

## Research Paper

# Inactivation of Human Influenza Virus Using Gamma Irradiation



Ailar Sabbaghi<sup>1</sup>, \*Mohsen Zargar<sup>1</sup>, Amir Ghaemi<sup>2</sup>, Farahnaz Motamedi-Sedeh<sup>3</sup>, Mohammad Reza Zolfaghary<sup>1</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Influenza and Other Respiratory Viruses, Virology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.
3. Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Atomic Energy Organization of Iran, Karaj, Iran.



**Citation:** Sabbaghi A, Zargar M, Ghaemi A, Motamedi-Sedeh F, Zolfaghary MR. [Inactivation of the Human Influenza (H1N1) Virus Using Gamma Rays (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2019; 22(4):112-123. <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.100>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.22.4.100>



### Article Info:

**Received:** 13 May 2019

**Accepted:** 24 Aug 2019

**Available Online:** 01 Oct 2019

### Key words:

Vaccine, Influenza virus, Gamma radiation, Irradiation, Viral inactivation

## ABSTRACT

**Background and Aim** We need the next-generation of whole-inactivated influenza vaccines to create stronger cross-protection against different influenza subtypes. This research aimed to apply the inactivation process of the influenza virus through gamma radiation as a candidate for the development of whole-inactivated vaccines.

**Methods and Materials** The influenza virus strain A/PR/8/34 (A/Puerto Rico/8/34 [H1N1]) was propagated in Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cells. After ultrafiltration, the virus infectivity titer was calculated by 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>) method based on the Karber formula. Alternatively, the gamma cell-220 was applied for virus inactivation via gamma rays. The D10 value factor and optimum dose of virus inactivation were calculated based on the dose/survival curve and the initial viral titer. In addition, antigenic properties of irradiated viruses compared to un-irradiated viruses and complete inactivation of the irradiated samples with optimum dose were also evaluated by hemagglutination assay and safety test, respectively.

**Ethical Considerations** The Research Ethics Committee of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch, Iran approved this study (Code: IR.IAU.TMU.REC.1397.309).

**Results** According to the concentrated virus titer (TCID<sub>50</sub>: 10<sup>5.75</sup>/ml) and dose/survival curve, the D10 value factor and optimum dose of virus inactivation were calculated at 4.878 and 28.048 kGy, respectively. On the other hand, owing to the results obtained from the safety test and hemagglutination assay, the optimum dose of virus inactivation was determined to be 28 kGy by maintaining the antigenic properties.

**Conclusion** Gamma radiation appears to be a good candidate for vaccine development through maintaining the antigenic structures.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

S

easonal influenza infection is one of the leading causes of mortality in human communities, especially among at-risk individuals. Nowadays, vaccine design against influenza virus is mainly based on inactivated

vaccines, especially vaccines containing broken virions or antigenic subunits (HA and NA proteins) whose efficacy is due to the production of specific antibodies against a particular strain of the virus and cannot provide protection against other influenza virus subtypes [2, 4]. These types of vaccines also require an annual evaluation and modifications [5, 6].

Animal viruses, on the other hand, by exchanging gene fragments, have led to the emergence of new variants of

### \* Corresponding Author:

Mohsen Zargar, PhD.

**Address:** Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

**Tel:** +98 (25) 32805797

**E-mail:** zmohsen2002@yahoo.com

the influenza virus, reducing the protective efficacy of seasonal influenza vaccines in India [5]. Therefore, attention is now focused on the production of complete inactivated vaccines [2].

Gamma-irradiated influenza viruses ( $\gamma$ -FLU) remain mostly unchanged during treatment. Thus, in this study, we use gamma irradiation to inactivate the human influenza virus strain named A/PR/8/34 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)], as a candidate for the production of complete inactivated viral vaccines.

## 2. Materials and Methods

This experimental study was performed on Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) epithelium cells cultured in sterile and filtered containers with DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), antibiotic, and 10% of Fetal Bovine Serum (FBS). The containers were incubated for 24 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% humidity. The virus used was human influenza A.PR.34.34 strain. The appropriate volume of the virus to infect MDCK cells was determined based on the infection coefficient Multiplicity of Infection (MOI). The virus was then inoculated at the optimum dose into cell culture containers. After 48 hours, the cells were collected from the containers and concentrated by ultrafiltration [13, 14].

Concentrated virus titration was performed using a TCID 50% test [15]. Vials containing condensed viruses were irradiated at doses of 5, 10, 15, 20, 25, 28, and 30 kg. Finally, the optimal dose of irradiation for the inactivation of the virus was calculated. The total inactivation of the virus was confirmed by the safety test [17]. Antigenic properties of the irradiated virus were compared with a non-irradiated virus by Hemagglutination test.

## 3. Results

According to the results of 4 passages of irradiated samples at 28 and 30 kg doses (Table 1), as well as results related to the evaluation of the preservation of ability of the surface antigenic properties of irradiated virus (Table 2), the dose of 28 kg was determined as the optimal dose of gamma irradiation for total inactivation of the human influenza virus with an initial titration of 105.75 mL by preserving surface antigenic structures as well as the absence of virus replication symptoms in 4 successive passages.

## 4. Discussion

Inactivation of the influenza virus by chemical treatments such as formalin or  $\beta$ -propiolactone leads to the induction of cross-linking of viral proteins. Thus, the ability of inactivated viruses to penetrate the cytosol of host cells reduces. Physical treatments such as UV rays also impair the effective uptake of these viruses by antigen-presenting cells through disrupting the activity of the lipid membrane of the virus, thereby decreasing the supply of viral antigens may reduce the efficacy of these vaccines [2, 11, 22].

In contrast, the virucidal effect of gamma irradiation is mainly related to the occurrence of virus nucleic acid damage, including a breakdown in the viral genome, cross-fractures, or the occurrence of nucleotide damage [19]. This method uses frozen viruses to minimize unintended damage to protein structures during the virus inactivation process. This is a significant advantage over other traditional methods of sterilization, especially in vaccine manufacturing [23]. Given these advantages, gamma irradiation can be used to inactivate the human influenza virus.

**Table 1.** Harmlessness test results for 25, 28 and 30 kg radiation doses

Irradiated Specimen of Virus		Replicates During 4 Subsequent Passages			
		First Passage	Second Passage	Third Passage	Fourth Passage
25 kg	Repeat 1	+	-	-	-
	Repeat 2	+	-	-	-
28 kg	Repeat 1	-	-	-	-
	Repeat 2	-	-	-	-
30 kg	Repeat 1	-	-	-	-
	Repeat 2	-	-	-	-

**Table 2.** Results of HA test in control (non-irradiated) and irradiated samples with different doses of gamma irradiation

Radiation Dose (Kg)		A/PR/8/34 virus dilutions [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] with initial titer 105.75/mL											
		0	2/1	4/1	8/1	16/1	32/1	64/1	128/1	256/1	512/1	1024/1	2048/1
0	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
5	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
10	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
15	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-
20	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-/+	-
25	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
28	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
30	Repeat 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Repeat 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

The results of this study showed that doses of 28 and 30 kg of gamma irradiation could deactivate the human influenza A/PR/34/8 virus, without altering the antigenic properties of the virus surface.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

This study was approved by the Research Committee of Tehran University of Medical Sciences (Code: IR.IAU.TMU.REC.1397.309).

### Funding

This article was extracted from the PhD. thesis of Ailar Sabaghi in Biology-Microbiology from the Faculty of Science of Islamic Azad University of Qom Branch (No. 508333).

### Authors' contributions

All authors met the standards of writing criteria based on the recommendations of the International Committee of Medical Journal Publishers (ICMJE).

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

## غیرفعال سازی ویروس آنفلوانزای انسانی (H1N1) با استفاده از پرتوی گاما

آیلار صباغی<sup>۱</sup>، \* محسن زرگر<sup>۱</sup>، امیر قائمی<sup>۲</sup>، فرحناز معتمدی سده<sup>۳</sup>، محمدرضا ذوالفقاری<sup>۱</sup>

۱- گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

۲- بخش آنفلوانزا و ویروس های تنفسی شایع، مرکز تحقیقات ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

۳- پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج، ایران.

## چکیده

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۳ اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۲ شهریور ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۰۹ مهر ۱۳۹۸

**زمینه و هدف:** نسل جدیدی از واکسن های غیرفعال کامل آنفلوانزا مورد نیاز است تا منجر به ایجاد حفاظت متقاطع قوی تر در برابر ساب تایپ های مختلف ویروس آنفلوانزا شود. هدف از این تحقیق، به کارگیری فرایند غیرفعال سازی ویروس آنفلوانزا از طریق تابش گاما به عنوان کاندیدی برای ساخت واکسن های آنفلوانزای غیرفعال کامل است.

**مواد و روش ها:** تکثیر سویه ویروس آنفلوانزای انسانی [A/PR/8/34 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] بر روی رده سلولی اپیتلیوم کلیه سگ سانان صورت گرفت و پس از اولترافیلتراسیون، تیتراژ عفونت زایی ویروس به روش 50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID<sub>50</sub>) با استفاده از فرمول کربر محاسبه شد. متعاقباً غیرفعال سازی ویروس از طریق تابش گاما و با استفاده از دستگاه گاما سل - ۲۲۰ صورت گرفت. فاکتور D<sub>10</sub> value و دز بهینه غیرفعال سازی نیز بر مبنای منحنی دز/پایندگی و تیتراژ اولیه ویروس محاسبه شد. همچنین ویژگی های آنتی ژنیک ویروس های پرتوتابی شده در مقایسه با شاهد و غیرفعال سازی کامل نمونه های پرتوتابی شده با دز بهینه به ترتیب به واسطه تست هم‌گلویتیناسیون و آزمون بی ضرری ارزیابی شد.

**ملاحظات اخلاقی:** این مطالعه با شناسه R.IAU.TMU.REC.1397-309 در کمیته پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران به ثبت رسیده است.

**یافته ها:** با توجه به تیتراژ ویروس تغلیظ شده (TCID<sub>50</sub>: 10<sup>5.75</sup>/ml) و رسم نمودار دز/پایندگی، فاکتور D<sub>10</sub> value و دز بهینه غیرفعال سازی ویروس به ترتیب ۴/۸۷۸ و ۲۸/۰۴۸ کیلوگری محاسبه شد. از طرفی بر مبنای نتایج حاصل از آزمون بی ضرری و تست هم‌گلویتیناسیون، دز بهینه برای غیرفعال سازی کامل ویروس با حفظ ویژگی های آنتی ژنیک، ۲۸ کیلوگری تعیین شد. **نتیجه گیری:** تابش گاما به واسطه حفظ ساختارهای آنتی ژنیک، کاندیدی مناسب برای توسعه واکسن محسوب می شود.

## کلیدواژه‌ها:

واکسن، ویروس آنفلوانزا، تابش گاما، پرتو دهی، غیرفعال سازی ویروس

## مقدمه

امروزه طراحی واکسن بر علیه ویروس آنفلوانزا عمدتاً مبتنی بر واکسن های غیرفعال به ویژه واکسن های حاوی ویروس شکسته<sup>۲</sup> و یا ساب یونیت های آنتی ژنیک (پروتئین های HA و NA) است. کارایی محافظتی این دسته از واکسن ها عمدتاً به توانایی القای آنتی بادی های خنثی کننده بر علیه اسپایک های سطحی ویروس به ویژه هم‌گلویتینین نسبت داده می شود. از آنجاکه این دسته از آنتی بادی ها اختصاصی گونه هستند، قادر به واکنش متقاطع با سایر ساب تایپ های ویروس آنفلوانزای تیپ A نیستند [۳-۲].

از طرفی این دسته از واکسن ها نیازمند ارزیابی سالیانه و اصلاح فرمولاسیون برای هماهنگی با سویه های در حال گردش ناشی از

عفونت های فصلی آنفلوانزا به عنوان یکی از عوامل اصلی مرگومیر در جوامع انسانی به ویژه در میان افراد در معرض خطر، شامل کودکان کمتر از ۵ سال و سالمندان بیشتر از ۶۵ سال، مطرح است. از این رو، سازمان جهانی سلامت<sup>۱</sup> برای مقابله با بیماری های فصلی ناشی از ویروس آنفلوانزا، شبکه جهانی آنفلوانزا را در سال ۱۹۵۲ تأسیس کرد. هدف از برپایی این شبکه کنترل در یافت آنتی ژنیک و متعاقباً شناسایی سویه های ویروسی حاصل از این تغییرات، به منظور پیشنهاد محتویات واکسن آنفلوانزا برای فصل بعدی شیوع ویروس است [۱].

2. Split Vaccine

1. World Health Organization (WHO)

\* نویسنده مسئول:

دکتر محسن زرگر

نشانی: گروه میکروبی شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

تلفن: ۰۵۷۹۷-۳۳۸۰ (۲۵) ۰۹۸+

پست الکترونیکی: zmohsen2002@yahoo.com

## مواد و روش‌ها

### کشت سلول

رده سلولی اپیتلیوم کلیه سگ‌سانان<sup>۶</sup> از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه شد. سپس به صورت تک‌لایه در داخل فلاسک‌های استریل ۱۷۵ سانتی‌متر مربع فیلتردار<sup>۷</sup> به همراه محیط کشت<sup>۸</sup> حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی<sup>۹</sup> غیرفعال شده به همراه آنتی‌بیوتیک پنسیلین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر)/ استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) (همه از شرکت Gibco, Germany) کشت داده شد. آنکوباسیون فلاسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت صورت گرفت.

### ویروس

در پژوهش حاضر از سویه ویروس آنفلوآنزای انسانی تحت عنوان [A/PR/8/34 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] با تیتراژ اولیه ۱۰<sup>۶</sup> /ml استفاده شد. این سویه از بخش آنفلوآنزا انستیتو پاستور تهران تهیه شد.

### تعیین ضریب آلودگی<sup>۱۰</sup> بهینه

ضریب آلودگی، نسبت تعداد ذرات ویروسی به ازای یک سلول است [۱۲]. از این رو، حجم مناسب ویروس برای آلوده کردن سلول‌های رده MDCK بر مبنای ضریب آلودگی تعیین شد. برای این امر، ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲۰ هزار سلول MDCK پاساژ ۴ برای شکل‌گیری سلول‌های تک‌لایه با تراکم ۷۰ درصد به همراه محیط کشت DMEM واجد آنتی‌بیوتیک Pen-Strep و ۱۰ درصد سرم گاوی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌صاف<sup>۱۱</sup> افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت آنکوباسیون در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت، تلقیح ویروس با تیتراژ اولیه ۱۰<sup>۶</sup>/ml در MOI های ۱ تا ۲۰ بر روی سلول‌های تک‌لایه صورت گرفت. برای هر ضریب آلودگی، ۳ چاهک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد. متعاقباً سرعت تخریب سلول‌ها به واسطه تکثیر ویروس در زمان‌های مختلف برای تعیین ضریب آلودگی مناسب ارزیابی شد.

### تلقیح ویروس و ارزیابی سلول‌های آلوده

پس از شکل‌گیری سلول‌های تک‌لایه با تراکم ۷۰ درصد،

آنتی‌ژنیک دریافت نیز هستند. این امر فشار زیادی بر تولیدکنندگان و مقامات نظارتی برای تصمیم‌گیری صحیح در رابطه با فرمولاسیون مناسب واکسن در هر سال اعمال می‌کند [۵، ۶].

علاوه بر اپیدمی‌های فصلی، ویروس‌های آنفلوآنزایی که از حیوانات منشأ گرفته‌اند نیز می‌توانند به سهولت از طریق تبادل قطعات ژنی (آنتی‌ژنیک شیفت) با میزبان‌های انسانی سازگار شوند. بدین ترتیب با ظهور ساب‌تایپ‌های جدیدی از ویروس آنفلوآنزا با خواص آنتی‌ژنیک متمایز، کارایی محافظتی واکسن‌های فصلی آنفلوآنزا کاهش می‌یابد [۵]. از این رو برای غلبه بر ایمنی‌زایی کم اسپیلیت واکسن‌ها و یا واکسن‌های ساب‌یونیت برای تحریک لنفوسیت‌های تی، توجهات به طور عمده بر توسعه واکسن‌های غیرفعال کامل<sup>۳</sup> معطوف شده است. به طور کلی حفظ یکپارچگی اپیتوپ‌های ایمونوژنیک ویروس، در طی مراحل سنتز واکسن در اثر بخشی هرچه بهتر واکسن مؤثر است. این نکته، امکان شناسایی طیف وسیعی از سویه‌های ویروس آنفلوآنزا از سوی سیستم ایمنی به واسطه هدف قرار دادن اپیتوپ‌های محافظت‌شده از پروتئین‌های ویروس آنفلوآنزا را فراهم می‌آورد [۷-۹].

ویروس‌های آنفلوآنزای غیرفعال کامل، صرف نظر از روش غیرفعال‌سازی قادر به القا و تحریک لنفوسیت‌ها هستند [۲]. از روش‌های متداول غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوآنزا می‌توان به تیمارهای شیمیایی با استفاده از فرمالین و بتا پروپیولاکتون و همچنین تیمارهای فیزیکی از قبیل اشعه گاما و UV اشاره کرد [۲، ۳]. از آنجاکه در مقایسه با تیمارهای شیمیایی و اشعه UV، ساختارهای آنتی‌ژنیک ویروس‌های آنفلوآنزای غیرفعال شده به واسطه اشعه گاما<sup>۴</sup> تا حد بسیاری در طی تیمار بدون تغییر باقی می‌مانند، علاوه بر القای ایمنی همورال منجر به برانگیخته شدن پاسخ تی سل‌های سایتوتوکسیک افکتور و خاطره قوی‌تر با قابلیت ایجاد واکنش متقاطع<sup>۵</sup> با ساب‌تایپ‌های مختلف از ویروس آنفلوآنزا در موش می‌شوند [۹، ۱۰]. بدین ترتیب، γ-FLU ها با کارایی حفاظتی بالا در برابر واریانت‌های آنتی‌ژنیک ویروس، کاندید مناسبی هستند برای تولید واکسن‌های فراگیر و جایگزینی با واکسن‌های فعلی که عمدتاً منجر به القای تولید آنتی‌بادی می‌شوند [۲، ۱۱].

در این تحقیق از پرتو گاما به منظور غیرفعال‌سازی سویه ویروس آنفلوآنزای انسانی با عنوان A/PR/8/34 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)]، به عنوان کاندیدی برای تولید واکسن‌های ویروسی غیرفعال کامل استفاده شد.

6. Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)

7. SPL Life Science Co., Ltd, Korea

8. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

9. Fetal Bovin Serum (FBS)

10. Multiplicity of Infection (MOI)

11. SPL Life Science Co., Ltd, Korea

3. Whole Inactivated Vaccine (WIV)

4. Gamma Irradiated Influenza A virus (γ-FLU)

5. Cross-React



سلول‌های تک‌لایه با تراکم ۷۰ درصد به همراه محیط کشت DMEM و آنتی‌بیوتیک Pen-Strep و ۱۰ درصد سرم گاوی به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای ته‌صاف افزوده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در گرم خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت، تلقیح ویروس از رقت‌های صفر تا ۱۰<sup>-۱۲</sup> بر روی سلول‌های تک‌لایه صورت گرفت. برای هر رقت، ۴ چاهک با شرایط یکسان در نظر گرفته شد. متعاقباً پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، TCID<sub>50</sub> بر مبنای CPE و فرمول کربر محاسبه شد.

#### دزسنجی و پرتوتابی با اشعه گاما

۲۴ ساعت قبل از پرتوتابی، ویال‌های حاوی دو سی‌سی ویروس تغلیظ‌شده با تیتراژ مشخص به ظرف Cryo 1°C Cooler (International Atomic Energy Agency: IAEA, Austria) منتقل یافت و در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ظرف حاوی نمونه به پژوهشکده کاربرد پرتوها واقع در سازمان انرژی اتمی ایران انتقال و به همراه یخ در دستگاه گاما سل ۱۳۲۰ با نرخ دز ۱/۴۲ گری بر ثانیه و اکتیویته ۶۰۴۸ کوری قرار داده شد. متعاقباً پرتوتابی با دزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۲۸ و ۳۰ کیلوگری (دو تکرار برای هر دز تابش) توسط دستگاه صورت گرفت. کالیبراسیون دستگاه گاماسل نیز طبق دزیمتری استاندارد فریک توسط پژوهشکده انجام شد [۱۶].

#### محاسبه دز بهینه غیرفعال‌سازی بر حسب کیلوگری

پس از پرتوتابی، تیتراژ عفونت‌زایی ویروسی برای هر دو تکرار هر دز به روش (TCID<sub>50</sub>) تعیین شد. متعاقباً با استفاده از نرم‌افزار Origin 6.1 منحنی دز/پایندگی ترسیم شد. فاکتور D<sub>10</sub> Value و دز بهینه غیرفعال‌سازی بر حسب کیلوگری نیز به توجیه به معادله بهترین خط عبوری از نمودار و تیتراژ عفونت‌زایی اولیه ویروس محاسبه شد [۱۷].

#### تأیید غیرفعال‌سازی کامل ویروس پرتوتابی‌شده با دز بهینه با استفاده از آزمون بی‌ضرری<sup>۱۸</sup>

نمونه‌های ویروسی پرتوتابی‌شده با دزهای ۲۵، ۲۸ و ۳۰ کیلوگری (دو تکرار برای هر دز تابش) طی چهار پاساژ متوالی بر روی رده سلولی MDCK با شرایط مشابه تلقیح شدند و از نظر تکثیر و ایجاد علائم CPE بررسی شدند. بدین ترتیب که در پاساژ اول پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون از مایع رویی روی یک فلاسک حاوی سلول تازه، کشت داده شد. این امر تا ۴ پاساژ تکرار شد و ۴۸ ساعت پس از هر پاساژ، علائم تکثیر ویروس ارزیابی شد [۱۷].

تلقیح ویروس با ضرب آلودگی ۶ به‌عنوان دز بهینه به داخل فلاسک‌های ۱۷۵ سانتی‌متر مربع صورت گرفت. بدین ترتیب که پس از دو بار شست‌وشوی سلول‌ها با فسفات بافر<sup>۱۲</sup> استریل، ۳ سی‌سی محیط حاوی ویروس به همراه ۳ سی‌سی محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک به داخل فلاسک حاوی سلول تلقیح شد. سپس فلاسک‌ها به مدت یک ساعت و نیم در گرم‌خانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد به همراه ۵ درصد CO<sub>2</sub> و ۹۵ درصد رطوبت انکوبه و هر ۱۵ دقیقه تکان داده شدند. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون و خروج محیط حاوی ویروس، محیط کشت جدید DMEM به همراه آنزیم Tolylsulfonyl phenylalanyl chlo-romethryl ketone (TPCK, 1µg/ml) (Merck, Germany) به داخل فلاسک‌ها افزوده شد و انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت صورت گرفت. پس از اتمام مدت زمان انکوباسیون و مشاهده علائم سایتوپاتوژنیک<sup>۱۳</sup> شامل گردش و جداسدن سلول‌ها از سطح فلاسک، جمع‌آوری ویروس به واسطه سانتریفیوژ محتویات فلاسک‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت.

#### تغلیظ ویروس با استفاده از اولترافیلتراسیون

برای تغلیظ ویروس و جداسازی هرچه بیشتر سلول‌ها، دبری‌های سلولی به‌ویژه پروتئین‌ها و DNA سلولی و همچنین سایر ذرات نامحلول موجود در محیط حاوی ویروس از سیستم اولترافیلتراسیون با فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتون استفاده شد. در این سیستم، تغلیظ ویروس به واسطه گردش محیط حاوی ویروس صورت می‌پذیرد. بدین ترتیب که محیط واردشده به سیستم با فیلتر ۱۰۰ کیلو دالتون مجاور شده و از آن عبور می‌کند. در این حالت، مولکول‌های بزرگ‌تر (ویروس آنفلوانزا (5 × 10<sup>3</sup> KD)) از فیلتر عبور نکرده و دوباره به ظرف اصلی بازمی‌گردند و بازچرخش می‌شوند؛ اما مولکول‌های کوچک‌تر، از فیلتر عبور کرده و به ظرف ضایعات انتقال می‌یابند. این گردش منجر به تغلیظ ویروس می‌شود [۱۴، ۱۳]. در نهایت سوسپانسیون ویروسی تغلیظ‌شده در کرایوتیوپ‌های واشردار دو سی‌سی<sup>۱۴</sup> تقسیم و در فریزر -۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان پرتوتابی با اشعه گاما نگهداری شد.

#### تیتراسیون ویروس تغلیظ‌شده با استفاده از تست ۱۰ TCID<sub>50</sub>

مقدار ویروس تغلیظ‌شده در واحد میلی‌لیتر که توان ایجاد CPE در ۵۰ درصد از یاخته‌های تلقیح‌داده‌شده را دارد، با استفاده از فرمول کربر<sup>۱۶</sup> محاسبه شد [۱۵]. برای این کار، ۱۰۰ میکرولیتر محیط حاوی ۲۰ هزار سلول MDCK پاساژ ۴ برای شکل‌گیری

12. Phosphate-Buffered Saline (PBS)

13. Cytopathogenic Effect (CPE)

14. SPL Life Science Co., Ltd, Korea

15. Tissue Culture Infectious Dose 50% (TCID<sub>50</sub>)

16. Karber

17. MDS Nordion, Ottawa, Canada

18. Safety Test

## یافته‌ها

ارزیابی ضریب‌های آلودگی ۱ تا ۲۰ پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون نشان داد تعیین ضریب آلودگی بهینه وابسته به زمان است و در زمان‌های مختلف، اثرات CPE در چاهک‌های مختلف تغییر می‌کند. به عنوان مثال در زمان کمتر از ۲۰ ساعت، ضریب آلودگی ۲۰ با ۹۵ درصد CPE به عنوان ضریب آلودگی بهینه در نظر گرفته می‌شود. برای تکمیل سیکل ویروس و کاهش میزان تولید ذرات شبه‌ویروسی، ضریب آلودگی ۶ با دوره انکوباسیون ۴۸ ساعته انتخاب شد. یاخته‌های سالم MDCK در مقابل یاخته‌های آلوده به ویروس، در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج مرتبط با تیترو ویروس قبل از پرتو دهی و پس از پرتو (جدول شماره ۱) و با استفاده از نرم‌افزار Origin 6.1، منحنی دز/پایندگی (تصویر شماره ۲) ترسیم و معادله شماره ۱ به عنوان بهترین خط عبوری از منحنی تعیین شد.

$$Y=5.15-0.205 x$$

فاکتور  $D_{10}$  Value (دزی از پرتو گاما بر حسب کیلوگری که منجر به کاهش جمعیت ویروسی به میزان یک سیکل لگاریتمی

## بررسی حفظ خواص آنتی‌ژنیکی ویروس پرتوتابی شده نسبت به شاهد (ویروس پرتوتابی نشده) با استفاده از تست هم‌آگلوتیناسیون<sup>۱۹</sup>

از روش استاندارد HA برای ارزیابی حفظ ساختارهای آنتی‌ژنیک ویروس پرتوتابی شده نسبت به شاهد استفاده شد [۱۸]، برای این امر، ویروس شاهد و پرتوتابی شده در رقت‌های سریالی در حجم ۵۰ میکرولیتر به داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای لاشکل کشت سلول<sup>۲۰</sup> انتقال یافت (دو تکرار برای هر ویروس). سپس ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون گلبول‌های قرمز خون جوجه با رقت نیم درصد به تمامی چاهک‌ها اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. متعاقباً الگوی هم‌آگلوتیناسیون پس از انکوباسیون ارزیابی شد.

در پژوهش حاضر با توجه به احتمال خطای ابزاری و تکنیکی در روش‌های مختلف، با تکرارها و انتخاب میانگین سعی شده است که امکان خطا به حداقل خود برسد که در این مطالعه همسانی نتایج دلالت بر خطای محدود در ابزار و روش به کارگیری داشت.

19. Hemagglutination Assay, HA  
20. SPL Life Science Co., Ltd, Korea

جدول ۱. تیترو نمونه‌های ویروسی قبل از پرتو دهی و پس از آن

دز پرتو دهی (کیلوگری)	۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۲۸	۳۰
مدت پرتو دهی (ثانیه: دقیقه : ساعت)	۰:۰:۰	۰:۵۸:۴۹	۱:۵۷:۴۲	۲:۵۶:۳۶	۳:۵۵:۲۹	۴:۵۴:۲۲	۵:۳۰:۱۲	۵:۵۳:۱۵
تیترو ویروس (TCID <sub>50</sub> %/ml)	۱.۰۵۷۵	۱.۰۳۷۵	۱.۰۲۷۵	۱.۰۲	۱.۰۱۵	۱.۰۱۵	-	-
تکرار	۱	۲	۲	۲	۲	۲	-	-

جدول ۲. نتایج آزمون بی‌ضرری برای دزهای تابش ۲۵، ۲۸ و ۳۰ کیلوگری

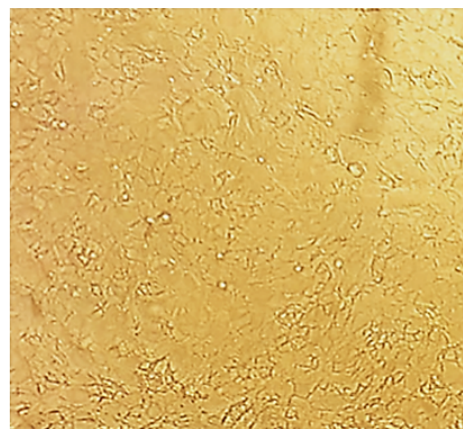
نمونه ویروسی پرتوتابی شده	پاساژ اول	پاساژ دوم	پاساژ سوم	پاساژ چهارم
۲۵ کیلوگری	+	-	-	-
تکرار ۱	+	-	-	-
تکرار ۲	-	-	-	-
۲۸ کیلوگری	-	-	-	-
تکرار ۱	-	-	-	-
تکرار ۲	-	-	-	-
۳۰ کیلوگری	-	-	-	-
تکرار ۱	-	-	-	-
تکرار ۲	-	-	-	-

جدول ۳. نتایج تست HA در نمونه شاهد (پرتودهی نشده) و نمونه‌های پرتوتابی شده با دزهای مختلف اشعه گاما

دز پرتودهی (کیلوگرم)	رقت‌های ویروس [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] با تیترا اولیه $10^{7.0}$ /ml											
	+	۱/۲	۱/۴	۱/۸	۱/۱۶	۱/۳۲	۱/۶۴	۱/۱۲۸	۱/۲۵۶	۱/۵۱۲	۱/۱۰۲۴	۱/۲۰۴۸
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
تکرار ۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-



(B)



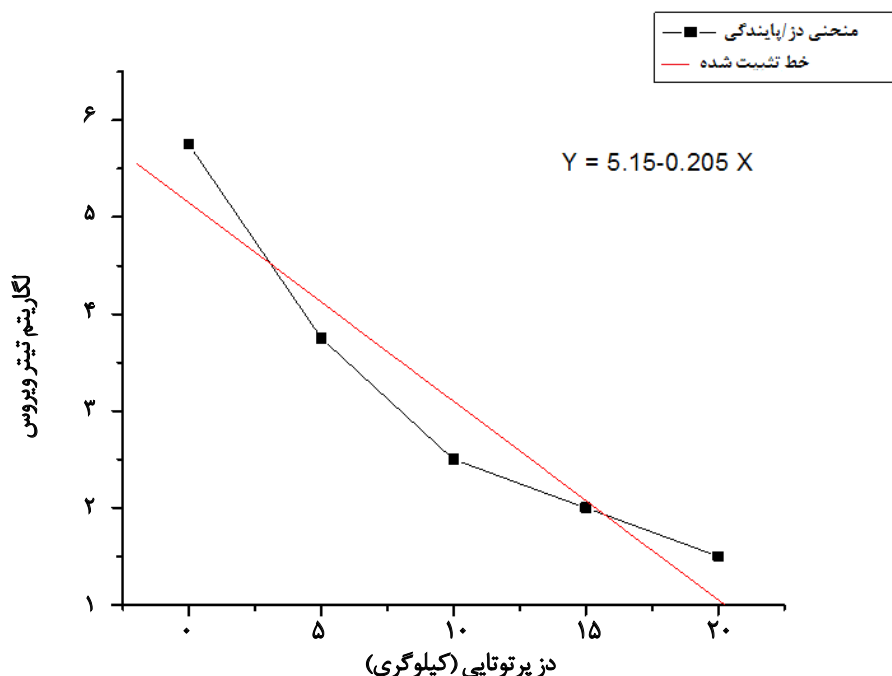
(A)



تصویر ۱. نمایی از سلول‌های MDCK در زیر میکروسکوپ معکوس (Nikon's Eclipse TE2000 Inverted Research Microscope Set)

A. یاخته‌های سالم (گروه کنترل); B. یاخته‌های آلوده به ویروس پس از ۸۴ ساعت از تلقیح





تصویر ۲. منحنی دز/ پایدگی و معادله بهترین خط عبوری از نمودار

می‌شود) [۱۹] نیز بر مبنای معادله بهترین خط عبوری از نمودار، ۴/۸۷۸ کیلوگری محاسبه شد. از آنجا که تیترو اولیه ویروس تغلیظ‌شده معادل با  $10^{5.75}/ml$  است، برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس نیاز است که تیترو ویروسی به میزان ۵/۷۵ سیکل کاهش یابد. از این رو، دز بهینه به شیوه معادله شماره ۲ و برابر با  $28/048$  کیلوگری محاسبه شد.

۲.

ویروس بر حسب کیلوگری  $28/048 = 4/878 \times 5/75$  دز بهینه برای غیرفعال‌سازی کامل

ویروس بر حسب کیلوگری

با توجه به نتایج مندرج در رابطه با ۴ پاساژ از نمونه‌های پرتوتابی‌شده در دزهای ۲۸ و ۳۰ کیلوگری (جدول شماره ۲) و همچنین نتایج مربوط به بررسی حفظ قابلیت خواص آنتی‌ژنیک سطحی ویروس پرتوتابی‌شده (جدول شماره ۳)، دز ۲۸ کیلوگری به عنوان دز بهینه تابش گاما برای غیرفعال‌سازی کامل ویروس آنفلوآنزای انسانی با تیترو اولیه  $10^{5.75}/ml$  به واسطه حفظ ساختارهای آنتی‌ژنیک سطحی و همچنین رؤیت‌نکردن علائم تکثیر ویروس در طی ۴ پاساژ متوالی تعیین شد. بر اساس نتایج مندرج در جدول شماره ۳، خاصیت آنتی‌ژنیک دمین‌های سطحی ویروس آنفلوآنزا تا دز ۳۰ کیلوگری (رقت ۱/۵۱۲ ویروس) نیز حفظ شده است.

## بحث

آنتی‌ژن‌های ذره‌ای از قبیل WIVها واجد بسیاری از



اپیتوپ‌های ایمونوژنیک و اجزای محرک ایمنی از قبیل لیگاندهای گیرنده‌های سلولی به نام گیرنده‌های شناساگر الگو<sup>۲۱</sup> برای القای یک پاسخ ایمنی مؤثر بر علیه ویروس هستند [۲۰، ۲۱]. توجه به این نکته الزامی است که القای پاسخ‌های ایمنی در رابطه با واکسن‌های WIV نیاز به حفظ ساختار و شناسایی اپیتوپ‌های آنتی‌ژنیک توسط سیستم ایمنی میزبان دارد. غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوآنزا با استفاده از تیمارهای شیمیایی نظیر فرمالین و یا بتا پروپیولاکتون منجر به القای برهم‌کنش و اتصال متقاطع پروتئین‌های ویروسی می‌شود. از این رو، قابلیت نفوذ ویروس‌های غیرفعال به داخل سیتوزول سلول‌های میزبان کاهش می‌یابد. تیمارهای فیزیکی از قبیل اشعه UV نیز از طریق اختلال در فعالیت غشاء لیپیدی ویروس منجر به کاهش برداشت مؤثر این دسته از ویروسها به واسطه سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن<sup>۲۲</sup> می‌شوند. بدین ترتیب، کاهش عرضه آنتی‌ژن‌های ویروسی ممکن است منجر به کاهش کارایی این دسته از واکسن‌ها شود.

تیمارهای مذکور بر روی نمونه‌های غیربخزده ویروسی صورت می‌گیرد. در این حالت، تخریب ناخواسته دمین‌های آنتی‌ژنیک ویروس به واسطه تولید ترکیبات توکسیک به ویژه رادیکال‌های آزاد در طی فرایند غیرفعال‌سازی، اجتناب‌ناپذیر است [۲۲، ۱۱، ۲۰].

در مقابل، اثر ضدویروسی اشعه گاما عمدتاً با بروز آسیب در اسید نوکلئیک ویروس شامل شکستگی در ژنوم ویروسی،

21. Pattern Recognition Receptors: PRRs

22. Antigen-Presenting Cells (APCs)

سلول‌های رده MDCK برای تکثیر و جمع‌آوری ویروس آنفلوانزای انسانی با عنوان [A/PR/8/34 [A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)] استفاده شد. رده سلولی MDCK به علت بیان گیرنده‌های اسید سیالیک از نوع آلفا-۲ و ۶ و آلفا-۳ به عنوان یک مدل مطالعاتی مناسب برای ویروس‌های آنفلوانزا مطرح است [۲۶]. از طرفی نتایج جدول شماره ۱ حاکی از کاهش خاصیت عفونت‌زایی ویروس پرتوتابی شده نسبت به ویروس شاهد از دز ۵ کیلوگری به بالاست، به نحوی که در دزهای ۲۸ و ۳۰ کیلوگری خاصیت عفونت‌زایی ویروس به صفر می‌رسد. متعاقباً بر اساس تست HA نیز مشخص شد که خاصیت آنتی‌ژنیک دمین‌های سطحی ویروس پرتوتابی شده نسبت به ویروس پرتودهی نشده از دز ۵ تا ۳۰ کیلوگری حفظ شده است. از این رو، دز ۲۸ کیلوگری به عنوان دز بهینه برای غیرفعال‌سازی کامل نمونه‌های ویروسی انتخاب شد. نتایج فوق منطبق بر مطالعه انجام شده به واسطه صالحی و معتمدی‌سده در سال ۲۰۱۸ بود. در این مطالعه گرچه غیرفعال‌سازی کامل ویروس آنفلوانزای مرغی ساب‌تایپ H9N2 در دز ۲۹/۵۲ کیلوگری صورت گرفت، خاصیت آنتی‌ژنیسیته دمین‌های سطحی ویروس پرتوتابی شده نسبت به ویروس پرتوتابی نشده تا دز ۳۰ کیلوگری نیز حفظ شده است [۲۷].

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای حفظ بیشتر ساختارهای ایمونوژنیک ویروس آنفلوانزا در طی فرایند غیرفعال‌سازی از نمونه‌های یخ‌زده ویروسی استفاده شد. اما از آنجا که دستگاه گاماسل استفاده شده قابلیت تنظیم دما را ندارد، بهتر است در مطالعات بعدی از آنتی‌اکسیدانت‌هایی نظیر کمپلکس سنتتیک<sup>۲۸</sup> و یا اسکونجرهای رادیکال‌های آزاد<sup>۲۹</sup> از قبیل تتراسایکلین هیدروکلراید و آسکوربات [۲۸-۳۰] برای جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از رادیولیز مولکول‌های آب به واسطه تابش گاما استفاده شود. نتایج حاصل از این پژوهش به‌ویژه حفظ ساختارهای آنتی‌ژنیک ویروس آنفلوانزا، در دزهای بالای تابش گاما (۲۸ و ۳۰ کیلوگری) می‌تواند زمینه‌ای برای مطالعات بیشتر در رابطه با کاربرد تابش گاما در صنایع واکسن‌سازی ایجاد نماید.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه با شناسه IR.IAU.TMU.REC.1397.309 در کمیته پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران به ثبت رسیده است.

شکستگی‌های متقاطع یا بروز آسیب‌های نوکلئوتیدی مرتبط است [۱۹]. از طرفی تابش گاما برای غیرفعال‌سازی بر روی نمونه‌های ویروسی یخ‌زده نیز اعمال‌پذیر است. برای این منظور در طی تابش اشعه گاما، ذخایر<sup>۳۳</sup> ویروسی یخ‌زده روی یخ خشک نگهداری می‌شوند. این کار باعث به‌حداقل رساندن بروز آسیب‌های ناخواسته بر ساختارهای پروتئینی در طی فرایند غیرفعال‌سازی ویروس می‌شود. این موضوع به عنوان یک مزیت بزرگ نسبت به سایر روش‌های سنتی استریلیزاسیون به‌ویژه در زمینه تولید واکسن مطرح است [۲۳].

استفاده از تابش گاما برای غیرفعال‌سازی ویروس‌ها را ابتدا در سال ۱۹۵۵ پولارد<sup>۳۴</sup> و همکارانش بررسی کردند [۲۴] و در پی آن، غیرفعال‌سازی ویروس تب برفکی<sup>۳۵</sup> به واسطه تابش گاما در سال ۱۹۷۳ را فرسکورا<sup>۳۶</sup> و همکاران ارزیابی کردند. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از این بود که آنتی‌ژنیسیته ویروس‌های لیوفیلیزه FMD تایپ‌های ۰۱، ۰۲ و ۰۷ پس از تابش مشابه با ویروس‌های لیوفیلیزه پرتوتابی نشده است. این نکته نشان‌دهنده حفظ دمین‌های عملکردی ویروس در طی تیمار است [۲۵]. بر این اساس، زمینه مورد نیاز برای مطالعات بیشتر در رابطه با کاربرد تابش گاما در صنایع واکسن‌سازی مهیا شد.

الشرفی و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که استفاده از یک دز از ویروس آنفلوانزای غیرفعال‌شده با اشعه گاما موسوم به PR8/متعلق به ساب‌تایپ H1N1 به صورت استنشاقی منجر به محافظت موش در برابر ویروس‌های کشنده آنفلوانزای مرغی با ساب‌تایپ H5N1 و همچنین سایر ساب‌تایپ‌های آنفلوانزا در موش می‌شود. از این رو، FLU vaccine -γ ها نه تنها می‌توانند منجر به ایجاد محافظت در برابر عفونت‌های فصلی آنفلوانزا شوند بلکه این امکان نیز وجود دارد که در رابطه با پاندمی‌های آینده ناشی از ویروس آنفلوانزای مرغی نیز مؤثر باشند [۱۰].

فوروپا<sup>۳۷</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که γ-inactivated A/PC [A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)] در مقایسه با ویروس‌های غیرفعال‌شده به واسطه فرمالین و اشعه UV و همچنین در برابر واکسن‌های تجاری آنفلوانزای سه‌ظرفیتی فعلی از ایمنی‌زایی بسیار بیشتری برخوردار است به نحوی که تنها یک دز از A/PC vaccine -γ منجر به حفاظت درخور توجهی در برابر ویروس‌های همولوگ و هترولوگ آنفلوانزا در موش می‌شود [۲].

با توجه به مزایای ذکرشده، تابش گاما برای غیرفعال‌سازی ویروس آنفلوانزای انسانی استفاده شده است. در مطالعه حاضر از

23. Stocks
24. Pollard
25. Foot and Mouth Disease (FMD)
26. Frescura
27. Furuya

28. Mn<sup>2+</sup>-decapeptide-orthophosphate Oxidant Complex (MnDpPi or MDP)
29. Free-radical Scavengers

### حامی مالی

این مقاله حاصل پایان نامه دکتری آیلاز صباغی در گروه میکروشناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم با شماره ۵۰۸۳۳۳ است.

### مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهاد های کمیته بین المللی ناشران مجله پزشکی (ICMJE) را دارا بودند.

### تعارض منافع

نویسندگان تصریح می کنند هیچ گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

## References

- [1] Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40):6852-62. [DOI:10.1016/j.vaccine.2007.07.027] [PMID]
- [2] Furuya Y, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Mullbacher A, Alsharifi M. Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole 'killed' influenza A viruses and commercial vaccine preparations. *J Gen Virol*. 2010; 91(Pt 6):1450-60. [DOI:10.1099/vir.0.018168-0] [PMID]
- [3] Budimir N, Huckriede A, Meijerhof T, Boon L, Gostick E, Price DA, et al. Induction of heterosubtypic cross-protection against influenza by a whole inactivated virus vaccine: The role of viral membrane fusion activity. *PLOS One*. 2012; 7(1):e30898. [DOI:10.1371/journal.pone.0030898] [PMID] [PMCID]
- [4] Geeraedts F, Goutagny N, Hornung V, Severa M, de Haan A, Pool J, et al. Superior immunogenicity of inactivated whole virus H5N1 influenza vaccine is primarily controlled by Toll-like receptor signalling. *PLOS Pathogens*. 2008; 4(8):e1000138. [DOI:10.1371/journal.ppat.1000138] [PMID] [PMCID]
- [5] Fotouhi F, Shaffir M, Farahmand B, Shirian S, Saeidi M, Tabarraei A, et al. Adjuvant use of the NKT cell agonist alpha-galactosylceramide leads to enhancement of M2-based DNA vaccine immunogenicity and protective immunity against influenza A virus. *Arch Virol*. 2017; 162(5):1251-60. [DOI:10.1007/s00705-017-3230-7] [PMID]
- [6] Treanor JJ. Prospects for broadly protective influenza vaccines. *Vaccine*. 2015; 33(Suppl. 4):D39-D45. [DOI:10.1016/j.vaccine.2015.08.053] [PMID]
- [7] Kreijtz J, Fouchier R, Rimmelzwaan G. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res*. 2011; 162(1-2):19-30. [DOI:10.1016/j.virus-res.2011.09.022] [PMID]
- [8] van de Sandt CE, Kreijtz JH, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*. 2012; 4(9):1438-76. [DOI:10.3390/v4091438] [PMID] [PMCID]
- [9] Müllbacher A, Ada G, Tha Hla R. Gamma-irradiated influenza A virus can prime for a cross-reactive and cross-protective immune response against influenza A viruses. *Immunol Cell Biol*. 1988; 66(2):153-7. [DOI:10.1038/icb.1988.19] [PMID]
- [10] Alsharifi M, Furuya Y, Bowden TR, Lobigs M, Koskinen A, Regner M, et al. Intranasal flu vaccine protective against seasonal and H5N1 avian influenza infections. *PLOS One*. 2009; 4(4):e5336. [DOI:10.1371/journal.pone.0005336] [PMID] [PMCID]
- [11] Furuya Y, Chan J, Wan EC, Koskinen A, Diener KR, Hayball JD, et al. Gamma-irradiated influenza virus uniquely induces IFN-I mediated lymphocyte activation independent of the TLR7/MyD88 pathway. *PLOS One*. 2011; 6(10):e25765. [DOI:10.1371/journal.pone.0025765] [PMID] [PMCID]
- [12] González-Jara P, Fraile A, Canto T, García-Arenal F. The multiplicity of infection of a plant virus varies during colonization of its eukaryotic host. *J Virol Methods*. 2009; 83(15):7487-94. [DOI:10.1128/JVI.00636-09] [PMID] [PMCID]
- [13] Wickramasinghe S, Kalbfuss B, Zimmermann A, Thom V, Reichl U. Tangential flow microfiltration and ultrafiltration for human influenza A virus concentration and purification. *Biotechnol Bioeng*. 2005; 92(2):199-208. [DOI:10.1002/bit.20599] [PMID]
- [14] Kalbfuss B, Genzel Y, Wolff M, Zimmermann A, Morenweiser R, Reichl U. Harvesting and concentration of human influenza A virus produced in serum-free mammalian cell culture for the production of vaccines. *Biotechnol Bioeng*. 2007; 97(1):73-85. [DOI:10.1002/bit.21139] [PMID]
- [15] Ramakrishnan MA. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J Virol*. 2016; 5(2):85-6. [DOI:10.5501/wjv.v5.i2.85] [PMID] [PMCID]
- [16] American Society For Testing and Materials. Standard practice for using the fricke reference standard dosimetry system. Barr Harbor: ASTM International West Conshohocken; 2004.
- [17] Motamedi-Sedeh F, Mahravani H, Javadi M, Harzandi N, Shafaei SK. FMD virus type Asia-1 irradiated vaccine and evaluation of immune response on guinea-pig model. *Biol J Microorganism*. 2017; 6(23):57-66.
- [18] Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. *Methods in Mol Biol*. 2014; 1161:3-9. [DOI:10.1007/978-1-4939-0758-8\_1] [PMID]
- [19] Alsharifi M, Müllbacher A. The  $\gamma$ -irradiated influenza vaccine and the prospect of producing safe vaccines in general. *Immunol Cell Biol*. 2010; 88(2):103. [DOI:10.1038/icb.2009.81] [PMID]
- [20] Tsen S-WD, Donthi N, La V, Hsieh WH, Li YD, Knoff J, et al. Chemical-free inactivated whole influenza virus vaccine prepared by ultrashort pulsed laser treatment. *J Biomed Optics*. 2014; 20(5):051008. [DOI:10.1117/1.JBO.20.5.051008] [PMID] [PMCID]
- [21] Barrett PN, Terpening SJ, Snow D, Cobb RR, Kistner O. Vero cell technology for rapid development of inactivated whole virus vaccines for emerging viral diseases. *Expert Rev Vaccines*. 2017; 16(9):883-94. [DOI:10.1080/14760584.2017.1357471] [PMID]
- [22] Furuya Y, Chan J, Regner M, Lobigs M, Koskinen A, Kok T, et al. Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by  $\gamma$ -irradiated influenza A viruses. *J Virol*. 2010; 84(9):4212-21. [DOI:10.1128/JVI.02508-09] [PMID] [PMCID]
- [23] David SC, Lau J, Singleton EV, Babb R, Davies J, Hirst TR, et al. The effect of gamma-irradiation conditions on the immunogenicity of whole-inactivated Influenza A virus vaccine. *Vaccine*. 2017; 35(7):1071-9. [DOI:10.1016/j.vaccine.2016.12.044] [PMID]
- [24] Pollard E. The action of ionizing radiation on viruses. In: Kenneth M. Smith, Max A, Lauffer, editors. *Advances in Virus Research*. Edinburgh: Elsevier; 1954. [DOI:10.1016/S0065-3527(08)60531-X]
- [25] Frescura T, Vivoli P. Studies of the foot-and-mouth disease virus sub-types using antigens inactivated by Gamma radiations. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin. Reihe B. J Vet Med*. 1973; 20(10):822-5. [DOI:10.1111/j.1439-0450.1973.tb02055.x] [PMID]
- [26] Lugovtsev VY, Melnyk D, Weir JP. Heterogeneity of the MDCK cell line and its applicability for influenza virus research. *PLOS One*. 2013; 8(9):e75014. [DOI:10.1371/journal.pone.0075014] [PMID] [PMCID]
- [27] Salehi B, Motamedi-Sedeh F, Madadgar O, Khalili I, Ghalyan Chi Langroudi A, et al. Analysis of antigen conservation and inactivation of gamma-irradiated avian influenza virus subtype H9N2. *Acta microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2018; 65(2):163-71. [DOI:10.1556/030.65.2018.025] [PMID]
- [28] Grieb T, Forng RY, Brown R, Owolabi T, Maddox E, Mcbain A, et al. Effective use of gamma irradiation for pathogen inactivation of monoclonal antibody preparations. *Biologicals*. 2002; 30(3):207-16. [DOI:10.1006/biol.2002.0330] [PMID]
- [29] Gayen M, Gupta P, Morazzani EM, Gaidamakova EK, Knollmann-Ritschel B, Daly MJ, et al. Deinococcus Mn(2+)-peptide complex: A novel approach to alphavirus vaccine development. *Vaccine*. 2017; 35(29):3672-81. [DOI:10.1016/j.vaccine.2017.05.016] [PMID]
- [30] Alok A, Chaudhury N. Tetracycline hydrochloride: A potential clinical drug for radioprotection. *Chemico-Biological Interact*. 2016; 245:90-9. [DOI:10.1016/j.cbi.2016.01.001] [PMID]