

МРНТИ: 34.25.29

Н.Т. САКТАГАНОВ¹, Т.И. ГЛЕБОВА¹, А.М. БАЙМУХАМЕТОВА¹, С.Б. БАЙСЕЙИТ¹,
Н.С. ОНГАРБАЕВА^{1*}, Д.А. ИСМАГУЛОВА¹, Г.В. ЛУКМАНОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹,
Г.К. АБДИЛОВА², Н.Т. ЖАНУЗАКОВА², Е.И. ИСАЕВА³

*nuray.syrlybay@gmail.com

¹ТОО «Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии,
Алматы, Казахстан

²«Научный центр педиатрии и детской хирургии», Алматы, Казахстан

³ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и
микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ,
Москва, Россия

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.04

Аннотация

В работе представлены результаты изучения биологической активности штаммов вируса гриппа А и В, выделенных от людей в 2018-2020 гг. в Республике Казахстан, после хранения при 4°C в лиофильновысушенном состоянии. В результате исследования установлено, что после хранения лиофилизированных вирусов гемагглютинирующая активность у некоторых штаммов через три месяца снизилась вдвое, у остальных - осталась на прежнем уровне. Инфекционная активность всех протестированных вирусов гриппа снизилась в среднем на 1-2 lg EID_{50/0,2 мл}. Через шесть месяцев хранения как гемагглютинирующая, так и инфекционная активности всех вирусов гриппа остались практически на том же уровне.

Таким образом, лиофильное высушивание вирусов гриппа сохраняет их гемагглютинирующую и инфекционную активности после шести месяцев хранения. Полученные результаты позволяют использовать данный метод в сочетании с криоконсервацией для длительного хранения вирусов гриппа.

Ключевые слова: вирус, грипп, антиген, лиофилизация, препарат

Вирусы гриппа поражают не только человека, но и широко распространены среди млекопитающих. Ежегодно коллекция вирусов гриппа пополняется новыми штаммами, изолированными как от людей, так и от животных [1, 2]. Важными задачами, стоящими перед государственными коллекциями патогенных вирусов, являются поддержание коллекционных штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных свойств в течение максимально возможного времени, а также обеспечение ими научно-исследовательских, образовательных, медицинских и производственных учреждений. Для решения этих задач используют различные методы долгосрочной консервации штаммов [3, 4, 5].

Сохранение генофонда вирусов XX и XXI столетий для настоящих и будущих поколений исследователей предполагает коллекционирование патогенных или условно-патогенных для человека вирусов. Основное назначение вирусологических коллекций заключается в хранении чистых культур антигенов. Собрать типовые штаммы по международным стандартам, штаммы, производственные и селекционированные в лабораториях или выделенные от больных людей и животных — это лишь часть коллекционной задачи. Необходимо сохранить оригинальные штаммы вирусов на многие десятилетия без изменений их первоначальных свойств — молекулярной, антигенной и генетической структуры, иммуногенной потенции. Поддержание штаммов в рабочем

состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов.

В настоящее время используются различные методы хранения вирусов. Среди них такие как использование жидкого азота (-196°C) для заморозки вирусосодержащих культуральной и аллантаоисной сред и криоконсервация в низкотемпературном морозильнике (-80°C). Однако одним из основных и часто используемых методов хранения микробных и вирусных культур в течение продолжительного периода времени, обеспечивающим минимизацию количества генераций штаммов, является лиофилизация, которая позволяет получать большое количество удобных для хранения и транспортировки герметизированных ампул аликвот вирусной культуры с одинаковыми свойствами [6, 7, 8, 9, 10]. Кроме того, лиофилизация, является экономичным и эффективным методом длительного хранения вирусов, бактерий и других микроорганизмов [11].

Целью данной работы явилось изучение гемагглютинирующей и инфекционной активности лиофильно высушенных штаммов вируса гриппа А и В, выделенных от людей в 2018-2020 гг. в Республике Казахстан, после хранения их в течение шести месяцев.

Материалы и методы

В качестве объекта лиофилизации использовали аллантаоисные культуры вирусов гриппа А (H1N1 и H3N2) и В, выделенных в 2018-2020 гг. в различных регионах Казахстана (А/Алматы/04/18, В/Алматы/08/18, А/Алматы/05/19, А/Павлодар/11/19, А/СКО/18/19, А/Караганды/38/19, А/ВКО/39/19, А/ЗКО/41/19, А/Алматы/02/20, А/ВКО/05/20, А/Алматы/07/20 и А/Алматы/11/21).

Гемагглютинирующую активность вирусов определяли в реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 0,75% взвеси эритроцитов петуха и человека I(0) группы крови.

Инфекционность лиофильно высушенных штаммов вирусов гриппа после хранения определяли по общепринятому методу [12], титры выражали в $\text{lg ЭИД}_{50/0,2\text{мл}}$.

Лиофилизацию вирусов проводили по специальной программе на установке Альфа 1-2 LD plus фирмы «MartinChrist» (Германия). В качестве стабилизатора использовали водный раствор 0,75% хлорида натрия с 2% раствором желатина и 20% сахарозы. Ампулы с лиофильно высушенными вирусами были заложены на хранение при 4°C .

Результаты и обсуждение

Для работы использовали 12 штаммов вируса гриппа А и В, выделенных от людей в различных регионах Казахстана в 2018-2020 гг. (Алматы - 04/18, 08/18, 05/19, 02/20, 07/20, 11/21; Павлодар - 11/19; СКО - 18/19; ЗКО – 41/19; ВКО – 39/19, 05/20; Караганды – 38/19), с титрами гемагглютинации 1:16 – 1:64.

В результате восстановительных пассажей и клонирования на куриных эмбрионах 12 штаммов вируса гриппа типов А и В, титры гемагглютинации всех вирусов были увеличены до 1:64 - 1:1024. Инфекционная активность вирусов составляла 2,3-9,3 $\text{lg ЭИД}_{50/0,2}$. Самая высокая инфекционность была обнаружена у изолята А/Алматы/04/18 (9,3 $\text{lg ЭИД}_{50/0,2}$), самая низкая – у В/Алматы/08/18 (2,3 $\text{lg ЭИД}_{50/0,2}$).

Аллантаоисную жидкость 12 вирусов гриппа подвергали лиофильному высушиванию, ампулы с лиофилизированными вирусами хранили при 4°C в течение шести месяцев.

Гемагглютинирующую и инфекционную активность лиофилизированных штаммов вируса гриппа А и В проверяли после хранения при 4°C через три и шесть месяцев. Результаты исследования гемагглютинирующей и инфекционной активности после хранения представлены в таблице.

Таблица – Гемагглютинирующая и инфекционная активность штаммов вируса гриппа А и В после лиофильного высушивания и хранения

Изолят	Титр гемагглютинирующей активности			Титр инфекционной активности, (lg ЭИД _{50/0,2 мл})		
	Исходный	После хранения в течение		Исходный	После хранения в течение	
		3 мес.	6 мес.		3 мес.	6 мес.
А/Алматы/04/18 (H1N1)	128	128	64	9,3±0,2	9,5±0,2	8,8±0,1
А/ Алматы /05/19 (H1N1)	256	256	128	8,3±0,4	7,7±0,9	7,3±1,1
А/Павлодар/11/19 (H1N1)	256	128	128	2,4±0,1	1,9±0,4	1,7±0,1
А/СКО/18/19 (H1N1)	64	32	16	3,6±0,5	3,4±0,7	2,7±0,3
А/Караганда/38/19 (H1N1)	128	64	64	5,7±0,4	5,3±0,9	4,5±0,5
А/ВКО/39/19 (H1N1)	1024	512	256	6,3±0,4	5,7±0,4	4,3±1,1
А/ЗКО/41/19 (H1N1)	1024	512	512	5,3±0,9	4,5±0,5	3,6±0,5
А/Алматы/11/21 (H1N1)	64	32	32	3,6±0,5	2,7±0,4	1,8±1,0
А/Алматы/02/20 (H3N2)	64	64	32	4,3±1,1	3,6±0,6	3,3±1,6
А/Алматы/07/20 (H3N2)	64	32	32	2,4±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1
В/ Алматы /08/18	64	64	32	2,3±0,5	2,3±0,3	2,4±0,1
В/ВКО/05/20	128	64	64	2,7±0,3	1,9±0,4	1,7±0,1

Установлено, что после хранения лиофилизированных вирусов в течение трех месяцев при 4°C гемагглютинирующая активность штаммов (А/Павлодар/11/19, А/СКО/18/19, А/Караганда/38/19, А/ВКО/39/19, А/ЗКО/41/19, А/Алматы/07/20 и А/Алматы/11/21) снизилась вдвое, у остальных - осталась на прежнем уровне. Инфекционная активность всех протестированных штаммов вируса гриппа снизилась в среднем на 1-2 lg EID_{50/0,2 мл}, кроме вируса А/Алматы/04/18 (H1N1), у которого эти показатели остались на прежнем уровне.

В результате шести месяцев хранения при тех же условиях гемагглютинирующая активность штаммов варьировала от 1:32 до 1:512. Инфекционная активность всех вирусов гриппа после хранения в течение шести месяцев сохранялась практически на том же уровне и составляла 1,6-8,8 lg EID_{50/0,2 мл}.

В этом исследовании изучалась стабильность вируса гриппа после лиофильного высушивания и хранения в течение трех и шести месяцев и проводился контроль основных показателей их жизнеспособности (гемагглютинирующая и инфекционная активности). Установлено, что инфекционность вируса гриппа сохранялась более пяти месяцев хранения при температуре 4°C. В лиофильно высушенных антигенах не наблюдалось существенной разницы в инфекционности или в титре lg ЭИД_{50/0,2 мл} по сравнению с исходными значениями этих вирусов.

Сублимированные антигены казахстанских штаммов вирусов гриппа А и В могут использоваться в качестве стандартных диагностикумов, поскольку сохраняют свои свойства после шести месяцев хранения при 4°C.

Таким образом, лиофильное высушивание позволяет использовать данный метод криоконсервации для длительного хранения вирусов гриппа.

Литература:

1 Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Baimukhametova A.M., Saktaganov N.T., Lukmanova G.V., Glebova T.I., Sayatov M.K., Berezin V.E., Nusupbaeva G.E., Aikimbayev A.M. Detection of influenza virus and pathogens of acute respiratory viral infections in population of Kazakhstan during 2018-2019 epidemic season. Russian Journal of Infection and Immunity. 2021;11(1):137-147. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOI-1348>

2 Saktaganov N.T., Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Baimukhametova A.M. Study on antigenic relationships and biological properties of swine influenza A/H1N1 virus strains isolated in Northern Kazakhstan in 2018. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology], 2020, Vol. 55 (2), p. 355-363. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.355eng.

3 American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland) : ATCC. 1980. 51 p.

4 Dawes, E. A. Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes. E. A. Dawes Symp. Soc. Gen. Microbiol. 1976. V. 26. P. 19-59.

5 Fortney, K. F. Stabilization of culture productivity7 K. F. Fortney, R. W. Thoma. Dev. Industr. Microbiol. 1977. V. 18. P. 319–325.

6 Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. /Москва. Колос. 1971. 343 с.

7 Флинт Д.М. Некоторые основные аспекты процесса сублимационной сушки материалов. М.: Мир, 1981. С. 1-13.

8 Долинов К.Е. Основные технологии сухих биопрепаратов. М., 1996. – 219 с.

9 Фадеева Л.Л. Основные принципы консервации вирусов методом лиофилизации. М., 2004. 59 с.

10 Пушкарь В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я. Усовершенствование процесса лиофильного высушивания иммунобиологических препаратов на современном оборудовании Вестник ВолгМУ. Вып. 4(10). 2011. С. 6568.

11 Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009; 4(12):99–121.

12 Reed L. and Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints. J. Amer. Hyg. 1938. Vol.27. P. 493-497.

Н.Т. САКТАГАНОВ¹, Т.И. ГЛЕБОВА¹, А.М. БАЙМУХАМЕТОВА¹, С.Б. БАЙСЕЙІТ¹,
Н.С. ОНГАРБАЕВА^{1*}, Д.А. ИСМАГУЛОВА¹, Г.В. ЛУКМАНОВА¹, Н.Г. КЛИВЛЕЕВА¹,
Г.К. АБДИЛОВА², Н.Т. ЖАНУЗАКОВА², Е.И. ИСАЕВА³

*nuray.syrlbay@gmail.com

¹ «Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Алматы, Қазақстан

² «Педиатрия және балалар хирургиясы ғылыми орталығы», Алматы, Қазақстан

³ «Академик Н.Ф. Гамалея атындағы эпидемиология және микробиология федералды ғылыми-зерттеу орталығы» Федералдық мемлекеттік бюджеттік мекеме, Мәскеу, Ресей

ТҰМАУ ВИРУСЫ ШТАМДАРЫН САҚТАУ ҮШІН ЛИОФИЛИЗАЦИЯНЫ ҚОЛДАНУ

Түйін

Зерттеуде Қазақстан Республикасында 2018-2020 жылдары адамдардан бөлінген А және В тұмауы вирусы штамдарын лиофильді кептіріп, 4°C-та сақтағаннан кейінгі биологиялық белсенділігін зерттеу нәтижелері көрсетілген. Зерттеу нәтижесінде лиофилденген вирустарды 4°C температурада сақтағаннан кейін кейбір штамдарда гемагглютинациялау белсенділігі үш айдан кейін екі есе төмендегені, қалғандарында сол деңгейде сақталатыны анықталды. Тексерілген тұмау вирусының бір штаммынан басқа барлық штамдардың инфекциялық белсенділігі орташа есеппен 1-2 lg EID_{50/0,2 мл} төмендеді. Алты ай сақтағаннан кейін барлық тұмау вирустарының гемагглютинациялық және инфекциялық белсенділігі іс жүзінде бірдей деңгейде қалды.

Осылайша, тұмау вирусының лиофильді кептірілуі алты ай сақталғаннан кейін олардың гемагглютинациялық және инфекциялық белсенділігін сақтайды. Алынған нәтижелер тұмау вирусын ұзақ уақыт сақтау үшін криоконсервациялаудың осы әдісін қолдануға мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: вирус, тұмау, антиген, лиофилизация, препарат

IRSTI: 34.25.29

N.T. SAKTAGANOV¹, T.I. GLEBOVA¹, A.M. BAIMUKHAMETOVA¹, S.B. BAISEYIT¹,
N.S. ONGARBAEVA^{1*}, D.A. ISMAGULOVA¹, G. V. LUKMANOVA¹,
N.G. KLIVLEYEVA¹, G.K. ABDILOVA², N.T.ZHANUZAKOVA², E.I. ISAEVA³
*nuray.syrlybay@gmail.com

¹ LLC “Research and Production Center for Microbiology and Virology”, Almaty, Kazakhstan

²Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery, Almaty, Kazakhstan

³FSBI Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

USE OF LYOPHILIZATION FOR STORING INFLUENZA VIRUS STRAINS

doi: 10.53729/MV-AS.2021.04.04

Summary

The paper presents the results of studying the biological activity of influenza A and B virus strains isolated from humans in 2018-2020 in the Republic of Kazakhstan, after storage at 4 ° C in a freeze-dried state. As a result of the study, it was found that after storage of lyophilized viruses, the hemagglutinating activity in some strains decreased by half after three months, while in the rest it remained at the same level. The infectious activity of all tested influenza viruses decreased by an average of 1-2 lg EID_{50/0.2 ml}. The hemagglutinating and infectious activity of all influenza viruses remained practically at the same level after six months of storage.

Thus, freeze drying of influenza viruses retains their hemagglutinating and infectious activity after six months of storage. The results obtained make it possible to use this cryopreservation method for long-term storage of influenza viruses.

Key words: virus, influenza, antigen, lyophilization, preparation

Influenza viruses infect not only humans, but they are also widespread among mammals. Every year, the collection of influenza viruses is replenished with new strains isolated from both humans and animals [1, 2]. The important tasks facing the state collections of pathogenic viruses are to maintain the collection strains in a viable state with the preservation of their original properties for the maximum possible time, as well as to provide them with research, educational, medical, and industrial institutions. To solve these problems, various methods of long-term conservation of strains are used [3, 4, 5].

The preservation of the gene pool of viruses of the XX and XXI centuries for present and future generations of researchers presupposes the collection of viruses that are pathogenic or conditionally pathogenic for humans. The main purpose of virological collections is to store pure antigen cultures. Collecting type strains, international standards, production, and selection in laboratories, or isolated from sick people, animals and vectors is only part of the collection task. It is necessary to preserve the original strains of viruses for many decades without changing their original properties - biology, antigenic and genetic structure, immunogenic potency. Maintaining strains in working order, preserving their valuable properties are

important conditions for almost any work with microorganisms - from initial study to their use in the production of various biological preparations.

Currently, various methods of virus storage are used: this is the use of liquid nitrogen (-196 ° C) for freezing virus-containing cell culture and allantoic fluid, cryopreservation in a freezer (-80 ° C). However, one of the main and frequently used methods of storage of microbial and viral cultures for a long period of time, which minimizes the number of generations of strains, is lyophilization, which allows to obtain many convenient for storage and transportation of sealed ampoules of viral aliquots with the same properties [6, 7, 8, 9, 10]. In addition, lyophilization is an economical and effective method of long-term storage of viruses, bacteria, and other microorganisms [11].

The aim of this work was to study the hemagglutinating and infectious activity of freeze-dried strains of influenza A and B viruses isolated from humans in the Republic of Kazakhstan in 2018-2020, after storing for six months.

Materials and methods

Allantoic cultures of influenza A (H1N1 and H3N2) and B viruses isolated in 2018-2020 in various regions of Kazakhstan (A/Almaty/04/18, B/Almaty/08/18, A/Almaty/05/19, A/Pavlodar / 1/19, A / SKO/18/19, A / Karagandy/38/19, A/VKO /39/19, A/ZKO/41/19, A/Almaty/02/20, A/VKO/05/20, A/Almaty/07/20 and A/Almaty/11/21) were used as an object for lyophilization.

Hemagglutinating activity of viruses was determined in hemagglutination assay (HA assay) using 0.75% suspension of a rooster and a person of 0 (1) blood group erythrocytes.

The infectivity of freeze-dried strains of influenza viruses after storage was determined according to the generally accepted method [12], and their titers were expressed in lg EID_{50/0.2 ml}.

Lyophilization of viruses was carried out according to a special program on an Alpha 1-2 LD plus MartinChrist device (Germany). An aqueous solution of sodium chloride 0.75% in a solution of gelatin 2%, and sucrose 20% was used as a stabilizer. Freeze-dried viruses in ampoules were stored at 4°C.

Results and discussion

For the work, 12 strains of influenza A and B viruses isolated from people in various regions of Kazakhstan in 2018-2020 (Almaty - 04/18, 08/18, 05/19, 02/20, 07/20, 11/21; Pavlodar -11/19; RMS - 18/19; WKO - 4/9; East Kazakhstan - 39/19, 05/20; Karaganda - 38/19), with hemagglutination titers 1:16 - 1:64 was used.

As a result of restorative passages and cloning of 12 strains of influenza A and B viruses on chicken embryos, the hemagglutination titers of all viruses were increased to 1:64 - 1: 1024. The infectious activity of the viruses was 2.3-9.3 lgEID_{50/0.2 ml}. The highest infectivity was found in isolate A/Almaty/04/18 (9.3 lg EID_{50/0.2 ml}), the lowest one was found in B/Almaty/08/18 (2.3 lg EID_{50/0.2 ml}).

Allantoic fluid of 12 influenza viruses was freeze-dried, ampoules with lyophilized viruses were stored at 4°C for six months.

The hemagglutinating and infectious activity of the lyophilized influenza A and B virus strains was tested after storage at 4°C for three and six months. The study results of hemagglutinating and infectious activity after storage are presented in the table.

Table - Hemagglutinating and infectious activity of influenza A and B strains after freeze drying and storage

Isolate	Hemagglutinating activity titer			Infectious activity titer (lgEID _{50/0.2 ml})		
	Original	After storage for		Original	After storage for	
		3 months	6 months		3 months	6 months
A/Almaty/04/18 (H1N1)	128	128	64	9,3±0,2	9,5±0,2	8,8±0,1
A/Almaty/05/19 (H1N1)	256	256	128	8,3±0,4	7,7±0,9	7,3±1,1
A/Pavlodar/11/19 (H1N1)	256	128	128	2,4±0,1	1,9±0,4	1,7±0,1
A/SKO/18/19 (H1N1)	64	32	16	3,6±0,5	3,4±0,7	2,7±0,3
A/Karaganda/38/19 (H1N1)	128	64	64	5,7±0,4	5,3±0,9	4,5±0,5
A/VKO/39/19 (H1N1)	1024	512	256	6,3±0,4	5,7±0,4	4,3±1,1
A/ZKO/41/19 (H1N1)	1024	512	512	5,3±0,9	4,5±0,5	3,6±0,5
A/Almaty/11/21 (H1N1)	64	32	32	3,6±0,5	2,7±0,4	1,8±1,0
A/Almaty/02/20 (H3N2)	64	64	32	4,3±1,1	3,6±0,6	3,3±1,6
A/Almaty/07/20 (H3N2)	64	32	32	2,4±0,1	1,7±0,1	1,6±0,1
B/Almaty/08/18	64	64	32	2,3±0,5	2,3±0,3	2,4±0,1
B/VKO/05/20	128	64	64	2,7±0,3	1,9±0,4	1,7±0,1

It was found that after storage of lyophilized viruses for three months at 4°C, the hemagglutinating activity of strains (A/Pavlodar/11/19, A/SKO/18/19, A/Karaganda/38/19, A/VKO/39/19, A/ZKO/41/19, A/Almaty/07/20 and A/Almaty/11/21) decreased by half, the hemagglutinating activity of rest ones remained at the same level. The infectious activity of all tested strains of the influenza virus decreased on average by 1-2 lg lgEID_{50/0.2 ml}, except for the A/Almaty/04/18 (H1N1) virus, in which these indicators remained at the same level.

As a result of six months of storage under the same conditions, the hemagglutinating activity of the strains varied from 1:32 to 1: 512. The infectious activity of all influenza viruses after storage for six months remained practically at the same level and amounted to 1.6-8.8 lg EID_{50/0.2 ml}.

In this study, the stability of the influenza virus after freeze drying and storage for three and six months was studied and the main indicators of their viability (hemagglutinating and infectious activities) were monitored. It was found that the infectivity of the influenza virus persisted for more than five months of storage at 4°C. In freeze-dried antigens, there was no significant difference in infectivity or in the titer lg EID_{50/0.2ml} compared with the initial values of these viruses.

Freeze-dried antigens of Kazakh strains of influenza A and B viruses can be used as standard diagnostics, since they retain their properties after six months of storage at 4°C.

Thus, freeze drying makes it possible to use this cryopreservation method for long-term storage of influenza viruses.

References:

1 Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Baimukhametova A.M., Saktaganov N.T., Lukmanova G.V., Glebova T.I., Sayatov M.K., Berezin V.E., Nusupbaeva G.E., Aikimbayev A.M. Detection of influenza virus and pathogens of acute respiratory viral infections in population of Kazakhstan during 2018-2019 epidemic season. Russian Journal of Infection and Immunity. 2021;11(1):137-147. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-DOI-1348>

2 Saktaganov N.T., Klivleyeva N.G., Ongarbayeva N.S., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Baimukhametova A.M. Study on antigenic relationships and biological properties of swine influenza A/H1N1 virus strains isolated in Northern Kazakhstan in 2018. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology], 2020, Vol. 55 (2), p. 355-363. doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.355eng.

3 American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland) : ATCC. 1980. 51 p.

4 Dawes, E. A. Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes. E. A. Dawes Symp. Soc. Gen. Microbiol. 1976. Vol. 26. P. 19-59.

5 Fortney, K. F. Stabilization of culture productivity7 K. F. Fortney, R. W. Thoma. Dev. Industr. Microbiol. 1977. Vol. 18. P. 319–325.

6 Nikitin E.E., Zvyagin I.V. Zamorazhivanie i vy`sushivanie biologicheskikh preparatov. /Moskva. Kolos. 1971. 343 s. (in Russ).

7 Flint D.M. Nekotory`e osnovny`e aspekty` proczessa sublimaczionnoj sushki materialov. M.: Mir, 1981. S. 1-13. (in Russ).

8 Dolinov K.E. Osnovny`e tekhnologii sukhikh biopreparatov. M., 1996. – 219 s. (in Russ).

9 Fadeeva L.L. Osnovny`e principy` konservaczii virusov metodom liofilizaczii. M., 2004. 59 s. (in Russ).

10 Pushkar` V.G., Noviczkaia I.V., Kulakov M.Ya. Uovershenstvovanie proczessa liofil`nogo vy`sushivaniya immunobiologicheskikh preparatov na sovremennom oborudovanii Vestnik VolgMU. Vy`p. 4(10). 2011. S. 6568. (in Russ).

11 Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. Metody` dlitel`nogo khraneniya kollekcziionny`kh kul`tur mikroorganizmov i tendenczii razvitiya. Izvestiya vy`sshikh uchebny`kh zavedenij. Povolzhskij region. Mediczinskie nauki. 2009; 4(12):99–121. (in Russ).

12 Reed L. and Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints. J. Amer. Hyg. 1938. Vol.27. P. 493-497.