

ОЦЕНКА МЕТОДОВ ИНАКТИВИРОВАНИЯ ВИРУСА ЛЕЙКОЗА ПТИЦ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН

Н. Н. Савина¹, А. А. Екимов¹✉, М. А. Шуклина², В. П. Трухин¹, А. Э. Евтушенко¹, Е. Н. Жиренкина¹, Л. А. Степанова²¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия² Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

При производстве инактивированных гриппозных вакцин на стадии инактивации должен быть инактивирован как вирус гриппа, так и возможные вирусные контаминанты, которые могут попасть в вакцину из сырья (куриных эмбрионов). Одним из возможных контаминантов является вирус лейкоза птиц. Инактиваторы должны обеспечивать гарантированное снижение вирусной нагрузки контаминанта не менее чем на 4 lg/мл, что обеспечит его отсутствие в готовой вакцине. Целью работы было осуществить наработку вируса лейкоза для достижения минимального титра 5 lg/мл, оценить снижение титра вируса лейкоза птиц в полупродуктах гриппозных вакцин при воздействии инактиваторов. В исследовании использовали штаммы вируса лейкоза RAV-1 и RAV-2 и полупродукты гриппозных вакцин, такие как вирусосодержащая аллантоисная жидкость и вирусные концентраты. Титры вируса лейкоза птиц определяли методом иммуноферментного анализа. Были подобраны условия наработки вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 в первичной культуре фибробластов эмбрионов кур (ФЭК); рассмотрены основные используемые инактиваторы — β -пропиолактон и УФ-излучение. Выявлено, что спустя 12 ч инактивации β -пропиолактоном вирус лейкоза птиц штамма RAV-1 показал снижение вирусной нагрузки на $4,61 \pm 0,46$ lg, а вирус лейкоза птиц штамма RAV-2 — на $4,33 \pm 0,33$ lg, что указывает на эффективное действие β -пропиолактона при инактивации. Проведение инактивации УФ-излучением позволяет снизить вирусную нагрузку штамма RAV-1 на $4,22 \pm 0,31$ lg, а штамма RAV-2 на $4,44 \pm 0,48$ lg за 5 мин.

Ключевые слова: гриппозные вакцины, инактивация, вирус лейкоза птиц, RAV-1, RAV-2, 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:** Алексей Александрович Екимов
ул. Свободы, д. 52, Красное Село, г. Санкт-Петербург, 198320, Россия; a.a.ekimov@niivs.ru**Статья получена:** 31.10.2022 **Статья принята к печати:** 19.11.2022 **Опубликована онлайн:** 29.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.047

EVALUATION OF METHODS OF AVIAN LEUCOSIS VIRUS INACTIVATION IN PRODUCTION OF INFLUENZA VACCINES

Savina NN¹, Ekimov AA¹✉, Shuklina MA², Trukhin VP¹, Evtushenko AE¹, Zhirenkina EN¹, Stepanova LA²¹ St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Serums and Bacterial Preparations Production Company of the FMBA of Russia, St. Petersburg, Russia² Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia

The process of production of inactivated influenza vaccines involves a stage of inactivation of both the influenza virus and the possible viral contaminants that can come from the raw materials (chicken embryos). One of such contaminants is the avian leucosis virus. The minimum viral contaminant load reduction that the inactivating agents should guarantee is by 4 lg/ml; this or higher level of the deactivating ability ensures the finished vaccine is free from viral contaminants. The purpose of this work was to cultivate the leucosis virus to the titer of 5 lg/ml (minimum) and to measure the reduction of the avian leucosis virus titer in influenza vaccine intermediates upon exposure to the inactivating agents. The RAV-1 and RAV-2 leucosis virus strains and influenza vaccine intermediates such as virus-containing allantoic fluid and virus concentrates were used in the study. Avian leucosis virus titers were determined by enzyme immunoassay. We created conditions for cultivation of the RAV-1 and RAV-2 avian leucosis virus strains in the primary culture of chicken embryo fibroblasts (CEF); the inactivating agents considered were the most commonly used β -propiolactone and UV radiation. It was found that after 12 hours of exposure to β -propiolactone, the RAV-1 avian leucosis virus load decreased by 4.61 ± 0.46 lg, and that of RAV-2 strain — by 4.33 ± 0.33 lg, which indicates that β -propiolactone is an effective inactivating agent. Five minutes of exposure to UV radiation reduces the RAV-1 strain viral load by 4.22 ± 0.31 lg and RAV-2 strain viral load by 4.44 ± 0.48 lg.

Keywords: influenza vaccines, inactivation, avian leucosis virus, RAV-1, RAV-2, propiolactone, UV radiation**Author contribution:** all authors contributed equally to the research methodology design, data collection, analysis and interpretation, article authoring and editing.**Compliance with the ethical standards:** the study was conducted in accordance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki of 1964 and its subsequent revisions.✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey Alexandrovich Ekimov
Svobody, 52, Krasnoe Selo, St. Petersburg, 198320, Russia; a.a.ekimov@niivs.ru**Received:** 31.10.2022 **Accepted:** 19.11.2022 **Published online:** 29.12.2022**DOI:** 10.47183/mes.2022.047

При производстве инактивированных гриппозных вакцин необходимо обеспечивать полную инактивацию вируса гриппа для достижения безопасности готового препарата. Указанное положение рекомендовано как Всемирной организацией здравоохранения, так и Европейским медицинским агентством [1, 2], и требуется при производстве вакцин международного качества.

В свою очередь куриные эмбрионы, используемые в процессе производства гриппозных вакцин, потенциально могут быть заражены зоонозными инфекциями, такими как вирус лейкоза птиц, аденовирус птиц, микоплазма. Согласно указанным выше рекомендациям, разработанный технологический процесс должен обеспечивать инактивацию и перечисленных контаминантов.

Известны различные способы инактивации вирусов при производстве вакцин, в том числе при помощи УФ-излучения, воздействия формальдегида или β -пропиолактона [3]. Указанные методы обладают различной эффективностью в отношении вирусов.

Ранее было рассмотрено влияние инактивирующих агентов на аденовирус птиц штаммов CELO и Fontes [4], показана эффективность β -пропиолактона и УФ-излучения при инактивации в отношении указанных штаммов. Выявлено, что спустя 10 ч инактивации β -пропиолактоном аденовирус штамма CELO показал снижение вирусной нагрузки на $4,12 \pm 0,06$ lg (БОЕ)/мл, а аденовирус штамма Fontes — на $4,20 \pm 0,19$ lg (БОЕ)/мл, 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 (БОЕ)/мл, а штамма Fontes на $4,44 \pm 1,06$ lg (БОЕ)/мл за 5 мин. Отмечено, что добавление детергента на стадии расщепления также снижает вирусную нагрузку на $0,93 \pm 0,15$ lg (БОЕ)/мл и $1,04 \pm 0,12$ lg (БОЕ)/мл для штаммов CELO и Fontes соответственно при использовании н-октил- β -D-глюкопиранозиды и на $1,18 \pm 0,17$ lg (БОЕ)/мл и $1,12 \pm 0,38$ lg (БОЕ)/мл — при использовании тетрадецилтриметиламмоний бромида.

В связи с этим возникла необходимость подробного изучения влияния указанных выше агентов на еще один возможный контаминант — вирус лейкоза птиц. Известно, что вирус лейкоза птиц относится к РНК-содержащим онкорнавирусам семейства *Retroviridae*, которые вызывают лейкоз и саркомы у птиц и включают шесть антигенных подгрупп А, В, С, D, Е, J. Вирусы этой группы обнаруживают в опухолевой ткани, крови, в паренхиматозных органах, а также в яйцах кур. Согласно проведенному ранее исследованию, на территории Российской Федерации в 90% исследованных птицеводческих хозяйств были выявлены антитела к вирусу лейкоза птиц [5]. Таким образом, существует серьезный риск контаминирования яйца для вакцинного производства вирусом лейкоза птиц. Следует также отметить, что в Российской Федерации возникает острая необходимость регламентирования отсутствия вируса лейкоза птиц в яйце курином инкубационном для вакцинного производства.

В литературе описаны методы инактивации при помощи УФ-излучения, однако изучение инактивации проведено только на штамме RAV-1 [6]. Еще одним возможным инактиватором является формальдегид, но формальдегид может оказывать влияние на стабильность готовой гриппозной вакцины и на ее иммуногенность в связи с высокой реакционной способностью формальдегида и возможностью химической модификации гемагглютинаина вируса гриппа с затрагиванием антигенных детерминант [7, 8]. В свою очередь другой химический инактиватор — β -пропиолактон не приводит к указанным недостаткам, эффективно инактивирует вирус гриппа, а также гидролизует до 3-гидроксипропионовой кислоты, которая является промежуточным метаболитом липидного обмена человека [9], что влияет и на безопасность вакцины.

Целью настоящего исследования было выбрать оптимальный агент для инактивирования контаминанта гриппозных вакцин — вируса лейкоза птиц, в частности наиболее распространенных групп RAV-1 (подгруппа А) и RAV-2 (подгруппа В) и минимальную длительность стадии инактивации для гарантированного снижения вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg инфекционных единиц (ИЕ)/мл [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

При работе использовали:

- вирус лейкоза птиц RAV-1 (ATCC-VR-335), полученный из коллекции ATCC (США);
- вирус лейкоза птиц RAV-2 (ATCC-VR-1828), полученный из коллекции ATCC (США);
- куриные эмбрионы 10-дневные («Птицефабрика Синявинская»; Россия);
- тест-систему IDEXX ALV Ag: Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX Laborototies, Inc., США).

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 эмбриональной 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 и использованием ультрафильтрационной установки с пределом отсека 300 кДа. Сконцентрированную вирусосодержащую аллантоисную жидкость подвергали ультрацентрифугированию в градиенте плотности сахарозы (60–20%). Собирали фракции сахарозного градиента в диапазоне 40–25% сахарозы. Отобранные фракции сахарозного градиента объединяли и хранили при температуре –20 °C до проведения исследования.

Культивирование вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2

Культивирование вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 проводили на первичной культуре клеток фибробластов (ФЭК), приготовленной из 10-суточных эмбрионов кур. Клеточную культуру ФЭК получали в соответствии с методом, описанным в литературе [11] в культуральных флаконах объемом 75 см³.

После формирования монослоя культуры клеток готовили рабочее разведение вируса на поддерживающей среде (питательная среда 199, с добавлением ТРСК-трипсина до конечной концентрации 2 мкг/мл и БСА (V фракция) до конечной концентрации 0,2%). Подготовленное разведение вируса вносили в первичную культуру клеток фибробластов КЭ (85–95% монослой), предварительно дважды отмытую ФБР, в объеме 2–3% от объема матраса (необходимом для полного покрытия монослоя вирусосодержащей жидкостью). Разведение вируса вносили на культуру клеток фибробластов в объеме 3 мл, оставляли на контакт в течение 1 ч при температуре +37 °C. Затем добавляли поддерживающую среду (6 мл) и инкубировали в CO₂-инкубаторе при +37 °C. Смену среды проводили на 5-е сутки инкубации.

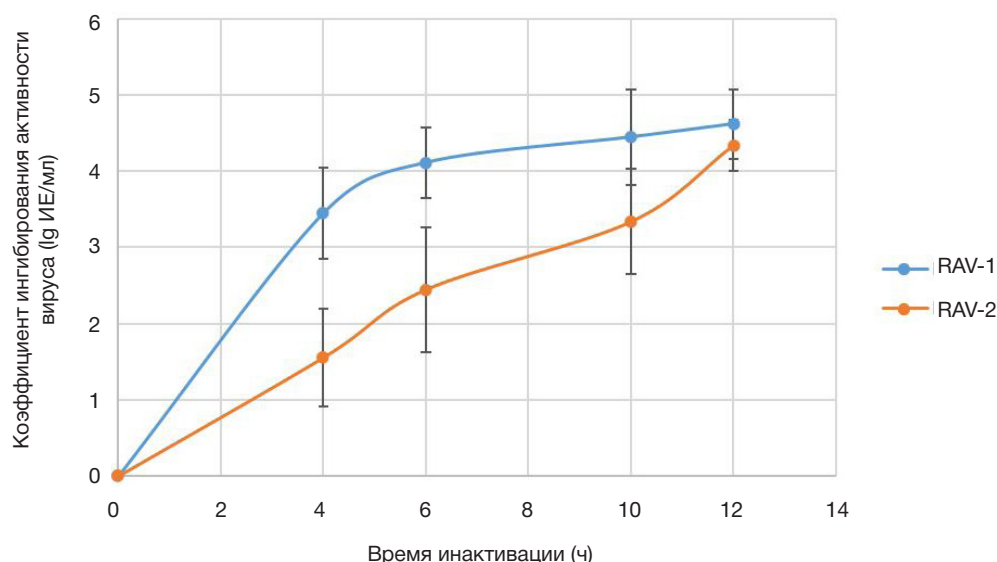


Рис. 1. Динамика инaktivации вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 при действии β-пропиолактона

Забор образцов (вирусоносительную культуральную жидкость) производили на 13-й (RAV-1) или на 7-й (RAV-2) день. По окончании инкубации флаконы с вирусоносительной жидкостью замораживали при -20°C и оставляли оттаивать при комнатной температуре (процедуру замораживания-размораживания повторяли 2–3 раза). Проводили сбор вирусоносительной жидкости из флаконов, центрифугировали при 1159 g 10 мин для осаждения клеток.

Определение титра вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 в первичной клеточной культуре фибробластов куриного эмбриона

Определение титра вируса RAV-1 и RAV-2 в ВАЖ и ВК при моделировании инaktivации вируса β-пропиолактоном (β-ПЛ) и УФ-облучением проводили путем титрования образцов на разных сроках инaktivации на первичной культуре клеток ФЭК с последующим определением наличия антигена p27 в ИФА в каждом разведении. Каждый образец исследовали в трипликатах. Готовили 10-кратные разведения образцов (от 10^{-1} до 10^{-6}), полученных на поддерживающей среде. Подготовленные разведения образцов, полученных в процессе моделирования инaktivации RAV-1 β-ПЛ или УФ-облучением, и отрицательный контроль (не контаминированные серии ВК и ВАЖ) вносили на культуру клеток ФЭК в объеме 0,5 мл на лунку (каждое разведение исследовали в трех повторностях), оставляли на контакт в течение 5 ч при температуре $+37^{\circ}\text{C}$. Затем удаляли вирусоносительную культуральную жидкость и вносили поддерживающую среду по 1 мл в лунку. Планшеты инкубировали в CO_2 -инкубаторе при $+37^{\circ}\text{C}$ и 5% CO_2 в течение 7 дней.

По окончании инкубации планшеты с первичной клеточной культурой фибробластов замораживали при -20°C и оставляли оттаивать при комнатной температуре, процедуру замораживания-размораживания повторяли 2 раза. Проводили сбор культуральной жидкости из лунок планшетов, центрифугировали при 3000 об./мин для осаждения собранных вместе с жидкостью клеток.

Надосадочную жидкость далее исследовали на наличие антигена p27 в ИФА с помощью тест-системы IDEXX ALV Ag: Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX Laboratorieties, Inc.; США) в соответствии с инструкцией к тест-системе. За титр принимали наибольшее разведение образца

вирусоносительной жидкости, которое дает значение соотношения оптических плотностей исследуемой пробы к положительному контролю больше 0,2. Предел чувствительности метода — 1lg ИЕ/мл. Титр меньше 1lg ИЕ/мл принимали за 0,5.

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 среднего значения рассчитывали с доверительной вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение динамики инaktivации вируса лейкоза птиц в вирусоносительной аллантоисной жидкости β-пропиолактоном

Для моделирования инфицирования вирусоносительной аллантоисной жидкости (ВАЖ) вирусом лейкоза птиц и их инaktivации эксперимент проводили аналогично изучению инaktivации аденовируса птиц [4]. К образцам ВАЖ добавляли предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий вирус лейкоза птиц, в объеме, равном 10% от исходного объема пробы, так чтобы конечное его содержание составляло не менее 5 lg ИЕ/мл. К полученным контаминированным образцам добавляли β-пропиолактоном до конечной концентрации 0,09% и определяли значение титра вируса лейкоза птиц в образцах в соответствии с описанной методикой. Динамика инaktivации представлена на рис. 1.

Согласно полученным данным, снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg ИЕ/мл происходило не менее чем через 12 ч после добавления β-пропиолактона при температуре от $+4$ до $+8^{\circ}\text{C}$ (табл.).

Изучение динамики инaktivации вируса лейкоза птиц в вирусных концентратах с помощью ультрафиолетового облучения

Для моделирования инфицирования ВК вирусом лейкоза птиц и их инaktivации эксперимент проводили

Таблица. Снижение вирусной нагрузки вируса лейкоза птиц при действии различными инактиваторами

Инактиватор	Наименование штамма	
	RAV-1	RAV-2
β -Пропиолактон (время инаktivации 12 ч)	$4,61 \pm 0,46 \lg$	$4,33 \pm 0,33 \lg$
УФ-излучение (время инаktivации 5 мин)	$4,22 \pm 0,31 \lg$	$4,33 \pm 0,48 \lg$

аналогично изучению инаktivации аденовируса птиц [4]. К образцам ВК добавляли предварительно оттитрованный инфекционный материал, содержащий вирус лейкоза птиц, в объеме, равном 10% от исходного объема пробы, так чтобы конечное его содержание составляло не менее 5 lg ИЕ/мл. В чашки Петри диаметром 90 мм помещали по 7 мл загрязненного ВК. Чашки Петри облучали УФ-излучением, мощностью 60 Вт на расстоянии 20 см в течение 0; 0,5; 1; 2 и 5 мин. Инаktivацию проводили при температуре +18 °С.

Через указанные промежутки времени чашки удаляли из установки и проводили отбор проб объемом 1 мл для дальнейшего определения инфекционного титра в соответствии с описанной методикой. Динамика инаktivации представлена на рис. 2.

Снижение вирусной нагрузки не менее чем на 4 lg ИЕ/мл происходит не менее чем через 5 мин действия УФ-излучения (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Согласно многолетним данным ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, для полной инаktivации вируса гриппа штаммов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения для включения в состав инаktivированной гриппозной вакцины, под действием β -пропиолактона достаточно 4–6 ч, а для УФ-излучения — 3–4 мин. Однако этой продолжительности недостаточно для инаktivации возможных контаминантов и вызывает риски получения небезопасной вакцины. По результатам более раннего исследования [4], нами было доказано, что инаktivация как β -пропиолактоном так и УФ-излучением эффективна в отношении контаминанта — аденовируса штаммов Fontes и CELO. При этом снижение вирусной нагрузки более чем на 4 lg БОЕ/мл достигается не менее чем за 10 ч при инаktivации ВАЖ β -пропиолактоном

($4,12 \pm 0,06 \lg$ и $4,20 \pm 0,19 \lg$ для CELO и Fontes соответственно) и не менее чем через 5 мин инаktivации УФ-излучением ($4,69 \pm 0,89 \lg$ и $4,44 \pm 1,06$ для CELO и Fontes соответственно).

Согласно литературным данным, для инаktivации вируса лейкоза птиц используют термический метод и инаktivацию формалином в течение 24 ч [12, 13], но указанные способы малоприменимы при производстве гриппозных вакцин в связи со снижением иммуногенности готового продукта, а также токсичности формальдегида. Инаktivация вируса лейкоза птиц УФ-излучением описана только для RAV-1 [6], снижение вирусной нагрузки на 2 lg за 10 мин при облучении вирусосодержащих материалов с расстояния 40 см лампами суммарной мощностью 30 Вт.

Проведенное исследование показало, что β -пропиолактон и УФ-излучение эффективны и в отношении штаммов RAV-1 и RAV-2 вируса лейкоза птиц. Однако время для достижения полноты инаktivации вируса лейкоза птиц β -пропиолактоном составляет 12 ч, что больше на 2 ч по сравнению с аденовирусом, поэтому, для гарантированного инаktivирования обоих контаминантов, длительность стадии инаktivации β -пропиолактоном в технологическом процессе получения противогриппозных инаktivированных вакцин должна составлять не менее 12 ч при температуре +4–+8 °С. При инаktivации с помощью УФ-излучения нижняя граница доверительного интервала ($p = 0,95$) коэффициента снижения вирусной нагрузки составляет менее 4 lg, что свидетельствует о необходимости увеличения продолжительности инаktivации более чем 5 мин.

Таким образом, инаktivация β -пропиолактоном позволяет получать более воспроизводимые результаты и гарантированно снижать вирусную нагрузку более чем на 4 lg в отношении и вируса лейкоза птиц и аденовируса птиц в процессе получения гриппозных вакцин. Указанный факт минимизирует риски, и β -пропиолактон используют в качестве инаktivатора в технологических процессах

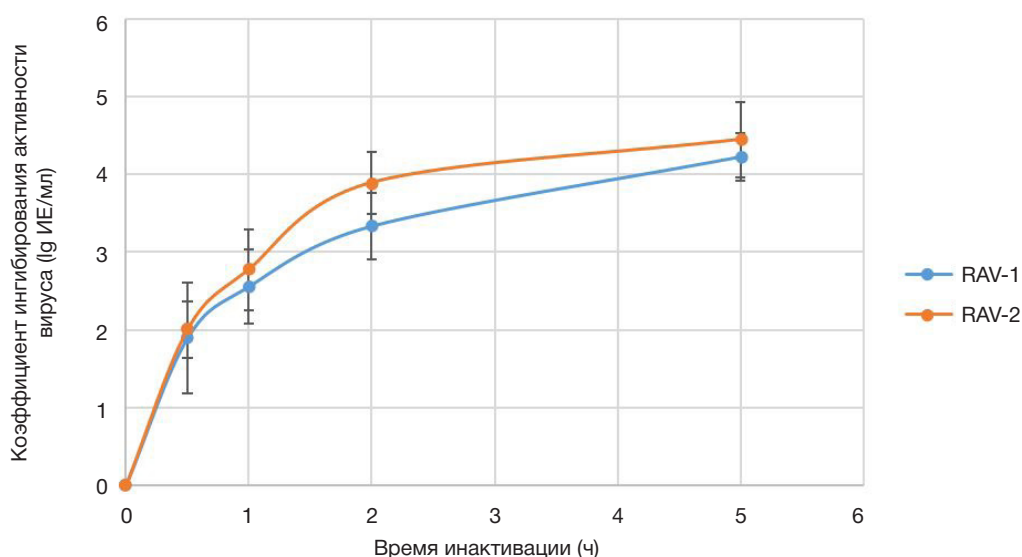


Рис. 2. Динамика инаktivации вируса лейкоза птиц штаммов RAV-1 и RAV-2 при действии УФ-излучения

производства инаktivированных гриппозных вакцин различных компаний, например ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, Novartis, GSK, ID Biomedical Corp of Quebec [14–16].

ВЫВОДЫ

В результате исследования выявлено, что минимальное время инаktivирования аллантоисной жидкости, содержащей вирус лейкоза птиц, с использованием β -пропиолактона при получении гриппозных вакцин составляет 12 ч, что гарантированно снижает нагрузку

вируса лейкоза птиц на 4 lg IE/мл. В случае использования УФ-излучения для инаktivации вирусных концентратов время инаktivации должно составлять не менее 5 мин экспозиции, что снижает нагрузку вируса лейкоза птиц на 4 lg IE/мл. Такие схемы инаktivации позволяют гарантированно обеспечить полноту инаktivации аденовируса и вируса лейкоза птиц добиться должного уровня безопасности при производстве гриппозных вакцин в отношении указанных контаминантов. Следующим этапом работы будет изучение кинетики инаktivации микоплазм различными инаktivаторами в процессе получения гриппозных вакцин.

Литература

1. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) Guideline on Influenza vaccines — Quality module, 2017.
2. Рекомендации по производству и контролю вакцины против гриппа инаktivированной, Приложение 3 серии технических докладов ВОЗ № 927, 2005.
3. Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol.* 2019; 29 (6): e2074.
4. Савина Н. Н., Екимов А. А., Трухин В. П., Евтушенко А. Э., Жиренкина Е. Н., Синегубова Е. О. и др. Оценка методов инаktivирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2021; (3): 84–9.
5. Плотников В. А., Гребенникова Т. В., Дудникова Е. К., Шульпин М. И., Лазарева С. П., Никонова З. Б., и др. О распространении вируса лейкоза птиц в птицеводческих хозяйствах на территории России. *Сельскохозяйственная биология.* 2013; 6: 36–42.
6. Bister K, Varmus HE, Stavnezer E, Hunters E, Vogt PK. Biological and biochemical studies on the inactivation of avian oncoviruses by ultraviolet irradiation. *Virology.* 1977; 77 (2): 689–704.
7. 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.
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. 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.
10. Руководство по исследованию валидации вирусной очистки: проектирование, вклад и интерпретация исследований, использующих инаktivацию и удаление вирусов, ЕМА СРМР/ВВР/268/95, 1996.
11. Фреши Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство. Пер. 5-го англ. изд. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2018; 691 с.
12. Li Xue, Dong Xuan, Sun Xiaolong, Li Weihua, Zhao Peng, Cui Zhizhong, Wang Xin. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine.* 2013; 31 (46): 5479–85.
13. Zavala, Guillermo, Sunny Cheng. Detection and Characterization of Avian Leukosis Virus in Marek's Disease Vaccines. *Avian Diseases.* 2006; 50 (2): 209–15.
14. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. Патент США № US6986808P. 18.03.2008.
15. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. Патент США № US18247600P. 15.02.2000.
16. 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., Араkelов 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). Способ получения антигена или антигенов для производства противогриппозной вакцины и вакцина на его основе. Патент РФ № RU2019118695A. 14.06.2019.

References

1. EMA/CHMP/BWP/310834/2012 Rev.1 Committee for Medicinal Products for Human use (CHMP) Guideline on Influenza vaccines — Quality module, 2017.
2. Rekomendacii po proizvodstvu i kontrolyu vakciny protiv grippa inaktivirovannoj, Prilozhenie 3 serii texnicheskix dokladov VOZ # 927, 2005. Russian.
3. Sabbaghi A, Miri SM, Keshavarz M, Zargar M, Ghaemi A. Inactivation methods for whole influenza vaccine production. *Rev Med Virol.* 2019; 29 (6): e2074.
4. Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, Evtushenko AE, Zhirenkina EN, Sinigubova EO. Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines. *Extreme Medicine.* 2021; (3): 84–9.
5. Plotnikov VA, Grebennikova TV, Dudnikova EK, Shulpin MI, Lazareva SP, Nikonova ZB, i dr. O rasprostraneni virusa lejkoza ptic v pticevodcheskix xozyajstvax na territorii Rossii. *Sel'skoxozyajstvennaya biologiya.* 2013; 6: 36–42. Russian.
6. Bister K, Varmus HE, Stavnezer E, Hunters E, Vogt PK. Biological and biochemical studies on the inactivation of avian oncoviruses by ultraviolet irradiation. *Virology.* 1977; 77 (2): 689–704.
7. 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.
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. 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.
10. Rukovodstvo po issledovaniyu validacii virusnoj ochistki:

- proektirovanie, vklad i interpretaciya issledovanij, ispol'zuyushhix inaktivaciyu i udalenie virusov, EMA CPMP/BWP/268/95, 1996. Russian.
11. Freshni RYa. Kul'tura zhivotnyx kletok: prakticheskoe rukovodstvo. Per. 5-go angl. izd. M.: BINOM. Laboratoriya znaniy, 2018; 691 s. Russian.
 12. Li Xue, Dong Xuan, Sun Xiaolong, Li Weihua, Zhao Peng, Cui Zhizhong, Wang Xin. Preparation and immunoprotection of subgroup B avian leukosis virus inactivated vaccine. *Vaccine*. 2013; 31 (46): 5479–85.
 13. Zavala, Guillermo, Sunny Cheng. Detection and Characterization of Avian Leukosis Virus in Marek's Disease Vaccines. *Avian Diseases*. 2006; 50 (2): 209–15.
 14. Haussmann C, Hauschild F, Jobst B, Novartis AG. Improvements in preparation of influenza virus vaccine antigens. Патент США № US6986808P. 18.03.2008.
 15. Burt DS, Jones DH, Lowell GH, White GL, Torossian K, Fries LF. ID Biomedical Corp of Quebec. Proteosome influenza vaccine. Патент США № US18247600P. 15.02.2000.
 16. Truhin VP, Evtushenko AJe, Krasilnikov IV, Savina NN, Bykov DG, Ujba SV, Vasilev AN, Ryskova EV, Nacharova EP, Arakelov SA, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe predpriyatie «Sankt-Peterburgskij nauchno-issledovatel'skij institut vakcin i syvorotok i predpriyatie po proizvodstvu bakterijnyx preparatov» Federal'nogo mediko-biologicheskogo agentstva (FGUP SPbNIIVS FMBA Rossii). Sposob polucheniya antigena ili antigenov dlya proizvodstva protivogrippoznoj vakciny i vakcina na ego osnove. Patent RF # RU2019118695A. 14.06.2019. Russian.