

Оптимизация количественного определения гемагглютини́на вируса гриппа в первичном жидком стандартном образце методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией

Н.Л. Иванютина¹, С.И. Довбыш¹, Р.А. Волкова¹,
А.А. Екимов², Н.Н. Савина³, Е.С. Зайцева³, А.С. Минеро¹,
А.Ю. Бутырский¹, Е.Н. Морозова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Общество с ограниченной ответственностью «Нанолек», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

³ Федеральное государственное унитарное предприятие «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятия по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства, ул. Свободы, д. 52, г. Красное Село, Санкт-Петербург, 198320, Российская Федерация

✉ Иванютина Наталья Леонидовна; ivanutina@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. В отсутствие возможности использовать международный стандартный образец (СО) антигена и антисыворотку к нему для количественного определения содержания гемагглютини́на (ГА) вируса гриппа методом одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД), а также в условиях пандемии или другой чрезвычайной ситуации необходимы валидированные альтернативные методы для количественного определения ГА.

ЦЕЛЬ. Оптимизация методики аттестации первичного стандартного образца содержания гемагглютини́на вируса гриппа с использованием электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом с последующей денситометрической обработкой гелей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Содержание ГА (%) в СО определяли методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии натрия додецилсульфата (ДСН-ПААГ) в условиях воспроизводимости (2 лаборатории). Концентрацию ГА (мкг/мл) определяли с учетом содержания общего белка, которое определяли по методу Лоури. Метод ОРИД использовался для оценки правильности количественного определения ГА. Обработку изображений пластин, расчет квадратов диаметров колец преципитации и количества ГА в образцах проводили с помощью программного обеспечения CombiStats. Сахарозу и глицерин в вирусном и разведенном вирусном концентратах (РВК) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Добавление 0,072 мМ 2-меркаптоэтанола для обработки образцов позволяет исключить использование мочевины при проведении электрофореза в ДСН-ПААГ с дегикизированием. Результаты определения концентрации ГА в РВК методом электрофореза в ДСН-ПААГ при использовании 4–12% бис-трис гелей в лаборатории № 1 практически совпадают с результатами лаборатории № 2 (4–20% трис-глициновые гели) — 135,8 и 135,5 мкг/мл соответственно; значение коэффициента вариации не превышает 4% в обеих лабораториях. Концентрация ГА, определенная методом электрофореза

в ДСН-ПААГ в лаборатории № 1, сопоставима с данными ОРИД (123,6 мкг/мл). Содержание вспомогательных веществ (глицерин, сахароза) не превышает 55 мкг/мл в РВК и не влияет на результаты определения белка.

ВЫВОДЫ. Установлены оптимальные условия электрофореза в ДСН-ПААГ для аттестации первичного жидкого СО содержания ГА вируса гриппа, что позволяет получать результаты, сопоставимые с данными метода ОРИД. На следующем этапе исследования планируется апробация условий пробоподготовки и количественного определения всех типов ГА (H1N1, H3N2, В), актуальных в сезоне 2025–2026 гг.

Ключевые слова: гемагглютинин; вирус гриппа; ДСН-ПААГ; электрофорез; ОРИД; дегликозилирование; вакцина; стандартизация; стандартный образец

Для цитирования: Иванютина Н.Л., Довбыш С.И., Волкова Р.А., Екимов А.А., Савина Н.Н., Зайцева Е.С., Минеро А.С., Бутырский А.Ю., Морозова Е.Н. Оптимизация количественного определения гемагглютинаина вируса гриппа в первичном жидком стандартном образце методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей денситометрией. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2026. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00061-26-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Quantitative determination of influenza virus hemagglutinin in a primary liquid reference standard by polyacrylamide gel electrophoresis followed by densitometry: Method optimization

Natalia L. Ivanutina¹✉, Stepan I. Dovbysh¹, Rauza A. Volkova¹,
Aleksii A. Eкимov², Natalya N. Savina³, Elena S. Zaytseva³,
Anastasia S. Minero¹, Aleksey Yu. Butirskiy¹, Elena N. Morozova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd., Moscow 127051, Russian Federation

² Nanolek Limited Liability Company, 10 Testovskaya St., Moscow 123112, Russian Federation

³ Saint Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Sera and Enterprise for the Production of Bacterial Preparations, 52 Svoboda St., Krasnoe Selo 198320, Saint Petersburg, Russian Federation

✉ Natalia L. Ivanutina; ivanutina@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. In the absence of an international reference standard for the antigen and the corresponding antiserum for quantifying influenza virus hemagglutinin (HA) content by single radial immunodiffusion (SRID), as well as during pandemics or other emergencies, validated alternative methods for HA quantification are required.

AIM. Optimization of the method for certifying a primary reference standard for quantification of influenza virus hemagglutinin using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by densitometric analysis of the gels.

MATERIALS AND METHODS. The HA content (%) in the reference standard was determined by SDS-PAGE under reproducibility conditions (two laboratories). HA concentration (μg/mL) was calculated from the total protein content determined by the Lowry method. The SRID method was used to evaluate the accuracy of HA quantification. The CombiStats software was used for plate image processing, calculation of the squared diameters of precipitation rings, and determination of HA content in the samples. Sucrose and glycerol in the virus

concentrate and the diluted virus concentrate (DVC) were quantified by high-performance liquid chromatography.

RESULTS. When performing SDS-PAGE with deglycosylation, the addition of 0.072 mM 2-mercaptoethanol for sample processing eliminates the need for urea. The HA concentrations in DVC determined by SDS-PAGE using 4–12% Bis-Tris gels in Laboratory 1 (135.8 µg/mL) and 4–20% Tris-glycine gels in Laboratory 2 (135.5 µg/mL) were virtually identical; the coefficient of variation did not exceed 4% in either laboratory. The HA concentration determined by SDS-PAGE in Laboratory 1 was comparable to the SRID data (123.6 µg/mL). The content of excipients (glycerol and sucrose) in DVC did not exceed 55 µg/mL and did not affect the results of protein determination.

CONCLUSIONS. Optimal SDS-PAGE conditions were established for certifying a primary liquid reference standard for quantification of influenza virus HA, yielding results comparable to those of the SRID method. The next phase of the study will involve testing the sample preparation conditions and quantification methods for all HA types (H1N1, H3N2, and B) relevant to the 2025–2026 season.

Keywords: hemagglutinin; influenza virus; SDS-PAGE; electrophoresis; SRID; deglycosylation; vaccine; standardization; reference standard

For citation: Ivanutina N.L., Dovbysh S.I., Volkova R.A., Ekimov A.A., Savina N.N., Zaytseva E.S., Minero A.S., Butyrskiy A.Yu., Morozova E.N. Quantitative determination of influenza virus hemagglutinin in a primary liquid reference standard by polyacrylamide gel electrophoresis followed by densitometry: Method optimization. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2026. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734>

Funding. The study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00061-26-00 (R&D State Registration No. 124022200103-5).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусом гриппа ежегодно заболевают до 15% населения мира; ежегодно регистрируется до 500 000 смертельных случаев, связанных с заболеванием [1–3]. Массовая ежегодная вакцинация населения — наиболее эффективный метод профилактики гриппа. Уровень защиты большинства сезонных вакцин для профилактики гриппа достигает 75–90%. Вакцины против вируса гриппа являются в основном инактивированными и производятся с использованием штаммов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) примерно за 6–8 мес. до начала сезона заболеваемости. В состав вакцины обычно входят два подтипа штаммов вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и один или два штамма вируса гриппа В [1, 4].

Гемагглютинин (ГА) вируса гриппа — поверхностный белок и основной белок, индуцирующий защитные иммунные реакции; присутствие ГА в вакцине является по существу «маркером активности». Содержание ГА определяют методом одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД) [5], который основан на использовании

стандартных образцов (СО) ГА и соответствующей антисыворотки. Данные по СО ежегодно обновляются и распространяются центрами ВОЗ¹. Обычно их подготовка занимает 2–3 мес. с момента рекомендации новых штаммов.

Метод ОРИД используется главным образом для определения специфической активности инактивированных сезонных вакцин против гриппа, и для его постановки требуются штаммоспецифические реактивы. Процедура получения таких реактивов при смене штаммов задерживает выпуск первых серий вакцины на несколько месяцев. ВОЗ считает возможным использовать альтернативные методы количественного определения в случае недоступности реактивов для ОРИД². В качестве альтернативных рассматриваются такие методы анализа, как масс-спектрометрия [6–8], электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии натрия додецилсульфата (ДСН-ПААГ) в сочетании с денситометрией [9], иммуноферментный анализ, поверхностный плазмонный резонанс, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [10, 11]. Однако ни один

¹ Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2, TRS No. 932. WHO; 2004.

² Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated). Annex 3, TRS No. 927. WHO; 2005. Guidelines on regulatory preparedness for human pandemic influenza vaccines. Annex 2, TRS No. 963. WHO; 2007.

из перечисленных методов пока не одобрен уполномоченным органом для контроля вакцин из-за ряда недостатков [10, 12]. Стратегия использования альтернативных методов анализа должна гарантировать адекватную оценку антигенного состава вакцины против гриппа — специфичность и правильность определения содержания ГА каждого штамма, входящего в состав вакцины³.

Во время пандемии гриппа отсутствие доступных референтных материалов может повлиять на выпуск вакцин, что актуализирует использование валидированных методов количественного определения ГА в СО российских производителей. Под эгидой ВОЗ действует протокол калибровки сезонных и пандемических гриппозных антигенов⁴ с участием лабораторий четырех регуляторных органов. Протокол содержит рекомендации по калибровке первичного жидкого стандарта (разведенного вирусного концентрата, РВК), который аттестуют физико-химическими методами. Содержание ГА (мкг/мл) в РВК определяют с учетом содержания общего белка, определяемого по белковому азоту и/или методом Лоури; содержание ГА (%) определяется денситометрией электрофореграмм, полученных методом электрофореза в ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях, но конкретный алгоритм действий не указан. Затем из РВК готовят и аттестуют лиофилизированный СО. R. Harvey с соавт. [13] указывают на использование дегликозилирования для количественного определения ГА методом электрофореза в ДСН-ПААГ, поскольку в восстанавливающих условиях нуклеопротеин (NP) и матричный белок (М) не разделяются соответственно с субъединицами ГА1 и ГА2, так как обладают сходной подвижностью в геле. В случае отсутствия возможности использования международного СО антигена и антисыворотки к нему для количественного определения содержания ГА методом ОРИД необходимы фармакопейные стандартные образцы (ФСО) антигена ГА и сыворотки. Для аттестации ФСО стандартного антигена необходим РВК, аттестованный физико-химическими методами.

Цель работы — оптимизация методики аттестации первичного стандартного образца содержания гемагглютинаина вируса гриппа с использованием электрофореза в полиакриламидном геле с натрия додецилсульфатом с последующей денситометрической обработкой гелей.

Задачи исследования — оценка устойчивости методики определения содержания ГА методом электрофореза в ДСН-ПААГ; оценка сопоставимости результатов определения ГА методами электрофореза в ДСН-ПААГ и ОРИД; определение содержания вспомогательных веществ (глицерин, сахароза) в РВК и установления их влияния на определение концентрации белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: весы электронные GH-252 (A&D Company Ltd., Япония); pH/Ion-метр Seven Compact S220 (Mettler Toledo AG., КНР); камеры для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Lab, США) и XCell SureLock (Invitrogen, США); система гель-документирования ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad Lab); хроматограф Agilent 1290 с рефрактометрическим детектором (Agilent Technologies, США); хроматограф DionexICS 5000+ с импульсным амперометрическим детектором (Thermo Fischer Scientific, США); баня водяная WNB-10 (Mettler GmbH Co.Kg, Швейцария) с температурным режимом 56±0,5 °С; планшетный сканер ArtixSkan 1800 F (Microtek International Inc., КНР).

Материалы

Испытуемые образцы. РВК получены в ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России) при производстве стандартного антигена ГА [14] вируса гриппа шести штаммов:

A/Victoria/2570/2019 (H1N1),
A/Darwin/6/2021 (H3N2) IVR-227,
B/Austria/1359417/2021,
B/Phuket/3073/2021,
A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238,
A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A.

Вирусный концентрат (ВК) A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A, предоставленный ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (лаборатория № 2), использовали для получения соответствующего РВК. Для проведения исследований методом электрофореза в ДСН-ПААГ в ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (лаборатория № 1) из ВК был приготовлен модельный раствор с использованием 0,01 М фосфатно-солевого буферного раствора (ФСБ) с добавлением 0,137 моль/л NaCl и 0,0027 моль/л KCl.

³ Решение Совета ЕЭК от 4.07.2023 № 77 «О внесении изменений в Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза».

⁴ Expert committee on biological standardization. Generic protocol for the calibration of seasonal/pandemic influenza antigen working reagents by WHO essential regulatory laboratories. Geneva; 2011.

Концентрация белка в ВК (780 мкг/мл) превышает концентрацию белка в РВК (360 мкг/мл), полученного в лаборатории № 1 [14].

Для приготовления 12% гелей толщиной 0,75 мм использовали раствор 30% акриламида и бисакриламида 29:1 (кат. № 1610157, Bio-Rad); буферные растворы для приготовления разделяющего и концентрирующего гелей (кат. № 1610798, 1610799, Bio-Rad); персульфат аммония (кат. № A3678, Sigma-Aldrich, США); натрия додецилсульфат (кат. № 772000, CDH, Индия); тетраметилэтилендиамин (кат. № 1610800, Bio-Rad). В качестве электродного буферного раствора для трис-глициновых гелей использовали 10X Tris/Glycine/SDS Buffer (кат. № 1610772, Bio-Rad), для бис-трис гелей использовали NuPAGE MES SDS Running Buffer 20X (кат. № NP0002, Invitrogen, США) и NuPAGE Antioxidant (кат. № NP0005 Invitrogen); градиентные 4–12% бис-трис гели (кат. № NP0321, Invitrogen) и 4–20% Precast Protein Gels (кат. № PG42010, Solarbio, КНР).

Буферные растворы для обработки проб: 4X Laemmli Sample Buffer (кат. № 64505163, Bio-Rad) для некоммерческих гелей и гелей с градиентом концентрации 4–20%; NuPAGE LDS Sample Buffer 4X (кат. № NP0007, Invitrogen) для бис-трис гелей; 2-меркаптоэтанол – 2-МЭ (кат. № 64408840, Bio-Rad).

Для дегликозилирования использовали пептид-N-гликозидазу F (PNGase F) *Elizabethkingia meningoseptica* (кат. № G1549-50UN, Sigma Aldrich).

В качестве **маркера молекулярной массы** использовали Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards (кат. № 1610373, Bio-Rad).

Хроматографические колонки Asahipak NH2P-50 4E 250×4,6 мм, 5 мкм (кат. № F7630001, Shodex, Япония); CarboPacPA1 размером 4×250 мм (кат. № 035391, Thermo Fischer Scientific, США), с предколонкой CarboPacPA1 размером 4×50 мм (кат. № 057179, Thermo Fischer Scientific).

Для определения **содержания технологических примесей и стабилизаторов** использовали ацетонитрил (кат. № BJ438723, LeapChemCo, КНР), сахарозу (кат. № S7903, Sigma-Aldrich),

глицерин (кат. № 1280, NeoFroxx, Германия); 50% NaOH (кат. № 72064, Sigma Aldrich).

Стандартные растворы для ВЭЖХ.

Стандартный раствор № 1: раствор сахарозы и глицерина в 75% ацетонитриле в воде с конечной концентрацией каждого компонента 2 мг/мл. Калибровочные растворы готовили из исходного раствора путем разведения 75% раствором ацетонитрила в воде до необходимой концентрации. Концентрации сахарозы в калибровочных растворах составили 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 и 2,0 мг/мл, а глицерина – 0,50, 0,75, 1,0, 1,5 и 2,0 мг/мл. Стандартный раствор № 2: исходный раствор сахарозы и глицерина в воде с конечной концентрацией каждого компонента 1 мг/мл. Калибровочные растворы готовили из исходного путем разведения водой до необходимой концентрации. Концентрации сахарозы в калибровочных растворах составили 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл, а глицерина – 10, 20, 30, 40 и 50 мкг/мл. Стандартный раствор № 3: ФСО.3.3.00472 «Стабилизаторы углеводной природы (водный раствор)». Стандартный раствор № 4: кандидат в СО стабилизаторов углеводной природы, раствор в 75% ацетонитриле использовали без предварительной пробоподготовки.

Стандартные образцы и сыворотки для постановки ОРИД: Influenza antigen A/Victoria/2570/2019 (IVR-215) (H1N1)⁵; ФСО.3.2.00461⁶; Influenza Antigen A/Darwin/9/2021 (SAN-010) (H3N2)⁷; ФСО.3.2.00462⁸; Influenza reagent influenza antigen B/Austria/1359417/2021 (BVR-26)⁹; ФСО.3.2.00463¹⁰; Influenza reagent influenza antigen B/Phuket/3073/2013¹¹; ФСО.3.2.00464¹²; TGA reference antigen influenza virus haemagglutinin A/Victoria/4897/2022 (IVR-238)¹³; ФСО.3.2.00466¹⁴; TGA reference antigen influenza virus haemagglutinin A/Croatia/101236RV/2023 (NYMCX-425A)¹⁵; ФСО.3.2.00048¹⁶.

Методы

Сахарозу и глицерин определяли в образце ВК до стадии очистки по методике количественного определения стабилизаторов углеводной природы методом гидрофильной ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием [15].

⁵ Medicines & Healthcare products Regulatory Agency NIBSC code: 20/232.

⁶ Стандартная сыворотка A/Victoria/2570/2019 (H1N1) IVR-215 серия 001.

⁷ Medicines & Healthcare products Regulatory Agency NIBSC code: 21/320.

⁸ Стандартная сыворотка A/Darwin/6/2021 (H3N2) IVR-227 серия 001.

⁹ Medicines & Healthcare products Regulatory Agency NIBSC code: 20/316.

¹⁰ Стандартная сыворотка B/Austria/1359417/2021 BVR-26 серия 001.

¹¹ Medicines & Healthcare products Regulatory Agency NIBSC code: 16/158.

¹² Стандартная сыворотка B/Phuket/3073/2013 серия 001.

¹³ Department of Health and Aged Care (Therapeutic Goods Administration), Австралия, Lot: 2023/143B.

¹⁴ Стандартная сыворотка A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238 серия 001.

¹⁵ Department of Health and Aged Care (Therapeutic Goods Administration), Австралия, Lot: 2024/148B.

¹⁶ Стандартная сыворотка A/Croatia/101236RV/2023 (NYMCX-425A) серия 001-160425.

Содержание технологических примесей в ВК после стадии очистки определяли по методике количественного определения стабилизаторов углеводной природы методом ионообменной ВЭЖХ с амперометрическим детектированием [16, 17]. Для обработки хроматограмм использовали программное обеспечение OpenLab (Agilent Technologies) и Chromeleon (Thermo Fisher Scientific).

Содержание ГА (%) в ВК и РВК определяли электрофорезом в ДСН-ПААГ согласно ОФС.1.2.1.0023.15¹⁷ по методике производителя. В испытаниях участвовали два оператора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (лаборатория № 1) и два оператора ФГУП СПбНИИВС ФМБА России (лаборатория № 2). На основании полученных результатов рассчитывали концентрацию ГА (мкг/мл) с поправкой на концентрацию общего белка.

Концентрацию общего белка определяли по методу Лоури в соответствии с ОФС.1.2.3.0012.15¹⁸.

Для определения **содержания ГА методом электрофореза в ДСН-ПААГ** использовали методику ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, которая включает в себя следующие стадии: использование 4–20% градиентных гелей ручной заливки с толщиной 0,75 мм, 4× буферного раствора для обработки образцов (Sample Buffer, SB) с добавлением мочевины, 0,006 мМ 2-МЭ; дегликозилирование в присутствии PNGase F; осаждение белка ацетоном и центрифугированием 3 раза по 3 мин. В ходе работы время центрифугирования было увеличено до 30 мин; образцы прогревали при температуре 95 °С в течение 3 мин; в лунку геля вносили 5 мкг белка. Денситометрическая оценка полос ГА1 и ГА2 проводилась в процентах от содержания всех полос (lane %) ¹⁹ с дальнейшим суммированием сигналов ГА1 и ГА2 для определения содержания ГА (%).

Применяли следующие модификации методики: 1) 12% гели ручной заливки и толщиной 0,75 мм, 4X Laemmli SB, 0,072 мМ 2-МЭ, дегликозилирование в присутствии PNGase F, осаждение белка ацетоном и центрифугирование в течение 30 мин; 2) коммерческие бис-трис гели с градиентом концентрации 4–12% и толщиной 1 мм, NuPAGE LDS SB 4X, 0,072 мМ 2-МЭ,

дегликозилирование в присутствии PNGase F, осаждение белка ацетоном и центрифугирование в течение 30 мин.

Денситометрию гелей проводили с использованием системы ChemiDoc (Bio-Rad) и программного обеспечения ImageLab 6.0 (Bio-Rad).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Microsoft Office Excel: рассчитывали среднеарифметическое значение ($\bar{X}$), стандартное отклонение (S) и коэффициент вариации (CV). С помощью пакета программ Statistica 10 (StatSoft) оценивали статистическую значимость различий результатов определения ГА в лабораториях № 1 и 2, используя непараметрический критерий Манна – Уитни (U).

Количественное определение ГА методом ОРИД проводили в соответствии с ФС.3.3.1.0028.20²⁰. Принцип ОРИД заключается во взаимодействии ГА вируса гриппа (антиген), диффундирующего из лунок в агарозный гель в радиальном направлении, с гомологичными антителами стандартной сыворотки, находящимися в геле, и образовании колец преципитации, размеры которых находятся в прямой зависимости от количества антигена, содержащегося в испытуемом образце. Количественное определение проводили с использованием стандартного антигена производства аккредитованных центров ВОЗ. Обработку изображений пластин, расчет квадратов диаметров колец преципитации, расчет количества ГА в образцах (метод угловых коэффициентов) проводили с использованием программного обеспечения CombiStats v.70 (EDQM, Франция).

Дизайн исследования

При оценке содержания ГА для аттестации СО руководствовались рекомендациями ВОЗ²¹.

На первом этапе были проведены испытания по методике производителя в двух лабораториях с использованием РВК эпидемиологического сезона 2023 г. (штаммы A/Victoria/2570/2019 (H1N1), A/Darwin/6/2021 (H3N2) IVR-227, B/Austria/1359417/2021, B/Phuket/3073/2021, A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238).

На втором этапе для выяснения причин вариативности определяли содержание ГА с использованием РВК штамма A/Victoria/4897/2022

¹⁷ ОФС.1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁸ ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

¹⁹ <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10017218.pdf>

²⁰ ФС.3.3.1.0028.20 Вакцина гриппозная инактивированная. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. М.; 2018.

²¹ Generic protocol for the calibration of the calibration of seasonal and pandemic influenza antigen working reagents by WHO essential regulatory laboratories. Annex 5, TRS No. 927. WHO; 2013.

(H1N1) IVR-238, различных гелей (4–20% трис-глициновый гель, 4–12% бис-трис гель, 12% трис-глициновый гель) и вариантов пробоподготовки.

На третьем этапе определяли ГА в ВК и РВК штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A для подтверждения выбранных условий (табл. S1, онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²²).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Испытания РВК штаммов вируса гриппа

Результаты, полученные по методике производителя в двух лабораториях, представлены в таблице S2 (онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²³). Как видно из данной таблицы, различие результатов определения содержания ГА (%) методом электрофореза в ДСН-ПААГ в лабораториях № 1 и 2 достигало 5 и 13% для антигена подтипов А/Н3N2 и А/Н1N1 соответственно. Вариабельность результатов (значения относительного стандартного отклонения, CV) в лаборатории № 1 была выше, чем в № 2. Максимальное различие результатов определения концентрации ГА между лабораториями достигало 40 и 18 мкг/мл для антигена подтипов А/Н1N1 и А/Н3N2 соответственно (табл. S2).

Высокая вариабельность результатов определения ГА методом электрофореза в ДСН-ПААГ могла быть связана со следующими факторами: нестандартность процедуры ручной заливки градиентного геля; недостаточное время центрифугирования (3 мин) для осаждения белка при пробоподготовке, что привело к его потерям; сложность идентификации полос ГА в геле. Важно отметить, что необходимость концентрирования белка в РВК путем осаждения с последующим центрифугированием связана с его низкой концентрацией (0,30–0,35 мг/мл) и невозможностью внесения в лунку геля ≈30 мкл образца.

Правильность²⁴ оценивали путем сравнения результатов электрофореза в ДСН-ПААГ и метода ОРИД, предложенного J.M. Wood [5, 18, 19] и внедренного в 1978 г. в рутинную практику контроля гриппозных вакцин. Результаты определения концентрации ГА этими методами представлены в таблице S2. В отношении подтипа А (H1N1 и H3N2) результаты электрофореза в ДСН-ПААГ с дегликозилированием (две лаборатории) и результаты ОРИД суще-

ственно различаются. Концентрация ГА штамма A/Victoria/2570/2019 (H1N1) по данным электрофореза в ДСН-ПААГ составила 83,3±7,0 мкг/мл (лаборатория № 1) и 122,9±3,6 мкг/мл (лаборатория № 2); 99,0±5,9 мкг/мл (метод ОРИД). Концентрация ГА штамма A/Darwin/6/2021 (H3N2) IVR-227 по данным электрофореза в ДСН-ПААГ составила 101,5±9,7 мкг/мл (лаборатория № 1) и 119,9±4,9 мкг/мл (лаборатория № 2); 113,3±3,0 мкг/мл (метод ОРИД). Таким образом, на первом этапе были выявлены факторы, которые могут влиять на вариабельность полученных результатов.

Испытания антигена вируса гриппа

На втором этапе проведены сравнительные испытания различных модификаций методики электрофореза в ДСН-ПААГ (табл. S1) при использовании образцов РВК A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238, которые хранились с добавлением сахарозы до концентрации 5% после испытаний в 2023 г. С использованием методики производителя и 4–12% бис-трис гелей установлено содержание ГА 31,6% (104,6 мкг/мл) в 2023 г. (табл. S3, онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²⁵). В 2025 г. проведены испытания образцов в 12% трис-глициновых гелях. Апробировали 3 варианта обработки дегликозилированных образцов и вариант с увеличением времени центрифугирования до 30 мин (табл. S3–S4²⁶, рис. 1). Показано, что возможен также альтернативный вариант постановки методики с использованием 12% трис-глициновых гелей ручной заливки, однако вариабельность результатов определения содержания ГА в 2 раза больше по сравнению с использованием 4–12% бис-трис гелей. Результаты определения содержания ГА в 2025 г., близкие к результатам 2023 г., получены при увеличении концентрации 2-МЭ до 0,072 мМ и использовании 2×SB (рис. 1А, лунка 10). В таких условиях определяли содержание ГА в ВК A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A.

На втором этапе были подобраны оптимальные условия пробоподготовки для определения ГА методом электрофореза в ДСН-ПААГ, а именно: 4–12% бис-трис гели или 12% гели ручной заливки; время центрифугирования составило 30 мин при осаждении белка ацетоном; пробоподготовка образцов в восстанавливающих условиях (2×SB с добавлением 0,072 мМ 2-МЭ).

²² <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

²³ Там же.

²⁴ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

²⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

²⁶ Там же.

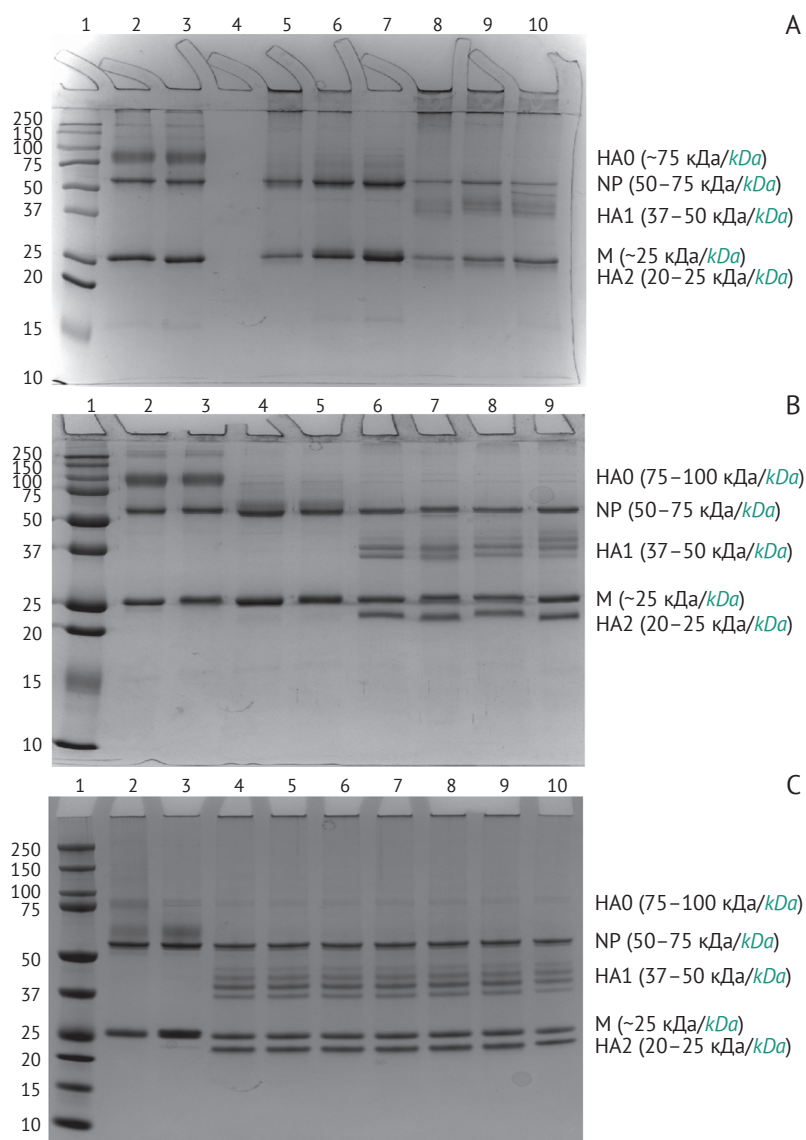


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure was prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Электрофореграмма образцов разведенного вирусного концентрата:

А – штамма A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238 в 12% полиакриламидном геле. Лунки: 1 – ММ; 2 – НВУ 2×SB; 3 – НВУ 4×SB; 4 – 2×SB; 5 – ВУ 0,006 мМ 2-МЭ, 4×SB; 6 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, 4×SB; 7 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, 2×SB; 8 – ВУ 0,006 мМ 2-МЭ, PNGase F, 4×SB; 9 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 4×SB; 10 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 2×SB;
В – штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A в 12% полиакриламидном геле. Лунки: 1 – ММ; 2 – НВУ 2×SB; 3 – НВУ 4×SB; 4 – ВУ 0,006 мМ 2-МЭ, 2×SB; 5 – ВУ 0,006 мМ 2-МЭ, 4×SB; 6 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 2×SB; 7 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 4×SB; 8 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 4×SB; 9 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 2×SB;
С – штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A в коммерческом бис-трис геле с градиентом концентрации 4–12%. Лунки: 1 – ММ; 2 – НВУ 4×SB; 3 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, 4×SB; лунки 4–10 – ВУ 0,072 мМ 2-МЭ, PNGase F, 2×SB.
НВУ – невозстанавливающие условия; ВУ – восстанавливающие условия; SB – буфер для обработки образцов; 2-МЭ – 2-меркаптоэтанол; PNGase F – N-гликозидаза F; ММ – маркер молекулярной массы; HA0 – нулевой гемагглютинин; HA1 – гемагглютинин 1; HA2 – гемагглютинин 2; NP – нуклеопротеин; М – матричный белок.

Fig. 1. A, SDS-PAGE gel image of samples of the diluted virus concentrate of the A/Victoria/4897/2022 (H1N1) IVR-238 strain in a 12% polyacrylamide gel. Wells: 1, MW; 2, NR 2×SB; 3, NR 4×SB; 4, 2×SB; 5, R 0.006 mM 2-ME, 4×SB; 6, R 0.072 mM 2-ME, 4×SB; 7, R 0.072 mM 2-ME, 2×SB; 8, R 0.006 mM 2-ME, PNGase F, 4×SB; 9, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 4×SB; 10, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 2×SB;
B, SDS-PAGE gel image of samples of the diluted virus concentrate of the A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A strain in a 12% polyacrylamide gel. Wells: 1, MW; 2, NR 2×SB; 3, NR 4×SB; 4, R 0.006 mM 2-ME, 2×SB; 5, R 0.006 mM 2-ME, 4×SB; 6, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 2×SB; 7, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 4×SB; 8, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 4×SB; 9, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 2×SB;
C, SDS-PAGE gel image of samples of the diluted virus concentrate of the A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A strain in a commercial 4–12% Bis-Tris gradient gel. Wells: 1, MW; 2, NR 4×SB; 3, R 0.072 mM 2-ME, 4×SB; wells 4–10, R 0.072 mM 2-ME, PNGase F, 2×SB.

NR, non-reducing conditions; R, reducing conditions; SB, sample buffer; 2-ME, 2-mercaptoethanol; PNGase F, N-glycosidase F; MW, molecular weight marker; HA0, uncleaved hemagglutinin; HA1, hemagglutinin subunit 1; HA2, hemagglutinin subunit 2; NP, nucleoprotein; M, matrix protein.

Определение гемагглютинаина штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2)

Выбранные условия пробоподготовки использовались при испытаниях ВК и РВК актуального в 2025 г. штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A. Дополнительно предусматривалось проведение испытаний ВК с внесением 0,072 мМ 2-МЭ перед дегликозилированием. ВК данного штамма разводили до концентрации белка 780 мкг/мл. Концентрация белка в РВК составила 360 мкг/мл. На рисунках 1В и 1С представлены изображения электрофореграмм; в таблицах S3–S5 и таблице 1 приведены результаты определения концентрации ГА в ВК и РВК штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A в следующих условиях: 12% ДСН-ПААГ, коммерческие гели с градиентом концентрации акриламида 4–20% и бис-трис гели с градиентом 4–12%.

Из рисунка 1В видно, что разделение субъединиц ГА зависит от концентрации вносимого в образцы 2-МЭ, этапа его внесения (до или после дегликозилирования белков) и концентрации SB. Внесение 0,072 мМ 2-МЭ в SB с последующим дегликозилированием позволяет получить лучшее разделение белковых полос в геле и является оптимальным вариантом пробоподготовки. В данных условиях четко визуализируются полосы ГА1 и ГА2, при этом на старте трека лунки 9 отсутствуют остатки белков, характерные для лунок 6, 7 и 8. Из рисунка 1С видно, что в варианте с использованием пробоподготовки с осаждением белка и геля с градиентом 4–12% (невосстанавливающие условия) хорошо визуализированы полосы мономера ГА, нуклеопротеина и матричного белка (лунка 2).

Постановка варианта методики с дегликозилированием в присутствии 0,072 мМ 2-МЭ и 2×SB показала оптимальное разделение белковых компонентов пробы: белковые полосы сконцентрированы, легко идентифицируемы в геле и пригодны для последующей денситометрической обработки. При электрофорезе проб, подготовленных без осаждения белка, разделение белковых полос оказалось хуже, чем с осаждением. Это связано с тем, что при концентрации общего белка ~0,3 мг/мл в РВК в лунку геля требуется вносить достаточно большой объем образца, ~30 мкл, что негативно влияет на разделение белков и визуализацию белковых полос (оптимальный объем образца составляет от 5 до 15 мкл). Исключение стадии осаждения белка упростило бы методику определения ГА,

но в этом случае необходимо увеличить содержание общего белка в РВК как минимум до ~0,5 мг/мл.

Содержание ГА в исследуемом ВК при использовании 4–12% бис-трис геля с осаждением и без осаждения белка достаточно близко — 40,8±0,8 и 38,4±0,9% соответственно (табл. S4, онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²⁷). Концентрация ГА в РВК составила 135,8 мкг/мл при использовании 4–12% бис-трис геля, что сопоставимо с данными ОРИД (123,6 мкг/мл), при этом значение CV не превышало 4% (табл. S5, онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²⁸). Таким образом, определение содержания ГА в РВК оптимально при использовании 4–12% бис-трис гелей, пробоподготовке в восстанавливающих условиях (2×SB в присутствии 0,072 мМ 2-МЭ) и включении стадий дегликозилирования и осаждения белка.

Результаты, полученные с использованием выбранных условий в лаборатории № 1 (4–12% бис-трис гели), оказались близки к результатам, полученным в лаборатории № 2 (4–20% трис-глицериновые гели ручной заливки); достоверных различий не выявлено ($U=346$, $p=0,81$) (табл. 1, рис. S1). Это свидетельствует о том, что методика устойчива при использовании 4–12% бис-трис гелей для подготовки образцов в SB с добавлением лития додецилсульфата и 4–20% трис-глицериновых гелей в SB с добавлением мочевины.

Таким образом, на третьем этапе провели определение ГА в ВК и РВК штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A, что позволило подтвердить выбор условий испытаний на втором этапе с использованием нового штамма, который актуален в эпидемиологическом сезоне 2025–2026 гг.

Определение концентрации белка и вспомогательных веществ в ВК и РВК

В ВК и РВК штамма A/Croatia/10136RV/2023/ (H3N2) NYMC-X-425A проведена оценка содержания белка и вспомогательных веществ — сахаразы и глицерина и их потенциального влияния на результаты определения белка. При проверке разрешающей способности хроматографической системы получены результаты, соответствующие ФСО.3.3.00472 [20] (табл. S6, онлайн-приложение опубликовано на сайте журнала²⁹). Для расчета концентрации ГА в ВК и РВК необходимо определить концентрацию общего белка. В образце ВК, разведенного в 17 раз, концентрация общего

²⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

²⁸ Там же.

²⁹ Там же.

Таблица 1. Содержание гемагглютинаина вируса гриппа в разведенном вирусном концентрате штамма A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A с учетом содержания общего белка

Table 1. Influenza virus hemagglutinin content in diluted virus concentrate of the A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A strain calculated from total protein content

Параметр <i>Parameter</i>	A/Croatia/10136RV/2023 (H3N2) NYMC-X-425A	
	Лаб. № 1, 4–12% бис-трис гель <i>Lab. 1, 4–12% Bis-Tris gel</i>	Лаб. № 2, 4–20% трис-глициновый гель <i>Lab. 2, 4–20% Tris-glycine gel</i>
Содержание общего белка (метод Лоури), мкг/мл <i>Total protein content (Lowry method), µg/mL</i>	360,0±5,6 ^a 1,5 ^b	350,0±22,0 6,3
Содержание гемагглютинаина, % от общего белка <i>Hemagglutinin content, % of total protein</i>	37,7±1,4 3,7	38,7±0,5 1,3
Концентрация гемагглютинаина, мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration, µg/mL</i>	135,8±5,0 3,7	135,5±2,0 1,5
Концентрация гемагглютинаина (ОРИД), мкг/мл <i>Hemagglutinin concentration (SRID), µg/mL</i>	123,6±11,3 9,16	Испытания не проводились <i>Not tested</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table was prepared by the authors using their own data

Примечание. ОРИД — одиночная радиальная иммунодиффузия.

^a Данные представлены как среднее арифметическое значение ± SD; SD — стандартное отклонение.

^b Коэффициент вариации, %.

Note. SRID, single radial immunodiffusion.

^a Data are presented as mean ± SD; SD, standard deviation.

^b Coefficient of variation, %.

белка составила 780 мкг/мл. Остаточное содержание сахарозы и глицерина, которые используются при производстве моновакцин гриппа в качестве стабилизаторов и консервантов, составило 12 мг/мл глицерина и 7,4 мг/мл сахарозы (по данным ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием). Остаточное содержание глицерина и сахарозы снизилось до 0,055 и 0,043 мг/мл соответственно благодаря дополнительной очистке и не влияло на результаты определения белка.

Таким образом, проведенные исследования позволили оптимизировать условия электрофореза в ДСН-ПААГ для определения содержания ГА в РВК с целью аттестации первичного СО, а именно увеличить время центрифугирования до 30 мин при осаждении белка ацетоном и использовать восстанавливающие условия для пробоподготовки (2×SB с добавлением 0,072 мМ 2-МЭ). Наша работа показала, что для аттестации первичного СО определение содержания ГА в РВК следует проводить не менее чем в двух лабораториях, при этом различие средних значений результатов определения содержания ГА между лабораториями не должно превышать 5%. В каждой лаборатории испытания должны проводить не менее чем два оператора.

Валидационные исследования оптимизированной методики показали, что значения CV при оценке прецизионности методики и правильность относительно результатов ОРИД не превышают 10%. Для исключения влияния

штаммовых различий на результат определения концентрации ГА оптимизированную методику планируется апробировать и валидировать для всех типов ГА (H1N1, H3N2, B).

ВЫВОДЫ

1. Установлены условия электрофореза в ДСН-ПААГ для аттестации первичного СО содержания ГА вируса гриппа: 4–12% бис-трис гели; 2X буферный раствор для образцов с добавлением 0,072 мМ 2-меркаптоэтанола; время центрифугирования при осаждении белка в образце увеличено с 3 до 30 мин; при концентрации белка в РВК ≥500 мкг/мл возможно проведение испытания методом электрофореза в ДСН-ПААГ без осаждения белка.
2. Оценена устойчивость методики при изменении гелей и буферных растворов для образцов. Оптимизация методики позволила повысить прецизионность результатов, что следует из снижения значения коэффициента вариации с 10 до 3,7%.
3. При оценке сопоставимости результатов определения концентрации ГА (мкг/мл) методом электрофореза в ДСН-ПААГ и методом ОРИД различие результатов определения ГА не превышает 10%.
4. Содержание глицерина и сахарозы в РВК не превышает 55 мкг/мл и не влияет на результаты определения общего белка по методу Лоури.

5. Планируется апробация выбранных условий пробоподготовки и количественного определения ГА всех актуальных в сезоне 2025–2026 гг.

подтипов (H1N1, H3N2, B), чтобы исключить влияние штаммовых различий на результат определения концентрации ГА.

Литература/References

1. Li C, Shao M, Cui X, et al. Application of deglycosylation and electrophoresis to the quantification of influenza viral hemagglutinins facilitating the production of 2009 pandemic influenza (H1N1) vaccines at multiple manufacturing sites in China. *Biologicals*. 2010;38(2):284–9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.12.004>
2. Chen J, Liu Y, Tseng Y, Ma C. Better influenza vaccines: An industry perspective. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):33. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-0626-6>
3. Poland GA, Rottinghaus ST, Jacobson RM. Influenza vaccines: a review and rationale for use in developed and underdeveloped countries. *Vaccine*. 2001;19(17–19):2216–20. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00448-5](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00448-5)
4. Simonsen L, Taylor RJ, Viboud C, et al. Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: An ongoing controversy. *Lancet Infect Dis*. 2007;7(10):658–66. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70236-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70236-0)
5. Wood JM, Schild GC, Newman RW, Seagroatt V. An improved single-radial immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: Application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J Biol Stand*. 1977;5(3):237–47. [https://doi.org/10.1016/S0092-1157\(77\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0092-1157(77)80008-5)
6. Minor PD. Assaying the potency of influenza vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015;3(1):90–104. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010090>
7. Creskey MC, Smith DG, Cyr TD. Strain identification of commercial influenza vaccines by mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2010;406(2):193–203. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.016>
8. Williams T, Pirkle J, Barr J. Simultaneous quantification of hemagglutinin and neuraminidase of influenza virus using isotope dilution mass spectrometry. *Vaccine*. 2012;30(14):2475–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.12.056>
9. Tarasov M, Shanko A, Kordyukova L, Katlinski A. Characterization of inactivated influenza vaccines used in the Russian National immunization program. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):488. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030488>
10. Engelhardt O, Edge C, Dunleavy U, et al. Comparison of single radial immunodiffusion, SDS-PAGE and HPLC potency assays for inactivated influenza vaccines shows differences in ability to predict immunogenicity of haemagglutinin antigen. *Vaccine*. 2018;36(29):4339–45. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.076>
11. Ekimov A, Arunachalam A, Blake T, et al. Assessing the stability-indicating properties of alternative potency assays for inactivated influenza vaccine. *Vaccine*. 2023;41(32):4639–47. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2023.06.051>
12. Hawksworth A, Jayachander M, Hester S, et al. Proteomics as a tool for live attenuated influenza vaccine characterization. *Vaccine*. 2020;38(4):868–77. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.082>
13. Harvey R, Michelle H, James SR, et al. Application of deglycosylation to SDS PAGE analysis improves calibration of influenza antigen standards. *Biologicals*. 2012;40(1):96–9. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.12.009>
14. Савина НН, Екимов АА, Трухин ВП и др. Тест-система для определения специфической активности вируса гриппа и способ получения препаратов к подтипам вируса гриппа типа А. Патент Российской Федерации № 2804067; 2023. Savina NN, Ekimov AA, Trukhin VP, et al. Test system for determining specific activity of influenza virus and method for its obtaining. Patent of the Russian Federation No. 2804067; 2023 (In Russ.). EDN: [ZSLHCA](https://patent.ru/2804067)
15. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах на основе метода ВЭЖХ с рефрактометрическим детектированием. *Химико-фармацевтический журнал*. 2024;58(3):54–9. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2024-58-3-54-59>
16. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of a method for quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biologics based on HPLC with refractometric detection. *Pharm Chem J*. 2024;58(3):512–8. <https://doi.org/10.1007/s11094-024-03172-4>
17. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Разработка методики ионообменной ВЭЖХ для количественного определения стабилизаторов углеводной природы в биологических лекарственных препаратах. *Химико-фармацевтический журнал*. 2023;57(4):59–64. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2023-57-4-59-64>
18. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Development of an ion-exchange HPLC technique for quantitative determination of carbohydrate stabilizers in biological medicinal products. *Pharm Chem J*. 2023;57(4):578–83 (In Russ.). <https://doi.org/10.1007/s11094-023-02923-z>
19. Минеро АС, Рунова ОБ, Коротков МГ, Устинникова ОБ. Определение стабилизаторов углеводной природы в биологически активных препаратах. Патент Российская Федерация № 2816030; 2024. Minero AS, Rounova OB, Korotkov MG, Ustinnikova OB. Determination of carbohydrate stabilizers in biologically active preparations. Patent of the Russian Federation No. 2816030; 2024 (In Russ.). EDN: [LWHOTF](https://patent.ru/2816030)
20. Wood JM, Weir JP. Standardisation of inactivated influenza vaccines – Learning from history. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018;12(2):195–201. <https://doi.org/10.1111/irv.12543>
21. Lai CC, Weng TC, Chen PL, et al. Development and characterization of standard reagents for cell-based pre-pandemic influenza vaccine products. *Hum Vaccin Immunother*. 2020;16(9):2245–51. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1721223>
22. Минеро АС, Рунова ОБ, Фадейкина ОВ и др. Разработка стандартного образца для количественной оценки стабилизаторов углеводной природы методом ионообменной ВЭЖХ. *Биомедицина*. 2025;21(1):26–33. Minero AS, Rounova OB, Fadeikina OV, et al. Certified reference material for quantitative evaluation of carbohydrate stabilizers by ion exchange HPLC. *Journal Biomed*. 2025;21(1):26–33 (In Russ.). <https://doi.org/10.33647/2074-5982-21-1-26-33>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» опубликованы *таблицы S1–S6 и рисунок S1*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Н.Л. Иванютина, С.И. Довбыш** — выполнение экспериментальных работ, обработка полученных данных, обсуждение результатов исследования, написание текста рукописи; **Р.А. Волкова** — формирование задач исследования, планирование эксперимента, обсуждение результатов исследования, написание и редактирование текста рукописи; **А.А. Екимов** — разработка методики; **Н.Н. Савина** — разработка методики, редактирование текста рукописи; **Е.С. Зайцева** — разработка методики; **А.С. Минеро, А.Ю. Бутырский, Е.Н. Морозова** — выполнение экспериментальных работ, обработка полученных данных.

Использование генеративного искусственного интеллекта. Авторы заявляют, что не использовали генеративный ИИ при подготовке рукописи.

Supplementary information. *Tables S1–S6 and Figure S1* are available on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2026-734-annex>

Author contributions. All authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **N.L. Ivanutina** and **S.I. Dovbysh** performed experiments, processed data, discussed the results, and drafted the manuscript. **R.A. Volkova** formulated the research objectives, planned the experiment, discussed the results, and drafted and edited the manuscript. **A.A. Ekimov** developed the methodology. **N.N. Savina** developed the methodology and edited the manuscript. **E.S. Zaytseva** developed the methodology. **A.S. Minero, A.Yu. Butirskiy, E.N. Morozova** performed experiments and processed data.

Use of generative artificial intelligence. The authors declare that no generative AI was used during the preparation of the manuscript.

Об авторах / Authors

Иванютина Наталья Леонидовна / Natalia L. Ivanutina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4064-2484>

Довбыш Степан Игоревич / Stepan I. Dovbysh

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4496>

Волкова Рауза Асхатовна, д-р биол. наук / Rauza A. Volkova, Dr. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8698-2890>

Екимов Алексей Александрович / Aleksei A. Ekimov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2901-8688>

Савина Наталья Николаевна / Natalya N. Savina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3670-5614>

Зайцева Елена Сергеевна / Elena S. Zaytseva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0763-0884>

Минеро Анастасия Сальвадоровна / Anastasia S. Minero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0026-7365>

Бутырский Алексей Юрьевич / Aleksey Yu. Butirskiy

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0352-522X>

Морозова Елена Николаевна / Elena N. Morozova

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-0478-1558>

Поступила 11.09.2025

После доработки 28.04.2026

Принята к публикации 19.06.2026

Online first 04.08.2026

Received September 11, 2025

Revised April 28, 2026

Accepted June 19, 2026

Online first August 4, 2026