

БИОЛОГИЯ

УДК: 636.089.59 : 579.842

DOI:

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ИНАКТИВАЦИИ ВИРУСА ПОДТИПА А/Н5 ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ КАЧЕСТВА ВАКЦИН В ПТИЦЕВОДСТВЕ КАЗАХСТАНА**^{1,2}Яманова Екатерина Сергеевна**
магистр-соискатель**²Сазыкулова Гульбайра Джолдошбековна**
кандидат биологических наук, доцент**¹Асанжанова Нурика Нарынбековна**
кандидат медицинских наук**¹Акмырзаев Нурлан Жарылкасынулы**
магистр ветеринарных наук**¹Мырзахметов Елдос Туребаевич**
магистр биологических наук**^{1,2}Сидихов Расул Бекжасарович**
магистр-соискатель**КАЗАКСТАНДАГЫ ВАКЦИНАЛАРДЫН САПАТЫН ЖОГОРУЛАТУУ УЧУН КАНАТТУУ ЧАРБАЧЫЛЫГЫНДА А/Н5 ПОДТИПИНДЕГИ ВИРУСУН ИНАКТИВАЦИЯЛОО ПРОЦЕССИН ОПТИМИЗАЦИЯЛОО****Яманова Екатерина Сергеевна**
магистр-изденүүчү**Сазыкулова Гульбайра Джолдошбековна**
биология илимдеринин кандидаты, доцент**Асанжанова Нурика Нарынбековна**
медицина илимдеринин кандидаты**Акмырзаев Нурлан Жарылкасынулы**
ветеринария илимдеринин магистри**Мырзахметов Елдос Туребаевич**
биология илимдеринин магистри**Сидихов Расул Бекжасарович**
магистр-изденүүчү**OPTIMIZATION OF THE INACTIVATION PROCESS OF THE A/H5 VIRUS SUBTYPE TO IMPROVE VACCINE QUALITY IN POULTRY FARMING IN KAZAKHSTAN****Yamanova Ekaterina Sergeevna**
master's degree candidate**Sazykulova Gulbaira Djoldoshbekovna**
candidate of biological sciences, docent**Assanzhanova Nurika Narynbekovna**
candidate of medical sciences**Akmyrzaev Nurlan Zharylkhasynuly**
master of veterinary sciences**Myrzakhmetov Yeldos Turebaevich**
master of biological sciences**Sidikhov Rassul Bekzhasarovich**
master's degree candidate

¹ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»,
АО Национальный холдинг «QazBioPharm», Жамбылская область, Кордайский район, пгт.
Гвардейский, ул. Б. Момышулы 15, 080409, Республика Казахстан

²Кыргызский государственный университет им. И. Арабаева

Аннотация. В исследовании сравнивается влияние условий химической инактивации с использованием формалина и β -пропиолактона на вирус гриппа птиц подтипа А/Н5. Цель работы - выявление условий, обеспечивающих полную инактивацию вирусосодержащей суспензии при сохранении антигенной активности с применением формалина в конечных концентрациях 0,05 % и 0,1 %, а также β -пропиолактона в конечных концентрациях 0,025 % и 0,05 %. Оптимальные условия инактивации для исследуемой вирусосодержащей суспензии составили: формалин 0,05 % через 16 часов при $37 \pm 0,5$ °C и β -пропиолактон 0,025 % через 4 часа, при температуре $4 \pm 0,5$ °C. В опыте на цыплятах установлено, что введенный антиген, инактивированный при оптимальных условиях, вызывает нарастание титров специфических антител. Полученные данные демонстрируют возможность оптимизации процесса инактивации с учётом различной чувствительности штаммов вируса к инактивантам при разработке эффективных вакцин против гриппа птиц.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц, оптимизация, инактивация, антигенная активность, β -пропиолактон, формалин.

Аннотация. Изилдөөдө формалин жана β -пропиолактон колдонуу менен химиялык инактивдөөнүн шарттарынын А/Н5 канаттуу тумоо вирусуна тийгизген таасири салыштырылган. Изилдөөнүн максаты- вирустук суспензияны толук инактивдөөдөн өткөрүп, антигендик активдүүлүгүн сактоого шарт түзүү, формалиндин акыркы концентрациялары 0,05 % жана 0,1 %, ошондой эле β -пропиолактондун акыркы концентрациялары 0,025 % жана 0,05 % колдонуу менен аныктоо. Изилденген вирус штаммы үчүн оптималдуу шарттар төмөнкүчө болду: формалин 0,05 % - 16 саатта, температурасы $37 \pm 0,5$ °C жана β -пропиолактон 0,025 % - 4 саатта, температурасы $4 \pm 0,5$ °C. Изилдөө жүрүп жаткан канаттуулардагы экспериментте, оптималдуу шартта инактивделген вирус штаммы спецификалык антителолордун титрин жогорулаткандыгы белгиленди. Алынган маалыматтар боюнча вирус штаммдарынын инактиванттарга карата ар кандай сезгичтигин эске алуу менен инактивдөөнүн процессин оптималдаштырууга жана канаттуулардын тумоосуна каршы эффективдүү вакциналарды иштеп чыгууга мүмкүнчүлүк көрсөтөт.

Негизги сөздөр: канаттуулардын тумоо вирусу, оптимизациялоо, инактивациялоо, антигендик активдүүлүк, β -пропиолактон, формалин.

Abstract. The study compares the effects of chemical inactivation conditions using formalin and β -propiolactone on the avian influenza virus subtype A/H5. The aim of the study was to identify conditions that ensure complete inactivation of the virus-containing suspension while preserving antigenic activity, using formalin at final concentrations of 0,05 % and 0,1 %, and β -propiolactone at final concentrations of 0,025 % and 0,05 %. The optimal conditions for the studied virus-containing suspension were: 0,05 % formalin for 16 hours at $37 \pm 0,5$ °C, and 0,025 % β -propiolactone for 4 hours at $4 \pm 0,5$ °C. In experiments on chicks, it was found that the virus-containing suspension inactivated under optimal conditions induced an increase in titers of specific antibodies. The results demonstrate the possibility of optimizing the inactivation process, taking into account the different sensitivities of virus strains to inactivating agents, for the development of effective vaccines against avian influenza.

Key words: avian influenza virus, optimization, inactivation, antigenic activity, β -propiolactone, formalin.

Введение

Вирусы гриппа птиц (далее - ВГП) являются остроконтагиозными, эпидемиологически опасными, зоонозными патогенами, способными вызывать высокую заболеваемость и смертность среди птиц, животных и человека [1]. ВГП остаётся одним из наиболее изученных патогенов, однако существующие методы контроля требуют постоянного совершенствования из-за высокой генетической изменчивости вируса: частые антигенные дрейфы и шифты поверхностных гликопротеинов, а также реассортация приводят к изменению генома, влияя на вирулентность, спектр хозяев и необходимость регулярного обновления вакцин. Клиническое проявление заболевания зависит от вида и возраста птицы, а также от свойств штамма и условий содержания. Основным природным резервуаром вируса являются дикие водоплавающие птицы, передающие инфекцию домашнему поголовью [2,3].

На протяжении длительного времени среди домашних и диких птиц циркулируют высокопатогенные и низкопатогенные вирусы гриппа А, преимущественно подтипов H5 и H7, а также другие субтипы с различными комбинациями гемагглютининов H1-H18 и нейраминидаз N1-N11 [4]. Высокопатогенный ВГП (ВВГП) неоднократно вызывал массовые эпизоотии в разных странах, приводя к значительной гибели и уничтожению поголовья [5,6]. Через Казахстан ежегодно мигрирует до 50 миллионов птиц, что способствует проникновению вирусов из Европы, Азии и Африки [7]. Вспышки ВГП (H5) у диких птиц были зафиксированы в 2005 и 2020–2021 годах в северном Казахстане, в 2006, 2021 и 2023–2024 годах в западных регионах страны, единично в 2015 и 2022 году. Среди домашней птицы очаги заболевания регистрировались в 2020–2021 годах преимущественно в северных областях [8–10]. В 2025 году в ряде птицеферм Казахстана продолжали регистрироваться вспышки с высокой смертностью и снижением продуктивности среди домашней птицы, вызванные циркуляцией ВВГП [11].

ВГП также представляет угрозу для общественного здравоохранения из-за своего зоонозного потенциала, приводя к тяжелым

заболеваниям у людей. По данным Всемирной организации здравоохранения, в период с 2003 по 2025 год в 25 странах было зарегистрировано 976 подтвержденных случаев заражения человека вирусом гриппа птиц подтипа А/Н5, из которых 470 завершились летальным исходом [12]. В связи с высокой эпидемиологической и социально-экономической значимостью ВГП особое внимание уделяется разработке и применению эффективных профилактических мер, направленных на предупреждение распространения инфекции, прежде всего в птицеводческих хозяйствах.

При производстве инаktivированных вакцин против гриппа птиц используют формалин и β -пропиолактон, которые при оптимальных условиях полностью устраняют вирулентность вируса, сохраняя его антигенную активность; правильный выбор инаktivанта с учётом особенностей штамма и условий обработки является ключевым для обеспечения качества инаktivированных вакцин [13,14]. В то же время β -пропиолактон проявляет высокую инаktivационную активность при более коротких режимах, оказывая менее выраженное воздействие на структуру антигенных эпитопов, хотя также может вызывать модификации белков при длительном контакте с агрессивным реагентом [15, 16]. Концентрация и температура инаktivации существенно влияют на сохранение антигенной активности и последующий иммунный ответ, поэтому оптимизация этих параметров является критическим этапом разработки безопасных и эффективных инаktivированных вакцин [17].

В птицеводстве Республики Казахстан для профилактики гриппа птиц преимущественно применяются инаktivированные вакцины, зарегистрированные в Государственном реестре ветеринарных препаратов. В качестве инаktivантов при их производстве широко используют формалин и β -пропиолактон, что обуславливает актуальность исследования и сравнительной оценки этих химических инаktivантов в отношении циркулирующих штаммов вируса [18]. Учитывая ограниченное производство отечественных высококачественных инаktivированных вакцин против гриппа птиц в Казахстане, целью настоящего исследования является

определение оптимальных условий инактивации вируса гриппа птиц подтипа А/Н5 с использованием формалина и β -пропиолактона при максимальном сохранении антигенных свойств инаktivированного материала.

Материалы и методы

Вирус и реагенты

В исследовании использовали вирус-содержащую суспензию (ВСС) подтипа А/Н5 (штамм А/chicken/Akmola/KZ/62/2021, H5N8) с исходной инфекционной активностью $8,08 \pm 0,14 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, освеженную и наработанную на 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Выбор штамма обусловлен его эпизоотической значимостью и статусом приоритетного кандидата для производства вакцин против гриппа птиц подтипа А/Н5 в Казахстане.

Для оценки эффективности инаktivации применялись два химических агента: формалин и β -пропиолактон, выбранные из-за особенностей и преимуществ при получении безопасных инаktivированных материалов [19]. Расчёт приготовления рабочих растворов формалина (5 %), β -пропиолактона (5 %), тиосульфата натрия (25 %) и тиомерсала (10 %) выполнен с использованием стандартной формулы разведения $M_1V_1 = M_2V_2$ [20]. Тиосульфат натрия использовали для прекращения процесса инаktivации, а тиомерсал в качестве консерванта.

Установление оптимальных условий инаktivации ВСС

Инаktivация выполнялась с конечными концентрациями формалина 0,05 % и 0,1 %, а β -пропиолактона - 0,025 % и 0,05 %, согласно опубликованным данным и рекомендациям [21-25]. Перед добавлением формалина температуру ВСС доводили до $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$, что соответствует оптимальному режиму для инаktivации ВСС без разрушения антигенных белков. Инаktivация формалином проводилась до 24 ч. с двухчасовым интервалом отбора проб. Инаktivация β -пропиолактоном выполнялась при $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$ в течение 8 ч., с отбором проб каждые 2 ч., учитывая более высокую скорость инаktivации [26]. Далее ВСС отфильтровывали с помощью вакуумной фильтрующей системы (0,22 мкм.). После при постоянном перемешивании добавляли инаktivант.

Определение стерильности инаktivированного антигена

Стерильность инаktivированного антигена оценивали методом прямого посева в мясо-пептонный агар и бульон, жидкую тиогликолевую среду и среду Сабуро твердую и жидкую. Антиген вносили в объёме до 10 % от объёма среды и инкубировали при температурах, рекомендованных для роста микроорганизмов соответствующих сред, согласно ГОСТ 28085-2013.

Определение pH инаktivированного антигена.

pH инаktivированного антигена измеряли потенциометрическим методом с калиброванным pH-метром в соответствии с ГОСТ ISO 10523-2017. Электрод калибровали стандартными буферными растворами с pH 4,00 и 7,00 при комнатной температуре. Перед измерением образец перемешивали, электрод погружали в инаktivированный антиген до стабилизации показаний (30-60 секунд). Измерения проводили в трех повторностях, результаты фиксировали с точностью до $\pm 0,01$ pH.

Оценка полноты инаktivации вирусосодержащей суспензии

Для подтверждения отсутствия жизнеспособного вируса проводили заражение 10-суточных РКЭ в аллантоисную полость по $0,2 \text{ см}^3$. Погибшие эмбрионы в первые 24 часа отбраковывали как неспецифически погибшие, оставшиеся инкубировали 72 часа при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. После охлаждения ($2-8^\circ\text{C}$, ≥ 10 ч.) наличие вируса проверяли с помощью микрометода реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1 % взвеси эритроцитов петуха [27].

Оценка сохранности антигенных свойств

Экспериментальная и контрольная группы включали по 10 цыплят, содержащихся в одинаковых условиях с соблюдением этических норм и требований к оценке иммунного ответа [28]. Цыплятам экспериментальной группы вводили по $0,5 \text{ см}^3$ инаktivированного антигена в грудную мышцу с последующей оценкой выработки специфических антител. С целью оценки формирования и динамики гуморального иммунного ответа у подопытных цыплят 2- месячного возраста, отбор проб крови осуществляли на 7, 14, 21 и 28-е сутки после введения, с последующим

определением уровня специфических антигенов в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), учитывая предел чувствительности метода. Средний титр антигенов рассчитывали путём суммирования индивидуальных показателей с последующим делением на количество животных [21,11]. Для проверки статистической достоверности различий между группами применялся t-тест Стьюдента [29].

Результаты и обсуждение

Инактивация вирусосодержащей суспензии формалином

Для установления оптимальных параметров инактивации ВСС использовали растворы формалина с конечными концентрациями 0,05 % и 0,1 % при температуре $37 \pm 0,5$ °C.

Результаты (рис. 1) показали, что ВСС полностью утрачивает инфекционную активность при обработке формалином: при

0,05 % - через 16 ч., при 0,1 % - через 8 ч., что демонстрирует зависимость скорости инактивации от концентрации реагента. Оптимальные условия инактивации с использованием формалина определены как конечная концентрация 0,05 %. В этих условиях вирус полностью терял инфекционную активность через 16 часов. При том его гемагглютинирующая активность при конечной концентрации 0,05 % остаётся стабильной на протяжении периода исследования, при конечной концентрации 0,1 % значительно снижается. По результатам контроля качества pH инаktivированный антиген соответствовал нейтральному диапазону, рекомендованному Руководством Всемирной организации по охране здоровья животных по диагностическим тестам и вакцинам. В ходе эксперимента признаков бактериальной или грибковой контаминации в образцах не выявлено [30].

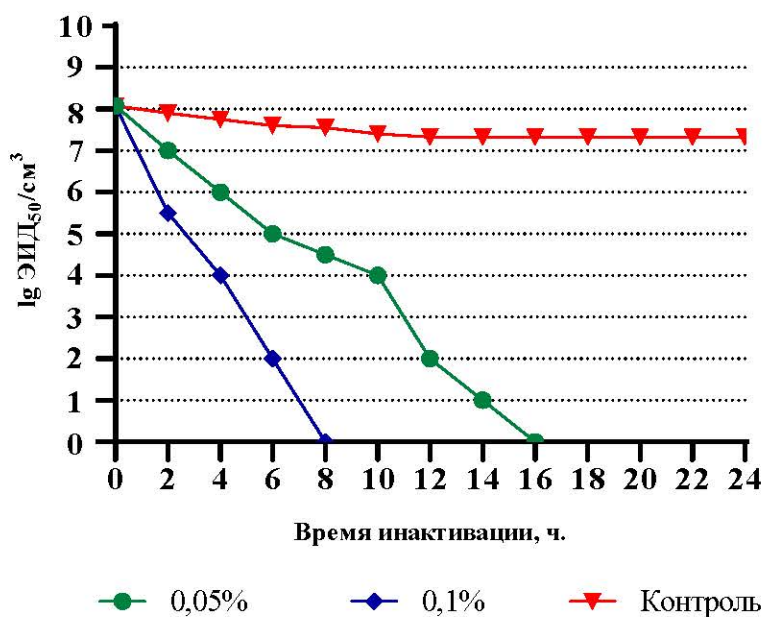


Рисунок №1. Динамика изменения инфекционной активности вирусосодержащей суспензии под действием формалина в зависимости от времени инактивации

Инактивация вирусосодержащей суспензии β-пропиолактоном

Для определения оптимальных параметров инактивации вирусосодержащей су-

спензии проводили серию экспериментов с использованием растворов β-пропиолактона с конечными концентрациями 0,025 % и 0,05 % при температуре $4 \pm 0,5$ °C.

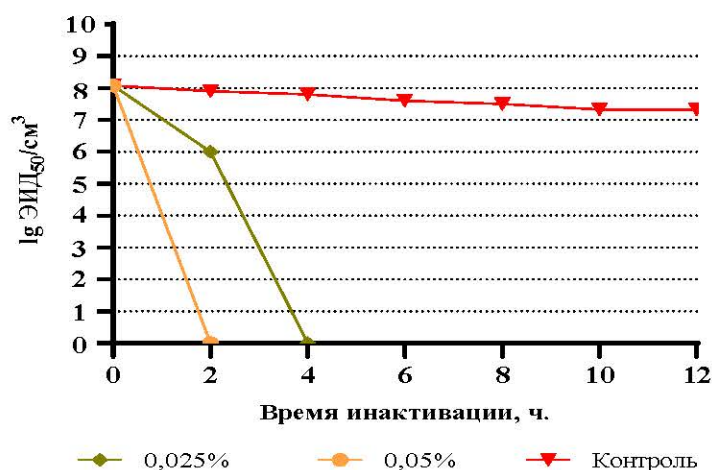


Рисунок №2. Динамика изменения инфекционной активности вирусосодержащей

суспензии под действием β-пропиолактона в зависимости от времени инаktivации

Результаты исследования показывают, что ВСС полностью утрачивает инфекционную активность при обработке β-пропиолактоном в концентрациях 0,025 % и 0,05 %, при этом инфекционная активность резко снижается уже в первые часы обработки (рис. 2). При инаktivации β-пропиолактоном pH антигена оставался также в нейтральном диапазоне, а образцы сохраняли стерильность.

Эффективность инаktivации вирусосодержащей суспензии

Инаktivация ВСС привела к полной утрате инфекционной активности, при этом гемагглютинирующая активность сохранялась в зависимости от условий обработки (таб. 1). Отсутствие репликации вируса подтверждалось отсутствием гибели заражённых РКЭ в течении всего периода инкубации. Гибель после 24 суток не отмечалась только в РКЭ заражённых антигеном, инаktivированным формалином в конечной концентрации 0,05 %. Таким образом, в остальных пробах полная инаktivация ВСС не была достигнута.

Таблица № 1. Результаты проверки инфекционной и гемагглютинирующей активности антигена на РКЭ

Наименование материала	Инфекционная активность, $\log_{10}$ ЭИД ₅₀ /см³	Гемагглютинирующая активность
Исходный неинаktivированный	7,33±0,29 (SD)	1:128
Инаktivированный формалином в конечной концентрации 0,05 % (через 16 часов)	0	1:128
Инаktivированный формалином в конечной концентрации 0,1 % (через 8 часов)	0	1:64
Инаktivированный β-пропиолактоном в конечной концентрации 0,025 % (через 4 часа)	0	1:64
Инаktivированный β-пропиолактоном в конечной концентрации 0,05 % (через 2 часа)	0	1:64

Изучение иммуногенных свойств инаktivированного антигена в эксперименте на цыплятах

Для оценки антигенного потенциала использовали вирусосодержащую суспензию, инаktivированную формалином в конечной концентрации 0,05 % в течение 16 ч., при которой гемагглютинирующая активность сохранялась. Материал вводили подопытным цыплятам внутримышечно в дозе 0,5 см³. Перед применением в опытах на цыплятах

полная инаktivация ВСС была подтверждена отдельным контролем полноты инаktivации: трехкратным пассаживанием на РКЭ (по 10 РКЭ на пробу), что позволяет оценить отсутствие репликации вируса. Результаты выработки специфических антител после введения инаktivированного антигена представлены графически на рис. 3

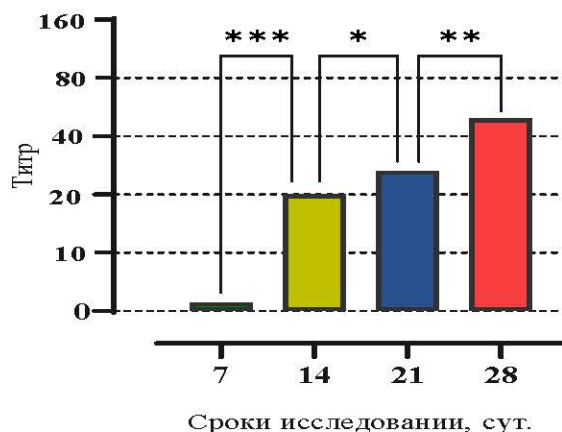


Рисунок № 3. Формирование накопления специфических антител в разные сроки после введения инаktivированного антигена

Формалин в конечных концентрациях (0,05 % и 0,1 %, 16 и 8 ч. соответственно) при температуре $37 \pm 0,5$ °C и β -пропиолактон в конечных концентрациях (0,025 % и 0,05 %, 4 и 2 ч. соответственно) при температуре $4 \pm 0,5$ °C полностью инаktivировали ВСС. При этом гемагглютинирующая активность сохранялась на исходном уровне только в образцах с формалином 0,05 %, что позволило оценить сохранность антигенного потенциала. Более высокие концентрации ускоряли инаktivацию, но снижали сохранность антигенных свойств. Результаты акцентируют важность проведения последующих исследований по расширению штаммового спектра, изучению различных химических инаktivантов и оптимизации концентрации, а также температуры для совершенствования этапа инаktivации при производстве вакцин против гриппа птиц [22,24].

Сравнение химических инаktivантов показало, что формалин и β -пропиолактон полностью инаktivировали вирусосодержащую суспензию подтипа A/H5 (штамм A/chicken/Akmola/KZ/62/2021, H5N8) при этом разли-

чаются по влиянию на антигенные структуры. Формалин вызывает ковалентное сшивание белков и нуклеиновых кислот, стабилизируя структуру вирионов и сохраняя антигенные детерминанты поверхностных белков, но может частично изменять их конформацию при повышенных концентрациях или длительном воздействии [14,16]. β -пропиолактон преимущественно алкилирует РНК вируса, препятствуя её репликации, при этом структура белков вирусной оболочки в целом сохраняется, что обеспечивает поддержание гемагглютинирующей активности и антигенного потенциала. Различия в механизмах действия этих инаktivантов определяют оптимальные условия их применения: формалин требует более длительного времени при умеренной концентрации, β -пропиолактон обеспечивает быструю инаktivацию при низких температурах и коротких интервалах контакта [13-17, 22]. Выбор инаktivанта должен учитывать баланс между скоростью инаktivации и сохранностью эпитопов, что является важным фактором для разработки безопасных и иммуногенных вакцин.

Заключение

Эффективность инактивации и сохранность антигенных свойств могут варьировать в зависимости от конкретного штамма вируса, что подтверждается результатами для штамма A/chicken/Akmola/KZ/62/2021. Для данного штамма оптимальными условиями признаны формалин в конечной концентрации 0,05 % через 16 часов при $37 \pm 0,5$ °C и β -пропиолактон в конечной концентрации 0,025 % через 4 часа при $4 \pm 0,5$ °C, при которых достигается полная инаktivация ВСС с наибольшей сохранностью антигенного потенциала. Применение формалина

0,05 % обеспечивает эффективную инаktivацию при сохранении антигенных свойств и может быть использовано в дальнейших исследованиях по разработке отечественных инаktivированных средств профилактики для птицеводства. Эти результаты имеют практическое значение для птицеводческой отрасли Казахстана, учитывая циркуляцию ВВГП в стране. Результаты подчеркивают актуальность дальнейших исследований по расширению штаммового спектра, изучению различных химических инаktivантов и оптимизации условий обработки, включая концентрацию и температуру, для совершенствования этапа инаktivации при производстве вакцин против гриппа птиц.

Благодарность

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории «Профилактика инфекционных болезней» НИИПББ за оказанную помощь в проведении исследований, описанных в статье.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература:

1. Ашуров С. А., Рахимов А. Т. Грипп птиц. Вопросы эпизоотологии, диагностики и меры борьбы. // Мониторинг распространения и предотвращения особо опасных болезней животных и птиц : сб. материалов конф. - Самарканд, 2006. - С. 78.
2. Захарова О. И., Бурова О. А., Торопова Н. Н. и др. Высокопатогенный грипп птиц в мире: стратегии вакцинации (обзор) // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. - 2022. - Т. 23, № 3. - С. 295-296. - URL: <https://www.agronauka-sv.ru/jour/article/view/1041>
3. Webster R. G., Govorkova E. A. Continuing challenges in influenza // Annals of the New York Academy of Sciences. - 2014. - Vol. 1323, No. 1. - P.115-139.-URL:<https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/nyas.12462>
4. Alexander D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza // Vaccine. - 2007. - Vol. 25. - P. 5637-5644. -URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0264410X0601187X>
5. Centers for Disease Control and Prevention. Types of influenza viruses. - 2025. - URL: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses-types.html>
6. Кыдырбаев Ж. К., Табынов К. К., Хайруллин Б. М. Высокопатогенный грипп птиц: распространение в Казахстане и разработка средств специфической профилактики : Монография. - Алматы, 2015. - 110-115 с.
7. Abenova A.Z., Mukhanbetkaliyev Y.Y., Kadyrov A.S. et al. Environmental suitability of Kazakhstan to highly pathogenic avian influenza using data on Eurasian outbreaks, 2020-2024 // Viruses. 2025; Vol. 17(4):574. -URL: <https://www.mdpi.com/1999-4915/17/4/574?>
8. Sultankulova, K. T., Argimbayeva, T. U., Aubakir, N. A. et al. Reassortants of the Highly Pathogenic Influenza Virus A/H5N1 Causing Mass Swan Mortality in Kazakhstan from 2023 to 2024// Animals. - 2024. - Vol. 14(22). - No. 3211. - URL: <https://www.mdpi.com/2076-2615/14/22/3211>
9. Zikibayeva K.B., Svanbayev A.A., Akhmetsadykov N.N., et al. Epidemiological investigation of poultry infectious in Kazakhstan (2021-2024). Frontiers in Veterinary Science. 2025; 11:1520606. - URL: <https://www.frontiersin.org/journals/veterinary-science/articles/10.3389/fvets.2024.1520606/full>

10. Kydyrmanov A., Karamendin K., Kasymbekov E. et al. Mass mortality in terns and gulls associated with highly pathogenic avian influenza viruses in Caspian Sea, Kazakhstan. *Viruses*. 2024;16(11):1661. - URL: https://www.mdpi.com/1999-4915/16/11/1661?utm_source
11. Tabynov K., Kuanyshbek A., Zharmambet K. и др. Evaluation of commercial vaccines for efficacy and transmission control against the emergent H5N8 (clade 2.3.4.4b) avian influenza virus in Kazakhstan // *Virology*. - 2025. - Vol. 610. - 110601. - URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40516487/>
12. World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2025. - Geneva, 2025. - URL: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/h5n1-human-case-cumulative-table/cumulative-number-of-confirmed-human-cases-for-avian-influenza-a%28h5n1%29-reported-to-who--2003-2024764c52a9-15e4-49f6-b886-d706b9c549ed.pdf?>
13. She Y. M., Cheng K., Farnsworth A. Surface modifications of influenza proteins upon virus inactivation by β -propiolactone // *Proteomics*. - 2013. - Vol. 13, № 23-24. - P. 3537-3547. - URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4265195/>
14. Herrera-Rodriguez J., Signorazzi A., Holtrop M. et al. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production // *Vaccine*. - 2019. - Vol. 37, - No. 12. - P. 1630-1637. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19301847>
15. Mirjalili S. Z., Tamiji Z., Shirangi M. A GC-MS method for determination of β -propiolactone residues in inactivated Covid-19 vaccines // *Journal of Chromatographic Science*. - 2024. - Vol. 62, № 10. - P. 905-911. - URL: <https://academic.oup.com/chromsci/article/62/10/905/7758866>
16. Sanders B., Koldijk M., Schuitemaker H. Inactivated viral vaccines // *Vaccine Analysis: Strategies, Principles, and Control*. - 2015. - P. 45-80. - URL: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-662-45024-6>
17. Pawar S.D., Murtadak V.B., Kale S.D. et al. Evaluation of different inactivation methods for high and low pathogenic avian influenza viruses in egg-fluids for antigen preparation // *Journal of Virological Methods*. - 2015. - Vol. 222. - P. 28-33. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093415001883?via%3Dihub>
18. Государственный реестр ветеринарных препаратов и кормовых добавок Республики Казахстан. - Астана: Министерство сельского хозяйства РК, 2024. - URL: https://www.gov.kz/uploads/2024/12/20/533abe3fb4f1c5c21f7a4d4478365a7e_original.7280317.pdf?
19. Astill J., Alkie T., Yitbarek A. et al. Examination of the effects of virus inactivation methods on the induction of antibody- and cell-mediated immune responses against whole inactivated H9N2 avian influenza virus vaccines in chickens // *Vaccine*. - 2018. - Vol. 36, - No. 27. - P. 3908-3916. - URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0264410X1830759X>
20. Dilutions and Concentrations / Principles of Chemistry, Nassau Community College. - URL: https://chem.libretexts.org/Courses/Nassau_Community_College/Principles_of_Chemistry/11%3A_Solutions/11.04%3A_Dilutions_and_Concentrations
21. Кыдырбаев Ж., Асанжанова Н. Н., Нурпейсова А. С., и др. Испытание безвредности и иммуногенности производственных серий вакцины инактивированной против гриппа птиц из рекомбинантного штамма RG43A (H5N8) // Научный журнал «Биобезопасность и биотехнология». - 2021. - № 8. - С. 6-12. - URL: <https://journal.biosafety.kz/jour/article/view/4/5>
22. Mitsumata R., Yoshida K. Method for producing inactivated influenza vaccine and vaccine composition thereof: patent US 20230147269 A1. - 2023. - URL: <https://patents.google.com/patent/US20230147269A1>
23. Yu Y., Jie H., Zhu Y. et al. Avian influenza virus, inactivated vaccine and method for preparing same: patent CN 102816740 B. - 2014. - URL: <https://patents.google.com/patent/CN102816740B/en>

24. Elveborg S., Monteil V.M., Mirazimi A. Methods of Inactivation of Highly Pathogenic Viruses for Molecular, Serology or Vaccine Development Purposes // Pathogens. - 2022. - Vol. 11, № 2. - P. 271. - URL: <https://www.mdpi.com/2076-0817/11/2/271>
25. Egg-based and Cell-based influenza vaccine manufacturing methods. - Merck Millipore (Technical Article). - 2025. - URL: <https://www.merckmillipore.com/SI/en/technical-documents/technical-article/pharmaceutical-and-biopharmaceutical-manufacturing/vaccine-manufacturing/egg-based-cell-based-influenza-vaccine-manufacturing>
26. Inactivation of Risk Group-3 Agents for Transfer to BSL -2 Laboratories. - Environment, Health and Safety, Cornell University, 2025. - URL: <https://ehs.cornell.edu/research-safety/biosafety-biosecurity/biological-safety-manuals-and-other-documents/inactivation-risk-group-3-agents>
27. World Organisation for Animal Health (WOAH). Terrestrial Animal Health Code. Section 3.3. Chapter 3.3.4. Infection with avian influenza viruses (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses). - Paris, 2024. - URL: <https://sont.woah.org/portal/tool?le=>
28. World Organisation for Animal Health (WOAH). OIE Terrestrial Animal Health Code 2021 // Standards - World Organisation for Animal Health. - 2021. - URL: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2021/en_sommaire.htm
29. Student's t-test // Encyclopædia Britannica. - 2026. - URL: <https://www.britannica.com/science/Students-t-test>
30. World Organisation for Animal Health (WOAH). OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. - 5th ed., Office International des Épizooties, 2004. - URL: <https://studylibfr.com/doc/8717991/oie-manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestr>