

Т.И. ГЛЕБОВА, Н.Г. ИШМУХАМЕТОВА, Т.В. КУЗНЕЦОВА,
М.Г. ШАМЕНОВА, Б.Б. БАЙМАХАНОВА

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ СПЕКТРА РЕАКТИВНОСТИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА А/АЛМАТЫ/347/09 (H1N1)v

Аннотация

Представлены результаты изучения иммунологической характеристики моноклональных антител (МКА 4D₃ и МКА 7D₅), полученных к вирусу гриппа А/Алматы/347/09 (H1N1)v. Показано, что МКА 7D₅ имеют более широкий спектр реагирования с вирусами гриппа А(H1N1), что позволяет рекомендовать его для использования в создании специфических тест-систем для детекции вирусных антигенов.

Заболевания гриппом, вызванные новым пандемическим вирусом А(H1N1)v, впервые были зарегистрированы в апреле 2009 г. в Мексике и США. После установления возможности передачи вируса от человека к человеку в нескольких странах мира ВОЗ объявила о пандемии свиного гриппа. В Казахстане первый лабораторно подтвержденный случай заболевания, связанный с новым вариантом вируса гриппа А(H1N1)v, зарегистрирован в июне 2009 г. Эпидемия гриппа продолжалась до середины 2010 г. Популяция штаммов была генетически однородной и по гемагглютиниру (НА) и нейраминидазе (НА) на 99,2-99,4% сходна с эталонным вариантом А/Калифорния/07/09 (H1N1)v.

Эпидемический характер распространения гриппа, тяжесть протекания заболевания и вызываемые им осложнения обуславливают необходимость проведения быстрой и эффективной диагностики, которая в дальнейшем определяет своевременную противовирусную терапию.

В настоящее время для идентификации возбудителя гриппа наиболее широко используют методы генной диагностики с применением ПЦР-тест-систем. Однако, для решения практических и фундаментальных задач методы, основанные на выявлении антигенов вирусов гриппа, по-прежнему остаются актуальными. Эффективным диагностическим реагентом для этого являются моноклональные антитела (МКА). Целью настоящего исследования являлось получение и изучение спектра реактивности МКА к вирусу гриппа А/Алматы/347/09 (H1N1)v.

Материалы и методы

Вирусы. Для получения МКА использовали вирус гриппа А/Алматы/347/09 (H1N1)v, выделенный из носоглоточного смыва больного с диагнозом ОРВИ осенью 2009 г. [Ошибка! Закладка не определена.]. Анализ спектра реактивности МКА проводили с эталонными штаммами вирусов, выделенными от свиней: А/Swine/Iowa/15/30 (H1N1), А/Swine/USA/1976/31 (H1N1) и А/Swine/Hong-Kong/1/74 (H1N1); вирусами гриппа человека свиного происхождения: А/California/04/09 (H1N1)v и А/New Jersey/8/76 (H1N1), А/Singapore/1/57 (H2N2), А/Wisconsin/67/05 (H3N2), вирусами рода В разных эволюционных линий, а также с сезонными и пандемическими казахстанскими штаммами вирусов гриппа А(H1N1)v.

Приготовление антигенов (АГ). Вирус А/Алматы/347/09 (H1N1)v культивировали в аллантаоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов, затем концентрировали, очищали и инактивировали, как описано ранее. Препараты поверхностных гликопротеидов получали из очищенной концентрированной суспензии вируса путем

обработки 5% детергентом МЭСК. HA и NA отделяли центрифугированием при 29000 об/мин в течение 2ч.

Иммунизация животных. Для иммунизации использовали мышей линии BALB/c 7-8 недельного возраста, весом 15 - 20 г. Предварительно животных выдерживали под наблюдением в течение 15 дней. Первую иммунизацию проводили внутрибрюшинно введением очищенного и концентрированного АГ (50-100 мкг/мышь) в смеси с полным адьювантом Фрейнда (Sigma, G), последующие – с неполным адьювантом Фрейнда. Бустер-иммунизацию осуществляли путем внутривенного введения очищенных гликопротеидов вируса гриппа в дозе 30 мкг/мышь за 3 дня до выделения клеток селезенки и проведения процедуры слияния.

Получение МКА. Слияние клеток селезенки гипериммунных животных и перевиваемой линии мышинной миеломы X63Ag8.653 проводили по методу, описанному в работе. Отбор специфических гибридов осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) и в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). В качестве АГ в обеих реакциях использовали гомологичный вирус А/Алматы/347/09 (H1N1)v. Положительные гибридные клетки дважды клонировали методом предельных разведений.

Асцитную жидкость, содержащую МКА, получали, как описано ранее [**Ошибка! Закладка не определена.**].

ИФА. 96-луночные панели ("NUNC", Дания) сенсibilизировали вирусом А/Алматы/347/09 (H1N1)v в концентрации 2 мкг/мл и инкубировали с МКА в серийных разведениях. Далее реакцию выполняли, как описано ранее [**Ошибка! Закладка не определена.**].

РТГА проводили с использованием 0,75% взвеси эритроцитов человека группы 1(0) или кур по стандартной методике. При постановке РТГА использовались МКА в концентрации 8-10 мг/мл.

Результаты исследования

После бустер-иммунизации, слияния и первичной гибридизации получено 12 антителопродуцирующих клонов, активно реагировавших в ИФА с АГ вируса гриппа А/Алматы/347/09 (H1N1)v и не взаимодействовавших с препаратами гетерологичных вирусов гриппа человека. Положительные специфически реагирующие гибриды клонировали дважды методом лимитирующих разведений. После первого клонирования антителпродукцию сохранили восемь клонов, второго – лишь два (МКА 4D₃ и МКА 7D₅).

В результате изучения спектра реактивности в непрямом варианте ИФА установлено, что оба МКА взаимодействовали с вирусами гриппа А/California/04/09 (H1N1)v, А/Swine/Hong-Kong/1/74 (H1N1) и А/New Jersey/8/76(H1N1) (рис.1). МКА 7F5, кроме вышеперечисленных штаммов, выявляли вирусы гриппа А(H1N1): А/Swine/Iowa/15/30 и А/Swine/USA/1976/31 (рис.2), изолированные от свиней в начале 30-х годов XX века, т.е. в период пост-пандемической циркуляции возбудителей гриппа «испанской эры», сохранившихся в популяции животных в малоизмененном виде. При этом не было выявлено перекрестного реагирования с другими субтипами вирусов гриппа А, включая штаммы сезонного гриппа А(H1N1), А(H3N2) и возбудителя пандемии «азиатского» гриппа А(H2N2) 1957 г. Полученные МКА не взаимодействовали также с вирусами гриппа В Викторианской и Ямагатской линий.

ОП₄₅₀

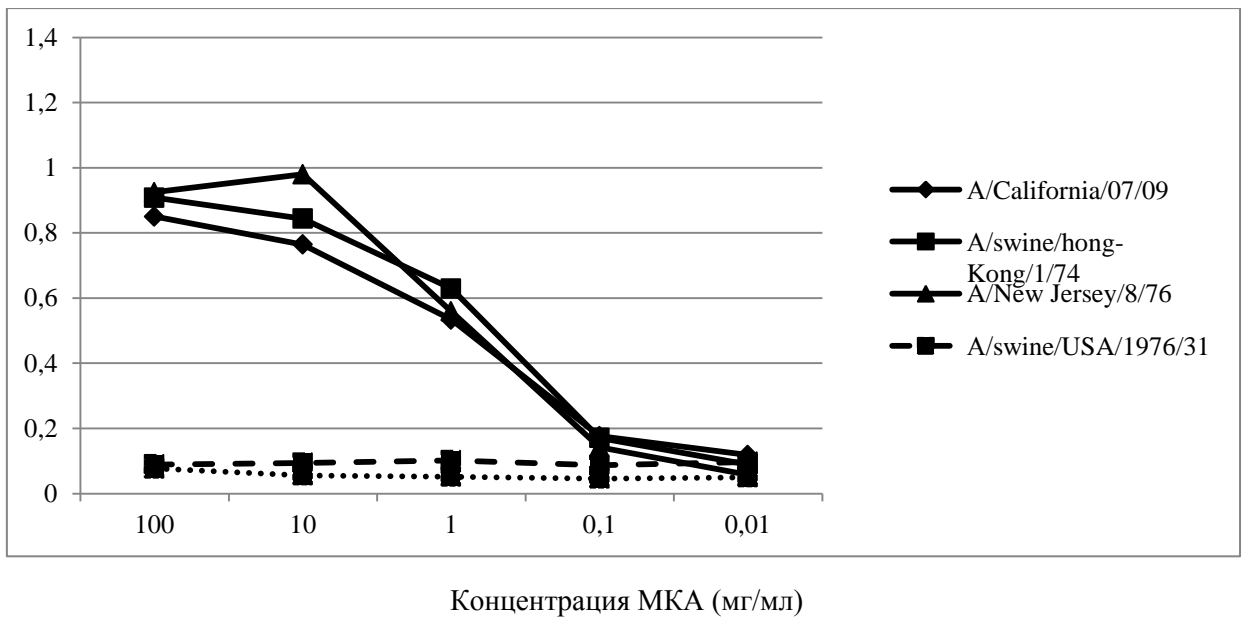


Рисунок 1 - Специфическая активность моноклональных антител 4D₃ в отношении вирусов А(Н1N1) в иммуноферментном анализе

ОП₄₅₀

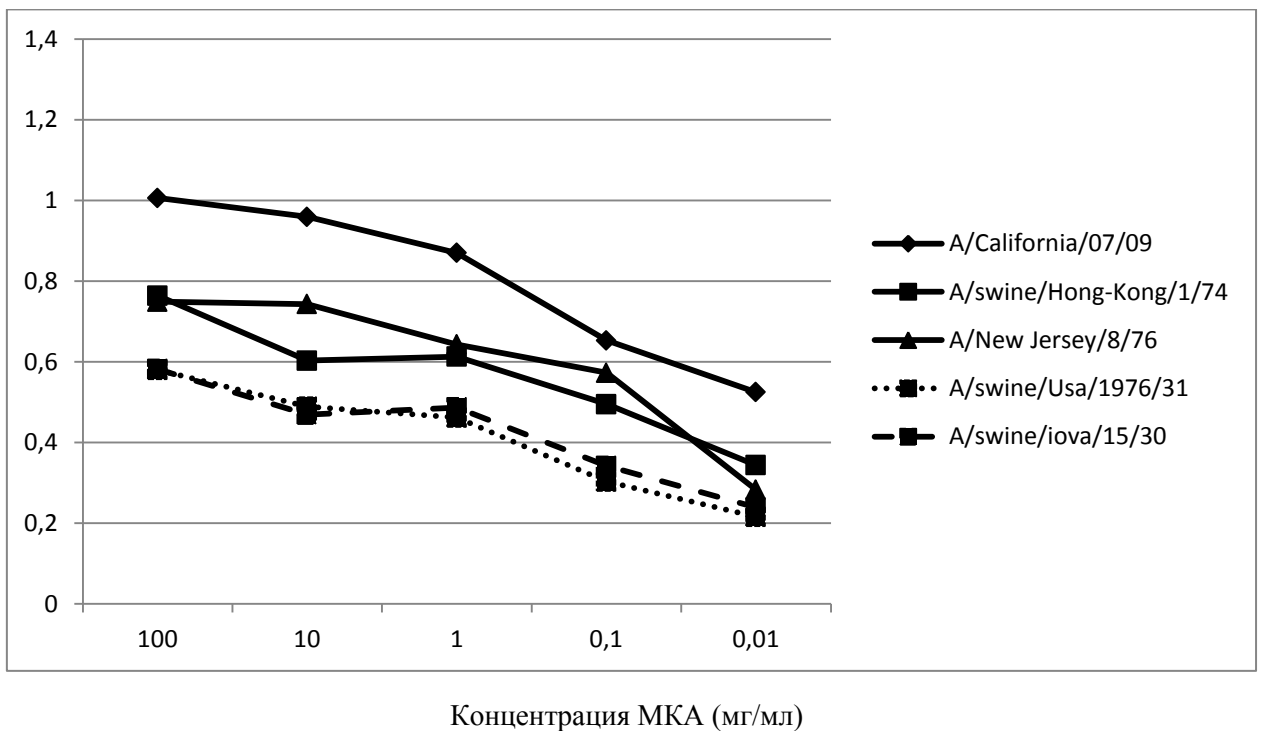


Рисунок 2 - Специфическая активность моноклональных антител 7F₅ в отношении вирусов А(Н1N1) в иммуноферментном анализе

Препараты МКА исследованы в РТГА с человеческими и свиными вирусами гриппа А различных субтипов и вирусами гриппа В (таблица 1). Как видно из таблицы, МКА 4D₃ и 7F₅ в высоких титрах (1:2560-1:10240) реагировали с вирусами, антигенно родственными штамму А/California/04/09 (А/Алматы/352/09 и А/Алматы/373/09) и с вирусами гриппа 70-х годов выделения (А/Swine/Hong-Kong/1/74 и А/New Jersey/8/76). Кроме того МКА 7F₅ взаимодействовали с референс-штаммами вирусов гриппа свиней А(Н1N1) ранних лет выделения (А/Swine/Iowa/15/30 и А/Swine/USA/1976/31). С вирусами гриппа В, А(Н3N2), А(Н2N2) и сезонными штаммами вирусов гриппа А(Н1N1) МКА 4D₃ и 7F₅ не взаимодействовали. Для контроля активности МКА параллельно использовали поликлональные диагностические сыворотки к вирусам гриппа А(Н1N1)v: А/California/04/09, А/Санкт-Петербург/56/09 и А/Алматы/347/09 (таблица 1). Титры подавления гемагглютинирующей активности МКА в РТГА значительно превышали таковые поликлональных сывороток.

Таблица 1- Спектр реактивности моноклональных антител к вирусу А/Алматы/347/09 (Н1N1)v в реакции торможения гемагглютинации

Вирусы	Титр				
	МКА		Поликлональная сыворотка		
	4D ₃	7F ₅	А/Калифорния/04/09	А/Санкт-Петербург/56/09	А/Алматы/347/09
А/Алматы/347/09 (Н1N1)v	20480*	40960	5120	1280	1280
А/California/04/09 (Н1N1)v	10240	20480	5120	640	640
А/New Jersey/8/76 (Н1N1)	2560	1280	2560	160	320
А/Swine/Hong-Kong/1/74 (Н1N1)	2560	320	2560	160	320*
А/Swine/USA/1976/31 (Н1N1)	<10	320	1280	320	160
А/Swine/Iowa/15/30 (Н1N1)	<10	320	1280	<10	20
А/Singapore/1/57 (Н2N2)	<10	<10	<10	<10	<10
А/Wisconsin/67/05 (Н3N2)	<10	<10	<10	<10	<10
В/Florida/09/06	<10	<10	<10	<10	<10
В/Jamanashi/166/98	<10	<10	<10	<10	<10
В/Brisbane/60/08	<10	<10	<10	<10	<10
В/Shandong/07/07	<10	<10	<10	<10	<10
А/Алматы/662/11 (Н1N1)	<10	<10	40	<10	20
А/Алматы/352/09 (Н1N1)v	5120	10240	2560	320	320
А/Алматы/37/309 (Н1N1)v	10240	10240	2560	320	320

Примечание - * представлены обратные величины титров

Обсуждение

Как известно, в составе молекулы НА находятся как переменные, так и высококонсервативные детерминанты, которые принимают участие в агглютинации куриных эритроцитов. Изучение спектра реактивности разработанных нами МКА со свиными вирусами и вирусами человека свиного происхождения разных лет выделения позволяет сделать вывод о том, что МКА 7F₅, в отличие от МКА 4D₃, направлены к высококонсервативной детерминанте молекулы НА, присутствовавшей у штаммов, циркулировавших в 30-е годы прошлого столетия, и сохранившейся у современных изолятов 2009-2011 годов. Полученные результаты позволяют предположить, что МКА 7F₅ имеют более ценные иммунологические характеристики по сравнению с МКА 4D₃, и не потеряют своей диагностической актуальности. Таким образом, МКА 7F₅ могут использоваться в создании тест-систем для детекции вирусных антигенов, а также

углубленного изучения механизмов изменчивости и антигенной характеристики новых пандемических вирусов.

Литература:

- 1 Онищенко Г.Г., Ежова Е.Б., Лазикова Г.Ф. и др. Пандемия гриппа А/Н1N1/09 в мире и Российской Федерации в 2009-2010 гг. и прогноз на 2010-2011 гг. // ЖМЭИ. - 2010. - № 6. - С.12-17.
- 2 Иванова В.Т., Матюшина Р.О., Слепушкин А.Н. и др. Эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В в сезоне 2005-2006гг. в России // Вопр. вирусол. - 2008. - №4. - С.13-18.
- 3 Гендон Ю.З. Свиной грипп Н1N1/Калифорния – страсти и факты //ЖМЭИ. - № 4.- 2010. - С. 105-114.
- 4 Икранбегийн Р., Кузнецова Т.В., Грудинин М.П. и др. Молекулярно-генетическое свойство пандемического вируса Н1N1v, циркулировавшего на территории Казахстана (2009-2010) // Вестник НГУ. Сер. биол., клинич. мед. - 2012. - Т.10, №3. - С.80-86.
- 5 Hall R. J, Peasey hi., Huang Q. S., Carter P. E. Rapid method to support diagnosis of swine origin influenza virus infection by sequencine of real-time PCR amplicons from diagnostic assays // J. Clin. Microbiol. - 2009.- Vol.47.- P.3053-3054.
- 6 Соминина А.А., Банников А.И., Зарубаев В.В., Васин А.В. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Вопр. общей вирусол./ под ред. О.И. Киселева. Санкт-Петербург. - 2007.- С. 311-362.
- 7 Куц А. А., Климова Р. Р., Масалова О. В. и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенного на территории Российской Федерации // Вопр. вирусол. - 2008. - Т.53, №5. - С.9-14.
- 8 Березин В. Э., Исаева Е. С. Методы получения поверхностных антигенов вируса гриппа // Изв. АН Каз. ССР. Сер. биол. - 1982, №3.- С.5-10.
- 9 Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity// Nature. - 1976.- Vol.256.- P.495-497.
- 10 Дерябин П. Г. Бутенко А. М., Бурцева Е. И. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации // Мед. вирусол./ Под ред. Д. К. Львова. М., 2008. - С.312-318.
- 11 Киселев О.И. Структура НА и NA пандемического вируса Н1N1v-2009 и детерминанты патогенности //В кн: Геном пандемического вируса гриппа А/Н1N1- 2009. Санкт-Петербург-Москва. Комп. «Димитрейд График Групп®». 2011.

Түйін

Т.И. ГЛЕБОВА, Н.Г. ИШМУХАМЕТОВА, Т.В. КУЗНЕЦОВА,
М.Г. ШАМЕНОВА, Б.Б. БАЙМАХАНОВА

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы қаласы

А/АЛМАТЫ/347/09 (Н1N1)V ТҰМАУ ВИРУСЫНЫҢ МОНОКЛОНАЛДЫ АНТИДЕНЕЛЕРІНІҢ РЕАКТИВТІ СПЕКТРІН АНЫҚТАУ

А/Алматы/347/09 (Н1N1)v тұмау вирусына алынған моноклоналды антаденелердің (МКА 4D₃ и МКА 7D₅) иммунологиялық сипаттамасын зерттеу жұмыстарының нәтижелері көрсетілген. МКА 7D₅ - тұмау вирусымен кең көлемде байланыс түзетіндігі байқалды, соның нәтижесінде оны вирусты антигендердің детекциясы үшін арнайы тест-жүйелерді жасауға қолдануға болады.

RSOE on the right of economic management “Institute of Microbiology and Virology”,
Committee of Science, Ministry of Education and Science, Republic of Kazakhstan, Almaty

PREPARATION AND STUDY OF THE REACTIVITY SPECTRUM OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE INFLUENZA A/ALMATY/347/09 (H1N1)V VIRUS

The findings of the study on the immunological characteristics of monoclonal antibodies (MCA 4D₃ and MCA 7D₅), produced to the influenza A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus, are presented. It was shown that MCA 7D₅ have a wider range of responses to influenza A virus (H1N1), which allows recommending them for use in the development of specific test systems for the detection of viral antigens. Development of influenza caused by a new pandemic A(H1N1)v virus, was first recorded in April 2009 in Mexico and USA [1, 2]. After the establishment of possibility of the virus transmission from person to person in several countries, WHO announced the swine influenza pandemic [3]. In Kazakhstan, the first laboratory-confirmed case of the disease, associated with a new variant of influenza (H1N1)v virus, was registered in June 2009. Influenza epidemic lasted until mid-2010. The strain population was genetically homogeneous, and by hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) similar to the reference variant A/Kaliforniya/07/09 (H1N1)v by 99,2-99,4% [4].

The epidemic pattern of influenza spread, severity of the disease, and produced complications cause the need for rapid and effective diagnostics, which further determines the prompt antiviral therapy.

Currently, to identify the influenza virus, the procedures of genetic diagnostics using PCR test systems are most widely used [5]. However, the methods based on the detection of influenza virus antigens are still relevant to solve practical and fundamental problems. Monoclonal antibodies (MCA) are used as effective diagnostic reagent for this effect [6]. The aim of this study was to obtain and analyze the reactivity spectrum of MCA to the influenza A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus.

Material and procedures

Viruses. To produce MCA, the influenza A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus, isolated from nasopharyngeal swab of patient with ARVI in autumn 2009, was used [4]. The analysis of the reactivity spectrum of MCA was carried out with reference strains of viruses isolated from swine: A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1), A/Swine/USA/1976/31 (H1N1) and A/Swine/Hong-Kong/1/74 (H1N1); human influenza viruses of swine origin: A/California/04/09 (H1N1)v and A/New Jersey/8/76 (H1N1), A/Singapore/1/57 (H2N2), A/Wisconsin/67/05 (H3N2), type B viruses of different evolutionary lines, as well as with seasonal and pandemic Kazakhstan strains of influenza A(H1N1)v viruses.

Antigen (AG) preparation. A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus was cultivated in the allantoic cavity of 9-day-old chick embryos, further concentrated, purified, and inactivated as described previously [7]. Preparations of surface glycoproteins were produced from the purified concentrated virus suspension by treatment with 5% MESC detergent. HA and NA were separated by centrifugation at 29 000 rpm for 2 hours [8].

Immunization of animals. For immunization 7-8 week-old BALB/c mice, weighing 15-20 g, were used. Previously animals were kept under observation during 15 days. The first immunization was done intraperitoneally by introduction of the purified and concentrated AG (50-100 µg per mouse) in combination with Freund's complete adjuvant (Sigma, G), the following one - with Freund's incomplete adjuvant.

Booster immunization was carried out by intravenous introduction of purified glycoproteins of influenza virus at a dose of 30 µg per mouse 3 days before the isolation of spleen cells and fusion procedure.

MCA production. Fusion of spleen cells of hyperimmune animals with transplantable line of mouse X63Ag8.653 myeloma was carried out by the procedure described in [9]. Selection of specific hybrids was realized using solid phase enzyme immunoassay (EIA) and in hemagglutination-inhibition reaction (HAIR). As AG, in both reactions the homologous virus A/Almaty/347/09 (H1N1)v was used. The positive hybrid cells were cloned twice by limiting dilution technique.

Ascitic fluid containing MCA was prepared as previously described [4].

EIA. 96-well plates (“NUNC”, Denmark) were sensitized with A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus at a concentration of 2 µg/ml and incubated with MCA in serial dilutions. Further, the reaction was conducted as previously described [4].

HAIR was carried out using 0.75% suspension of human group 1 (0) or chicken erythrocytes by the standard procedure [10]. In setting HAIR, MCA at a concentration of 8-10 mg/ml were used.

Research findings

After the booster immunization, fusion and initial hybridization 12 of antibody-producing clones were produced, which actively reacted in EIA with AG of the influenza A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus and did not interact with preparations of heterologous human influenza viruses. Positive specifically reacting hybrids were cloned twice using limiting dilution technique. After the first cloning, eight clones preserved antibody production, after the second one - only two (MCA 4D₃ and MCA 7D₅).

Analysis of the reactivity spectrum in indirect EIA revealed that both MCA interacted with the influenza viruses A/California/04/09 (H1N1)v, A/Swine/Hong-Kong/1/74 (H1N1) and A/New Jersey/8/76(H1N1) (Fig. 1). MCA 7F5, besides the above mentioned strains, were revealed by A(H1N1) viruses: A/Swine/Iowa/15/30 and A/Swine/USA/1976/31 (Fig. 2), isolated from swine in the early 30ies of XX century, i.e., in the period of post-pandemic circulation of influenza pathogens of the “Spanish” era, preserved in the population of animals in slightly changed form. At that, no cross-reactivity with other subtypes of influenza A viruses was established, including strains of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and pandemic agent of “Asian” influenza A(H2N2) in 1957. The produced MCA also did not interact with influenza B viruses of Victoria- and Yamagata-line.

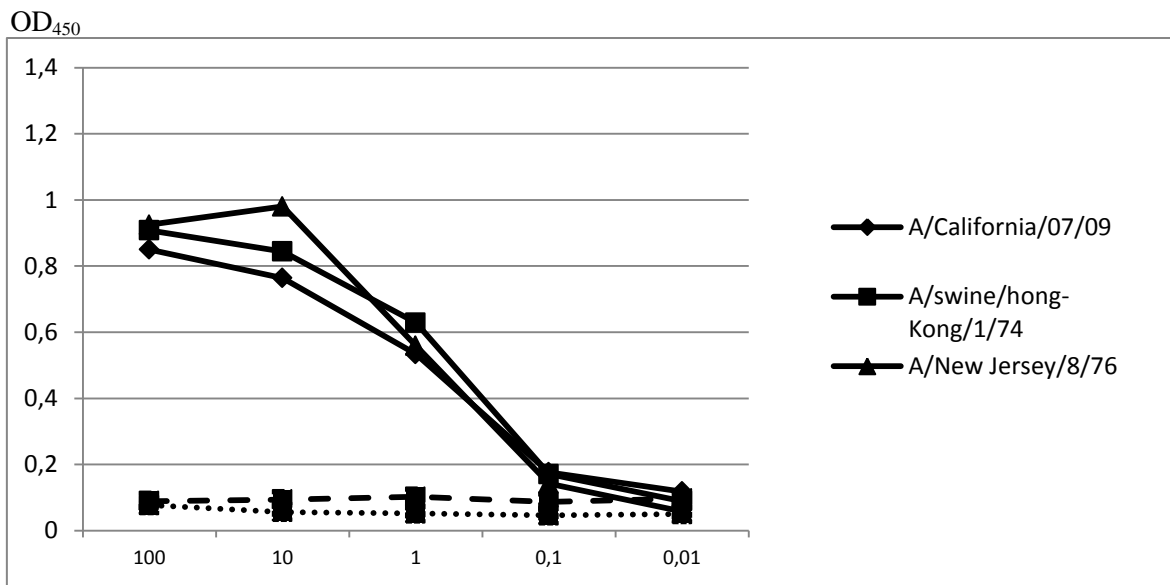


Figure 1 - Specific activity of monoclonal antibodies 4D₃ against A(H1N1) viruses in enzyme-immunoassay

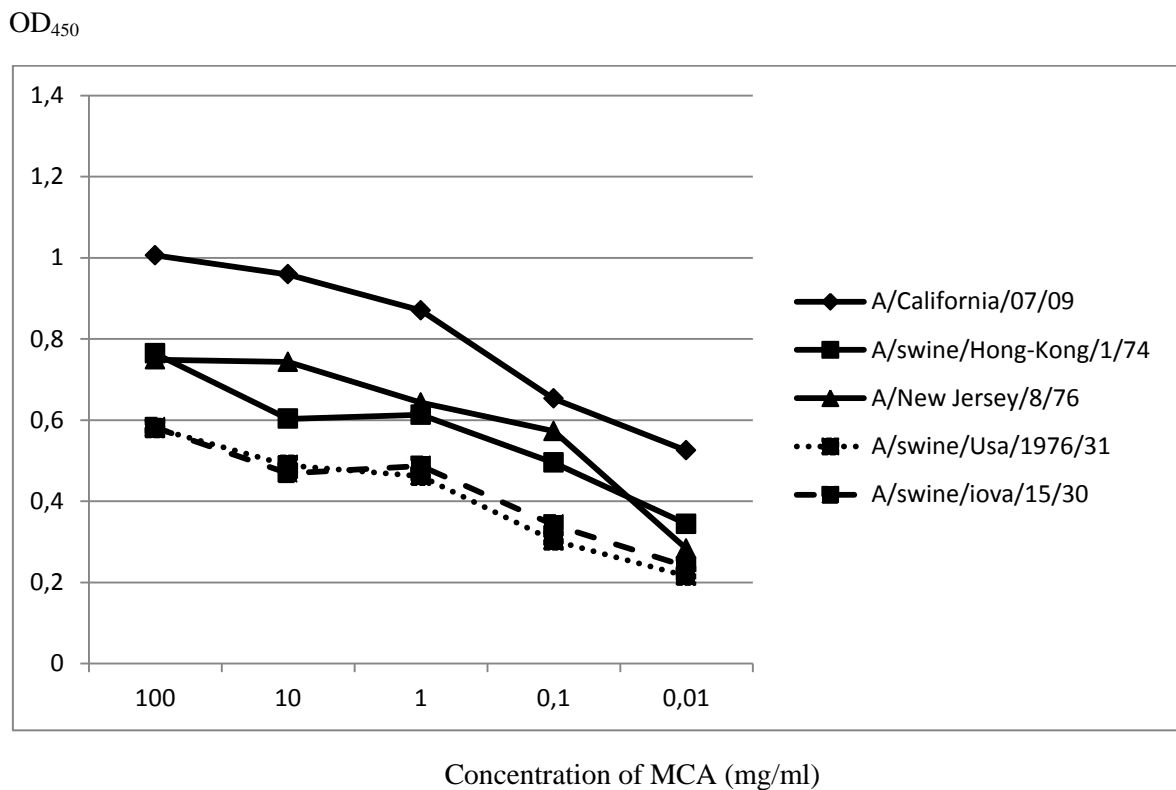


Figure 2 - Specific activity of monoclonal antibodies 7F₅ against A(H1N1) viruses in enzyme-immunoassay

Preparations of MCA were studied in HAIR with the human and swine influenza A viruses of different subtypes and influenza B viruses (Table). As can be seen from the table, MCA 4D₃ and 7F₅ in high titers (1:2560-1:10240) reacted with viruses antigenically related to

the strain A/California/04/09 (A/Almaty/352/09 and A/Almaty/373/09) and influenza viruses isolated in the 70's (A/Swine/Hong-Kong/1/74 and A/New Jersey/8/76). In addition, MCA 7F₅ interacted with reference strains of swine influenza A(H1N1) virus isolated in early years (A/Swine/Iowa/15/30 and A/Swine/USA/1976/31). MCA 4D₃ and 7F₅ did not interact with influenza B viruses, A(H3N2), A(H2N2), and seasonal strains of influenza A(H1N1) viruses. To monitor the activity of MCA, the polyclonal diagnostic serums to influenza A (H1N1)v viruses: A/California/04/09, A/St.Petersburg/56/09 and A/Almaty/347/09, were used simultaneously (Table). Hemagglutination inhibition titers of MCA in HAIR significantly exceeded those of polyclonal antisera.

Table 1 - Reactivity spectrum of monoclonal antibodies to A/Almaty/347/09 (H1N1)v virus in hemagglutination-inhibition reaction

Viruses	Titer		Polyclonal serum		
	MCA		A/California	A/St.Petersburg	A/Almaty
	4D ₃	7F ₅	/04/09	/56/09	/347/09
A/Almaty/347/09 (H1N1)v	20480*	40960	5120	1280	1280
A/California/04/09 (H1N1)v	10240	20480	5120	640	640
A/New Jersey/8/76 (H1N1)	2560	1280	2560	160	320
A/Swine/Hong-Kong/1/74 (H1N1)	2560	320	2560	160	320*
A/Swine/USA/ 1976/31 (H1N1)	<10	320	1280	320	160
A/Swine/Iowa/15/30 (H1N1)	<10	320	1280	<10	20
A/Singapore/1/57 (H2N2)	<10	<10	<10	<10	<10
A/Wisconsin/67/05 (H3N2)	<10	<10	<10	<10	<10
B/Florida/09/06	<10	<10	<10	<10	<10
B/Jamanashi/166/98	<10	<10	<10	<10	<10
B/Brisbane/60/08	<10	<10	<10	<10	<10
B/Shandong/07/07	<10	<10	<10	<10	<10
A/Almaty /662/11 (H1N1)	<10	<10	40	<10	20
A/Almaty /352/09 (H1N1)v	5120	10240	2560	320	320
A/Almaty /37/309 (H1N1)v	10240	10240	2560	320	320

Note - * titer inverse values are represented

Discussion

As is known, in the HA molecule there are both variable and highly conserved determinants that are involved in the agglutination of chicken erythrocytes [1]. The study of the reactivity spectrum of MCA, which we have developed with swine viruses and human viruses of swine origin isolated in different years, allows to conclude that MCA 7F₅, unlike MCA 4D₃, are directed to a highly conserved determinant of the HA molecule, available in the strains circulating in 30ies of the last century, and preserved in contemporary isolates of 2009-2011. These findings allow to suggest that MCA 7F₅ possess more valuable immunological characteristics in comparison with MCA 4D₃, and will not lose their diagnostic relevance. Thus, MCA 7F₅ could be used in the development of test systems for the detection of viral antigens, as well as in-depth study of the mechanisms of variability and antigenic characterization of new pandemic viruses.

References:

- 1 Онищенко Г.Г., Ежова Е.Б., Лазикова Г.Ф. и др. Пандемия гриппа А/Н1N1/09 в мире и Российской Федерации в 2009-2010 гг. и прогноз на 2010-2011 гг. // ЖМЭИ. - 2010. - № 6.- С.12-17.
- 2 Иванова В.Т., Матюшина Р.О., Слепушкин А.Н. и др. Эпидемические штаммы вирусов гриппа А и В в сезоне 2005-2006гг. в России // Вопр. вирусол. - 2008. - №4.- С.13-18.
- 3 Гендон Ю.З. Свиной грипп Н1N1/Калифорния – страсти и факты // ЖМЭИ. - № 4.- 2010. - С.105-114.

⁴ Икранбегийн Р., Кузнецова Т.В., Грудинин М.П. и др. Молекулярно-генетическое свойство пандемического вируса H1N1v, циркулировавшего на территории Казахстана (2009-2010)// Вестник НГУ. Сер. биол., клинич. мед. - 2012. Т.10, №3. - С.80-86.

⁵ Hall R. J, Peacey hi., Huang Q. S., Carter P. E. Rapid method to support diagnosis of swine origin influenza virus infection by sequencine of real-time PCR amplicons from diagnostic assays // J. Clin. Microbiol. - 2009. - Vol.47. - P.3053-3054.

⁶ Соминина А.А., Банников А.И., Зарубаев В.В., Васин А.В. Лабораторная диагностика вирусных инфекций // Вопр. общей вирусол./ под ред. О.И. Киселева. Санкт-Петербург. - 2007. - С.311-362.

⁷ Куш А. А., Климова Р. Р., Масалова О. В. и др. Получение и свойства моноклональных антител к высокопатогенному штамму вируса гриппа птиц А(Н5N1), выделенного на территории Российской Федерации// Вопр. вирусол. - 2008.- Т.53, №5. - С.9-14.

⁸ Березин В. Э., Исаева Е. С. Методы получения поверхностных антигенов вируса гриппа// Изв. АН Каз. ССР. Сер. биол. – 1982. - №3.- С.5-10.

⁹ Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity // Nature. - 1976. Vol.256. - P.495-497.

¹⁰ Дерябин П. Г. Бутенко А. М., Бурцева Е. И. Реакция гемагглютинации и реакция торможения гемагглютинации // Мед. вирусол./ Под ред. Д. К. Львова. М., 2008. - С.312-318.

¹¹ Киселев О.И. Структура HA и NA пандемического вируса H1N1v-2009 и детерминанты патогенности //В кн: Геном пандемического вируса гриппа А/H1N1- 2009. Санкт-Петербург-Москва. Комп. «Димитрейд График Групп®». 2011.