A., Murj V. A. Adenovirusnyj gepatit s vključenijami gidroperekardit kur: jepizootologija, diagnostika i specificheskaja profilaktika. *Bio*. 2011; 12: 28–30. Russian.
7. Borisov VV. Razrabotka sredstv i metodov diagnostiki i specificheskoi profilaktiki adenovirusnyh boleznej kur [dissertacija]. Ivanovo, 2007.
8. Kap M, Arron GI, Loibner M, Hausleitner A, Siaulyte G, Zatloukal K, Riegman P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene Tissue Fixative and Formalin. *Biopreservation and Biobanking*. 2013; 11 (4): 229–34.
9. Herrera-Rodriguez J, Signorazzi A, Holtrop M, de Vries-Idema J, Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine*. 2019; 37 (12): 1630–7.
10. Shuo Lei, Xun Gao, Yang Sun, Xiangyong Yu, Longshan Zhao. Gas chromatography-mass spectrometry method for determination of β -propiolactone in human inactivated rabies vaccine and its hydrolysis analysis, *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2018; 8 (6): 373–7.
11. Rukovodstvo po issledovaniju validacii virusnoj ochistki: proektirovanie, vklad i interpretacija issledovanij, ispol'zujushhih inaktivaciju i udalenie virusov. EMA CPMP/BWP/268/95; 1996. Russian.
12. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*. 1938; 27: 493–7.
13. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG, assignee. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. United States patent US № US6986808P. 18.03.2008.
14. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF, assignee. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. United States patent US № US18247600P. 15.02.2000.
15. Truhin VP, Evtushenko AY, Krasilnikov IV, Savina NN, Bykov DG, Ujba SV, Vasilev AN, Ryskova EV, Nacharova EP, Arakelov SA, avtory; Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe predpriatie «Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok i predpriatie po proizvodstvu bakterijnyh preparatov» Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva (FGUP SPbNIIVS FMBA Rossii), patentoobladatel'. Sposob polucheniya antigena ili antigenov dlja proizvodstva protivogrippoiznoj vakciny i vakcina na ego osnove. Patent RF # RU2019118695A. 14.06.2019. Russian.