

Воронина Маргарита Сергеевна

**ПОЛУЧЕНИЕ АНТИГЕНОВ *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* ДЛЯ
ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИН**

06.02.02 “Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология”

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

Научный руководитель **Потехин Андрей Владимирович**
кандидат ветеринарных наук

Официальные оппоненты: **Пашкина Юлия Викторовна** доктор ветеринарных наук, профессор, заведующая кафедрой «Эпизоотология, паразитология и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»

Капустин Андрей Владимирович доктор биологических наук, доцент, заместитель директора ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»

Защита диссертации состоится 27 апреля 2021 г. в 12 часов на заседании диссертационного совета Д 220.015.01 при ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» по адресу: 600901, г. Владимир, мкр. Юрьевец, ФГБУ «ВНИИЗЖ»

Тел: (4922) 529962

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г.Владимир). Полный текст диссертации, автореферата и отзыв научного руководителя размещены на официальном сайте ФГБУ «ВНИИЗЖ» www.arriah.ru

Автореферат разослан _____ 2021г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Жбанова Татьяна Валентиновна

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Бактериальные болезни птиц на промышленных предприятиях остаются одной из актуальных проблем ветеринарии. Среди респираторных заболеваний в последнее время широкое распространение получил инфекционный ринит кур [2, 4].

Инфекционный ринит (гемофилез, инфекционная кориза) – контагиозное энзоотическое заболевание кур, характеризующееся воспалением слизистых оболочек верхних отделов респираторного тракта, конъюнктивы и отеками в подкожной клетчатке лицевой части головы. Возбудителем болезни является бактерия - *Avibacterium paragallinarum*, ранее известная как *Haemophilus paragallinarum*, семейства *Pasteurellaceae*. Заболевание встречается во всех странах мира с развитым птицеводством, в том числе и в Российской Федерации. Экономический ущерб от заболевания складывается из потери яйценоскости кур до 40%, увеличения выбраковки цыплят, а также затрат, связанных с проведением профилактических и оздоровительных мероприятий [2, 4, 5].

При неосложненной форме инфекционного ринита заболеваемость птиц может достигать 100%, в тоже время летальность не превышать 1%. Инкубационный период заболевания при этом составляет от 1 до 3 суток, а симптомы обычно наблюдаются в течение 5-7 дней [2, 4].

В ассоциации с другими инфекционными агентами, такими как *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum*, вирусами ринотрахеита и инфекционного бронхита продолжительность заболевания может составлять 2-3 недели, при этом падеж птицы может достигать 30% [2, 5].

Естественное переболевание птиц, как правило, сопровождается выработкой иммунитета относительной напряженности, без образования гуморальных антител, на фоне чего возможны рецидивы болезни. При этом переболевшая птица на длительное время остается бактерионосителем, что способствует сохранению и распространению возбудителя в популяции.

Большое количество сообщений о вспышках инфекционного ринита в разных странах мира актуализирует проблему данного заболевания. Ареал распространения гемофилеза кур расширяется, особенно в странах с развивающимся птицеводством, что приводит к массовым экономическим потерям [2, 7].

Основным звеном в системе мер борьбы с инфекционным ринитом кур является специфическая профилактика. Вакцинация птиц обеспечивает выработку напряженного иммунитета, обусловленного наличием антигемагглютинирующих антител. Вакцинация позволяет существенно сократить использование антибактериальных препаратов, что в свою очередь предотвращает возникновение проблем, связанных с появлением резистентности у микроорганизмов и остаточными количествами антибиотиков в продукции птицеводства [2, 4].

Несмотря на значительный прогресс в области лабораторной диагностики инфекционного ринита кур и разработки средств специфической профилактики, ситуация с заболеванием особенно в развивающихся странах остается достаточно сложной. В настоящее время в Российской Федерации для борьбы с заболеванием применяются вакцины зарубежного производства, что создает зависимость страны от импортных препаратов [2, 4]. Единственная зарегистрированная отечественная трехвалентная вакцина против инфекционного ринита кур не имеет широкого распространения на рынке из-за высокой реактогенности. При этом многие аспекты, касающиеся производства безопасных и эффективных бактериальных вакцин для птиц, в России до конца не выяснены, поэтому проведение работ по получению качественных антигенов *A. paragallinarum* для инактивированных вакцин является актуальной задачей, имеющей большое научное и практическое значение.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы является разработка технологии получения антигенов *A. paragallinarum* для изготовления инактивированных вакцин.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- изучить биологические свойства контрольно-производственных штаммов и изолятов бактерий *A. paragallinarum* серогрупп А, В и С;
- подобрать питательную среду и оптимальное количество ростостимулирующих компонентов для культивирования бактерий *A. paragallinarum*;
- определить оптимальные параметры культивирования бактерий *A. paragallinarum* обеспечивающие максимальное накопление возбудителя в питательной среде;
- изучить кинетику инактивации бактерий *A. paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом;
- определить активность антигенов *A. paragallinarum* в процессе хранения;

- изучить антигенные и иммуногенные свойства опытного образца эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур;
- определить основные иммунобиологические свойства экспериментальной серии вакцины против инфекционного ринита кур.

Научная новизна исследований.

Научная новизна работы состоит в том, что в результате проведенных исследований:

- подобрана и обоснована рецептура питательной среды для глубинного культивирования штаммов возбудителя инфекционного ринита кур;
- определены основные физико-химические параметры глубинного культивирования штаммов *A. paragallinarum* в лабораторном ферментере Biotron LiFlus GX;
- обоснованы концентрации инактиваторов и разработаны режимы инактивации штаммов *A. paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом;
- определена активность антигенов *A. paragallinarum* в процессе хранения;
- изучены антигенные и иммуногенные свойства опытного образца эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур.

Практическая значимость.

Материалы исследований использованы при оформлении проекта нормативных документов по изготовлению и контролю «Вакцины против инфекционного ринита кур инаktivированной эмульсионной».

Кроме того, разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ»:

- «Методические рекомендации по определению уровня антител к *Avibacterium paragallinarum* в реакции торможения гемагглютинации»;
- «Методические рекомендации по глубинному культивированию бактерий *Avibacterium paragallinarum*»;
- «Методические рекомендации по инаktivации бактерий *Avibacterium paragallinarum* формалином».

Методические рекомендации используются при производстве вакцины против инфекционного ринита кур инаktivированной эмульсионной.

На основании изучения биологических свойств изоляты *A.paragallinarum* были депонированы и переданы в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», как штаммы *A.paragallinarum* №6261 (серогруппа А) и 1919 (серогруппа С).

Основные положения, выносимые на защиту:

- биологические свойства штаммов и изолятов *A. paragallinarum* серогрупп А, В и С;
- питательная среда для культивирования бактерий *A. paragallinarum*;
- кинетика инактивации бактерий *A. paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом;
- активность антигенов *A. paragallinarum* в процессе хранения;
- антигенные и иммуногенные свойства опытного образца эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур;
- основные иммунобиологические свойства экспериментальной серии вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной.

Апробация работы. Материалы исследований были доложены и обсуждены на заседаниях комиссии ФГБУ «ВНИИЗЖ» по заслушиванию выполнения индивидуальных планов аспирантов в период 2017-2020 гг. Материалы работы доложены на V Международной научно-практической конференции «Достижения молодых ученых в ветеринарной практике», 05-06 декабря 2019 г., ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир.

Публикации научных исследований. По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, в том числе 3 – в рецензируемых журналах.

Личный вклад соискателя. Соискатель самостоятельно осуществлял планирование всех экспериментов по теме работы и принимал непосредственное участие в их проведении.

Исследования по диссертационной работе выполнены в 2017-2020 гг. в соответствии с календарными планами НИР в ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных».

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах компьютерного текста и содержит разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты собственных исследований, заключение, список общепринятых сокращений, список литературы и приложения. Список литературы включает 184 источника, в том числе 136 зарубежных. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 13 таблицами. В приложении представлены копии титульных листов

документов, подтверждающих результаты отдельных этапов работы, их научную новизну и практическую значимость.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы

2.1.1 Штаммы и изоляты микроорганизмов

В экспериментальной работе использовали референтный штамм *Avibacterium paragallinarum* №29545, полученный из АТСС, а также штаммы №5111, №1116, №1818 (серогруппа В) депонированные в коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ», и изоляты №6261 (серогруппа А) и №1919 (серогруппа С), выделенные от птиц на территории Российской Федерации.

2.1.2 Животные

В экспериментальной работе использовали кур кросса «Хайсекс Коричневый» в возрасте 6-10 недель для изучения патогенных свойств изолятов *A. paragallinarum*, а также для оценки безвредности, антигенных и иммуногенных свойств инактивированной вакцины.

2.1.3 Питательные среды

Для культивирования бактерий использовали следующие питательные среды: бульон на основе триптического гидролизата мяса по Хоттингеру (ТГХ), производства ФГБУ «ВНИИЗЖ»; бульон на основе панкреатического гидролизата казеина (ПГК) «Vacto Tryptone» фирмы «BD BBL»; соево-казеиновый бульон (СКБ) на основе энзиматического гидролизата казеина и сои фирмы «Sigma»; бульон на основе триптического гидролизата казеина (ТГК) «Tryptone-D» фирмы «Himedia»; бульон и агар для культивирования плевропневмония подобных микроорганизмов «PPLO broth» и «PPLO agar» фирмы «BD BBL». Для приготовления плотных питательных сред использовали бакто-агар фирмы «BD BBL». Перед использованием в питательные среды добавляли V-фактор - раствор никотинамидадениндинуклеотид фосфата (НАДФ) х/ч («ROTH») и сыворотку крови лошади.

2.2 Методы

2.2.1 Изучение биологических свойств возбудителя

Ростовые и морфологические свойства изолятов бактерий *A. paragallinarum* изучали путем выращивания на различных плотных и жидких питательных средах с добавлением и без добавления факторов, стимулирующих рост.

Биохимические свойства определяли с помощью коммерческой тест-системы API NH в соответствии с инструкцией по применению.

Серогрупповую и серотиповую принадлежность бактерий *A. paragallinarum* определяли в РА и РТГА традиционными методами, используя антикरोличьи гипериммунные сыворотки.

Вирулентность штаммов *A. paragallinarum* определяли по методике, предложенной Soriano V.E. et al. [7].

2.2.2 Культивирование бактерий

Культивирование штаммов *A. paragallinarum* осуществляли методами поверхностного и периодического глубинного культивирования [1].

Отработку режимов периодического глубинного культивирования штаммов *A. paragallinarum* проводили в лабораторном ферментере «Biotron LiFlus GX». В процессе культивирования определяли концентрацию микробных клеток и гемагглютинирующую активность бактерий.

Рассчитывали показатели удельной скорости роста микроорганизмов (μ , ч⁻¹) и времени удвоения концентрации микробных клеток (td, ч).

2.2.3 Инактивация микроорганизмов

Инактивацию бактерий *A. paragallinarum* проводили 36%-ным водным раствором формальдегида (формалином) и тиомерсалом, содержащим 46% ртути.

Для характеристики кинетических закономерностей гибели микроорганизмов производили расчет постоянной (константы) скорости инактивации (k) [3].

С учетом показателя k производили расчет времени инактивации микробной суспензии (t) до определенного уровня остаточной вирулентности материала.

Полноту инактивации бактериальных суспензий проверяли высевом на плотные питательные среды [3].

2.2.4 Определение концентрации микробных клеток

Общую концентрацию микробных клеток в жидкой питательной среде определяли с помощью спектрофотометра «Spectronic Genesis 5» при длине волны 620 нм. Общую концентрацию микробных клеток в смыве агаровой культуры, приготовленном на фосфатно-солевом буферном растворе, определяли визуально по стандарту (эталону) мутности.

Концентрацию живых микробных клеток в суспензии определяли методом титрования на плотной питательной среде и выражали в колониеобразующих единицах (КОЕ) [3].

2.2.5 Изготовление вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной

Для изготовления эмульсионной вакцины использовали антигены штаммов *A. paragallinarum* №6261 (серогруппа А), №5111 (серогруппа В) и №1919 (серогруппа С). Суспензии антигенов смешивали с масляным адьювантом Montanide ISA 70 VG «SEPPIC» в соотношении 30:70 по весу и эмульгировали с помощью смесителя Silverson L4RT.

2.2.6 Определение безвредности вакцины

Безвредность вакцины оценивали по клиническому состоянию птиц и наличию тканевых изменений в местах введения двукратной (1.0 см³) дозы вакцины. Наблюдение за клиническим состоянием птиц и наружный осмотр мест введения препарата осуществляли ежедневно в течение 42 суток.

Результаты наружного осмотра оценивали по проявлению припухлости в месте введения вакцины. Послеубойную оценку степени поражения тканей при внутримышечном введении проводили по критериям, предложенным Stone H.D. et al. [6].

2.2.7 Изучение антигенных свойств вакцины

Антигенные свойства вакцины оценивали по уровню антител в сыворотках крови птиц в РТГА, в соответствии с «Методическим рекомендациям по оценке уровня поствакцинальных антител к *Avibacterium paragallinarum* методом РТГА».

2.2.8 Определение иммуногенных свойств вакцины

Иммуногенные свойства вакцины определяли методом контрольного заражения птиц гомологичными и гетерологичными штаммами *A. paragallinarum*.

Для определения ИмД₅₀ птиц иммунизировали однократно, подкожно, в среднюю треть шеи с дорсальной стороны вакцинами, содержащими по 9.47 Ig м.к. каждого штамма *A. paragallinarum* и трехкратными последовательными разведениями в плацебо: 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 и 1:243 в объеме 0.5 см³. Через 21 сутки после вакцинации всех птиц подвергали контрольному заражению гомологичными и гетерологичными штаммами *A. paragallinarum*.

2.2.9 Статистическая обработка результатов. Использовали общепринятые методы статистической обработки полученных данных. Определяли статистическую ошибку средних арифметических величин и критерий их достоверности, стандартное отклонение, достоверность различий между сопоставимыми количественными показателями. Значимость всех полученных величин была не ниже первого критериального порога ($p < 0.05$). Для определения показателей, характеризующих зависимость между дозой антигена в составе вакцины и обусловленным им эффектом, применяли корреляционно-регрессионный анализ. Определение коэффициента корреляции (R) вычисляли методом Брауэ-Пирсона.

При анализе и обработке результатов исследований использовали компьютерную программу «Statistica for Windows» (StatSoft Russia, 1999 г.).

2.3 Результаты собственных исследований

2.3.1 Ростовые, морфологические и биохимические свойства бактерий *A. paragallinarum*.

Через 24 часа культивирования при температуре 37°C на агаровых питательных средах бактерии *A. paragallinarum* формировали полупрозрачные колонии диаметром от 0.5 до 1.0 мм. Колонии S-формы имели округлую форму, гладкую, блестящую поверхность, ровные края, слизистую консистенцию и флуоресцировали в косопроходящем свете. На жидкой питательной среде рост культур характеризовался равномерным ее помутнением без образования осадка.

При микроскопии мазков, приготовленных из агаровых и бульонных культур, окрашенных по Граму, бактерии представляли собой грамтрицательные полиморфные палочки и овоиды, расположенные одиночно или парами. При окраске фиксированных мазков по методу Бурри-Гинса у бактерий выявляли капсулу в виде светлого ободка вокруг темно-красных клеток.

Исследуемые штамм и изоляты *A. paragallinarum* нуждались в наличии V-фактора роста и сыворотки крови. Рост агаровых и бульонных культур исследуемых бактерий наблюдали исключительно в условиях повышенной концентрации двуокиси углерода (5-10%) в атмосфере. Характерными свойствами являлось наличие у бактерий щелочной фосфатазы и отсутствие продукции индола, липазы, уреазы, каталазы, оксидазы, орнитин декарбоксилазы и β-галактозидазы. Оба изолята ферментировали

глюкозу и сахарозу, в отношении маннита и маннозы наблюдали вариабельность признака.

2.3.2 Вирулентность возбудителя инфекционного ринита для кур

Концентрация бактериальных клеток в исходных суспензиях штамма и изолятов *A. paragallinarum* составляла $(1.5 \pm 0.3) \times 10^9$ м.к./см³ по оптическому стандарту мутности.

Оба изолята возбудителя инфекционного ринита были патогенны для цыплят при интраназальном заражении. При этом концентрация жизнеспособных клеток в заражающих дозах варьировала от $(4.85 \pm 0.27) \times 10^8$ КОЕ до $(5.07 \pm 0.32) \times 10^8$ КОЕ, однако разница была статистически недостоверной ($p > 0.05$). Результаты определения вирулентности возбудителя представлены в таблице 1.

Таблица 1-Вирулентность бактерий *A. paragallinarum*

№ штамма/ изолята	Время после заражения (сут)					Среднее значение (M±m)
	1	2	3	4	5	
	Суммы баллов по группам					
5111	1.8	2.6	3.2	2.8	1.8	2.44±0.5
6261	1.2	1.8	2.2	2.2	1.6	1.80±0.4
1919	1.4	2.2	2.8	2.6	1.8	2.16±0.5

Анализ результатов, представленных в таблице 1 показал, что у штамма и изолятов *A. paragallinarum* среднее значение сумм баллов составляло >1.0 , что свидетельствовало об их высокой вирулентности [7], однако статистически достоверной разницы между показателями не обнаружено ($p > 0.05$). Патолого-анатомические изменения у цыплят были сосредоточены преимущественно в верхних отделах респираторного тракта. У большинства птиц подкожная клетчатка в области лицевой части головы была отекая, студневидной консистенции. Носовые ходы и подглазничные пазухи были заполнены водянистым или густым экссудатом.

Таким образом, исследуемые штамм и изоляты возбудителя инфекционного ринита вызывали у цыплят при интраназальном заражении характерную клиническую и патолого-анатомическую картину заболевания.

2.3.3 Гемагглютинирующая активность бактерий *A. paragallinarum*

Для определения природы и свойств гемагглютининов бактерии подвергали воздействию различных биологических и физико-химических факторов.

Исследуемый штамм и изоляты *A. paragallinarum* имели различную гемагглютинирующую активность.

Нативный антиген изолята №6261 серогруппы А обладал слабой гемагглютинирующей активностью в отношении обработанных глутаровым альдегидом эритроцитов. После обработки антигена гиалуронидазой, титр гемагглютинирующей активности стал выше в 64 раза ($p < 0,05$).

После обработки антигена штамма №5111 серогруппы В гиалуронидазой, титр в РГА не изменился ($p > 0,05$), что свидетельствовало об отсутствии гиалуроновой кислоты в составе капсульной субстанции штамма.

В результате исследований обнаружено, что нативный антиген изолята №1919, не агглютинировал эритроциты петуха. Однако, после его обработки раствором тиоционата калия и ультразвуком титр в РГА составил 1:128 ($p < 0,05$).

2.3.4 Антигенные свойства бактерий *A. paragallinarum*

Серогрупповую принадлежность изолятов *A. paragallinarum* определяли в РА и РТГА с использованием гипериммунных сывороток крови кроликов и цельноклеточных антигенов бактерий. Тесты РА ставили на стекле, а РТГА - в полистироловых планшетах по традиционным методикам.

При определении серогрупповой принадлежности изолятов *A. paragallinarum* в РА и РТГА, было установлено, что изоляты №6261 и №1919 соответствуют серогруппам А и С, штамм №5111 относится к серогруппе В.

2.3.5 Разработка технологии получения бактериальной массы *A. paragallinarum*.

Проводили культивирования бактерий *A. paragallinarum* в шейкере-инкубаторе в конических колбах с перемешиванием суспензии при 180 об/мин и температуре 37.0 °С, в течение 12 часов. Концентрацию живых микробных клеток в пробах определяли каждые 2 часа методом титрования на плотной питательной среде, предназначенной для выращивания гемофильных бактерий.

2.3.6 Ростовые свойства питательных сред для культивирования бактерий *A. paragallinarum*.

Во все образцы питательных сред добавляли по 25 мкг/см³ НАДФ и по 10% сыворотки крови лошади. Результаты определения динамики роста штамма *A. paragallinarum* №5111 на различных питательных средах представлены на рис.1.

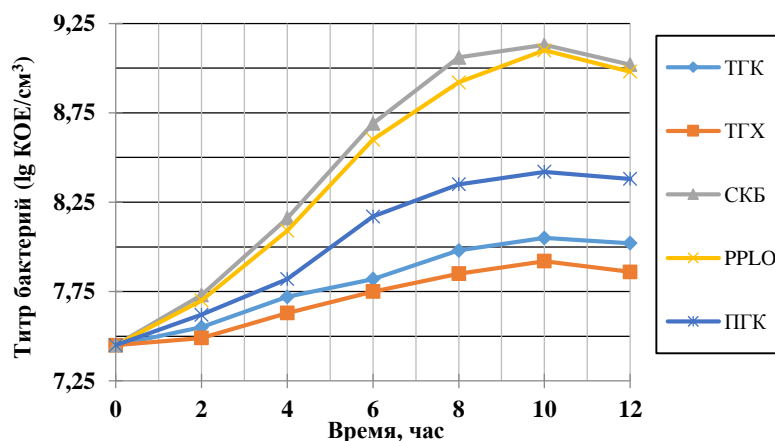


Рис. 1 Динамика роста штамма *A. paragallinarum* №5111 на различных питательных средах

Наибольшее накопление бактерий *A. paragallinarum* наблюдали на питательных средах СКБ и PPLO через 10 часов культивирования. Максимальный титр бактерий на среде СКБ составил 9.13 ± 0.06 lg КОЕ/см³, а на среде PPLO – 9.10 ± 0.04 lg КОЕ/см³ ($p > 0.05$). Показатели удельной скорости роста штамма в период экспоненциальной фазы, которая продолжалась в течение 6 часов, составили 0.509 ± 0.032 ч⁻¹ и 0.467 ± 0.028 ч⁻¹, а среднее время удвоения клеток – 1.36 ± 0.09 ч и 1.48 ± 0.10 ч, соответственно ($p < 0.05$).

Минимальную удельную скорость роста 0.138 ± 0.04 ч⁻¹ и накопление микробных клеток 7.92 ± 0.06 lg КОЕ/см³ за аналогичный период времени наблюдали на среде ТГХ. При этом среднее время удвоения бактерий составило 5.02 ± 0.15 ч.

2.3.7 Определение оптимальной концентрации НАДФ в питательной среде для культивирования бактерий *A. paragallinarum*.

Изучали динамику роста штамма №5111 в питательной среде СКБ, содержащей НАДФ в концентрации от 1.56 мкг/см³ до 25.00 мкг/см³. Во все образцы питательной среды добавляли по 10% сыворотки крови лошади. Контролем являлась питательная среда без добавления V-фактора роста.

В результате проведенных исследований было установлено, что фаза логарифмического роста бактерий в питательной среде, содержащей 25.0 мкг/см³, 12.5 мкг/см³ и 6.75 мкг/см³ НАДФ, продолжалась в течение 6 часов. При этом удельная скорость роста бактерий со второго по восьмой час культивирования составляла 0.521 ± 0.08 ч⁻¹, 0.502 ± 0.11 ч⁻¹ и 0.502 ± 0.10 ч⁻¹, а время удвоения биомассы было 1.33 ± 0.06 ч, 1.38 ± 0.08 ч и 1.38 ± 0.08 ч соответственно. Максимальное накопление

бактерий при данных концентрациях V-фактора роста в питательной среде наблюдали через 10 часов культивирования, при этом урожай бактерий составил $9.14 \pm 0.11 \text{ lg KOE/cm}^3$, $9.07 \pm 0.08 \text{ lg KOE/cm}^3$ и $9.02 \pm 0.10 \text{ lg KOE/cm}^3$ соответственно ($p > 0.05$).

В питательной среде, не содержащей НАДФ, рост бактерий не наблюдали, при этом в процессе выращивания общее количество жизнеспособных бактерий постепенно снижалось. Через 4 часа культивирования этот показатель составил $>7.25 \text{ lg KOE/cm}^3$.

2.3.8 Определение оптимального количества сыворотки крови лошади в питательной среде для культивирования *A. paragallinarum*

Сыворотку крови добавляли в питательную среду на основе СКБ в количестве 1, 5 и 10%. Контролем являлся образец без добавления данного компонента.

При анализе полученных данных было установлено, что в питательной среде, содержащей 5% и 10% сыворотки крови лошади, удельная скорость роста бактерий штамма № 5111 в период экспоненциальной фазы была максимальной и составляла $0.479 \pm 0.16 \text{ ч}^{-1}$ и $0.491 \pm 0.12 \text{ ч}^{-1}$, а время удвоения биомассы - $1.44 \pm 0.12 \text{ ч}$ и $1.41 \pm 0.10 \text{ ч}$ соответственно. Максимальное накопление бактерий наблюдали через 10 часов культивирования, при этом урожай бактерий составил $9.07 \pm 0.12 \text{ lg KOE/cm}^3$ и $9.12 \pm 0.09 \text{ lg KOE/cm}^3$ соответственно ($p > 0.05$).

Питательная среда без сыворотки крови, рост бактерий не стимулировала, при этом в процессе выращивания общее количество жизнеспособных клеток постепенно снижалось. Через 8 часов культивирования титр бактерий составил $>7.25 \text{ lg KOE/cm}^3$.

2.3.9 Определение режима глубинного культивирования штаммов *A. paragallinarum*.

Проводили культивирования штамма *A. paragallinarum* №5111 в лабораторном ферментере с измерением основных физико-химических параметров суспензии каждые 60 мин в течение 12 часов. Температура культуры в процессе выращивания была постоянной и составляла 37.0°C . Для обеспечения гомогенности питательной среды в процессе культивирования проводили ступенчатое увеличение скорости перемешивания в диапазоне от 150 до 500 об/мин. В качестве расплодного материала использовали 12-часовую бульонную культуру штамма, полученную в шейкере-инкубаторе, которую вносили в ферментер в объеме 5%. При этом концентрация бактерий в начале процесса культивирования составляла $7.75 \pm 0.25 \text{ lg KOE/cm}^3$.

2.3.10 Определение оптимального режима аэрации при культивировании бактерий *A. paragallinarum*. Культивирование проводили без принудительной подачи и с подачей в ферментер по 1.0 л/мин воздуха, а также смеси воздуха с углекислым газом в соотношении 95:5. Основные параметры роста штамма *A. paragallinarum* №5111 при различных режимах аэрации представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Основные параметры роста штамма *A. paragallinarum* №5111 при различных режимах аэрации

n=3

Параметры роста (M±m)	Режим аэрации		
	С подачей воздуха	Без подачи воздуха	С подачей смеси воздуха и углекислого газа (95:5)
μ , ч ⁻¹	0.32±0.03	0.47±0.07	0.51±0.05
td, ч	2.16±0.18	1.47±0.26	1.36±0.14
X, lg КОЕ/см ³	8.52±0.05	9.18±0.04	9.44±0.04

Примечание: μ – удельная скорость роста микроорганизмов;
td – время удвоения концентрации микробных клеток;
X – концентрация микробных клеток.

Максимальный титр накопления бактерий в ферментере наблюдали через 10 часов культивирования в режиме принудительной подачи смеси воздуха и углекислого газа. Данный показатель был в 8.3 раза выше, чем аналогичный при культивировании штамма в режиме подачи воздуха ($p < 0.05$). Промежуточные значения параметров роста наблюдали при выращивании бактерий без принудительной подачи воздуха в аппарат.

2.3.11 Изучение динамики показателей pH и eH (окислительно-восстановительного потенциала) суспензии *A. paragallinarum* в процессе глубинного культивирования

В ходе проведенных исследований было отмечено, что разница установленных значений pH и eH всех образцов исходной питательной среды существенно не влияла на параметры роста штамма *A. paragallinarum* ($p > 0.05$). Максимальное накопление биомассы бактерий наблюдали через 10 часов культивирования в среде с pH 7.90±0.06 ед и eH 40±3 мВ.

2.3.12 Изучение динамики роста штаммов *A. paragallinarum* и определение продолжительности культивирования

Продолжительность фаз роста у различных штаммов *A. paragallinarum* при одинаковых условиях культивирования существенно не отличалась. Периоды лаг-фазы и фазы ускорения роста культур составляли в среднем по 1 ч, экспоненциальная фаза

длилась в течение 6 ч, а фаза замедления роста – 2 ч. Однако, концентрация бактерий штамма №6261 в процессе выращивания культур, значительно уступала таковой других штаммов. При этом максимальная удельная скорость роста штаммов №6261, №5111 и №1919 составляла $0.44 \pm 0.05 \text{ ч}^{-1}$, $0.53 \pm 0.03 \text{ ч}^{-1}$, $0.52 \pm 0.04 \text{ ч}^{-1}$, а время удвоения концентрации микробных клеток - $1.57 \pm 0.16 \text{ ч}$, $1.30 \pm 0.08 \text{ ч}$ и $1.33 \pm 0.09 \text{ ч}$, соответственно. Выход культур на стационарную фазу наблюдали на 10-ом часу культивирования, что является оптимальным временем остановки процесса выращивания и сбора урожая.

2.3.13 Разработка технологии инаktivации бактерий *A. paragallinarum*

Эксперименты проводили на модели штамма №5111 *A. paragallinarum*. Для отработки режима инаktivации бактерий использовали водный раствор формальдегида – формалин и тиомерсал. В ходе эксперимента определяли выживаемость культуры бактерий при воздействии различных концентраций инаktivантов.

Для изучения процесса инаktivации в бульонные культуры штамма *A. paragallinarum* вносили формалин в количестве 0.05%, 0.10% и 0.20% по объему, а так же подвергали воздействию различных концентраций раствора тиомерсала – 0.02%, 0.04% и 0.08%.. Концентрацию живых микробных клеток определяли перед внесением инаktivанта (X_0) и после внесения, через каждые 60 мин (X_i).

Отработанный режим инаktivации *A. paragallinarum* с использованием 0.10% формалина при температуре 37°C и постоянном перемешивании со скоростью 50 об/мин, позволяет получать 7.0 дм³ бактериина с концентрацией $9.5 \pm 0.2 \text{ lg м.к./см}^3$ за $4.2 \pm 0.1 \text{ ч}$. В тоже время использование 0.04% тиомерсала в аналогичных условиях, позволяло получать бактериин за $5.6 \pm 0.1 \text{ ч}$.

2.3.13 Стабильность антигенных свойств бактерий *A. paragallinarum*, инаktivированных формальдегидом и тиомерсалом

Полученные антигены и приготовленные из них вакцины хранили при температуре (2-8)°C в течении 24 месяцев (срок наблюдения), определяя их активность с интервалом 6 мес.

Гемагглютинирующая активность антигенов штамма *A. paragallinarum* №5111, инаktivированных формальдегидом и тиомерсалом сразу после изготовления, а также через 6 мес хранения была на одном уровне и составляла $7.3 \pm 0.7 \text{ log}_2$ и $7.6 \pm 0.7 \text{ log}_2$,

соответственно. Однако, за период с 6 до 24 мес хранения наблюдали снижение титров активности обоих антигенов. При этом активность антигена, инактивированного формальдегидом через 24 мес хранения снизилась на $1.7 \log_2$ ($p>0.05$), а инактивированного тиомерсалом - на $3.3 \log_2$ ($p<0.05$).

Уровень антител в крови иммунизированных птиц зависел не только от количества введенного антигена, но и от инактиванта, с помощью которого он был приготовлен. Результаты определения антигенных свойств бактерий *A. paragallinarum*, инактивированных формальдегидом и тиомерсалом в составе эмульсионных вакцин в процессе хранения представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Антигенные свойства бактерий *A. paragallinarum*, инактивированных формальдегидом и тиомерсалом в составе эмульсионных вакцин в процессе хранения

n=3

№ образца	Концентрация антигена штамма №5111 в дозе, lg м.к.	Время хранения вакцины, мес				
		0	6	12	18	24
		Титры антител, \log_2 (M±m)				
1	9.47	4.4±0.5	4.6±0.5	4.6±0.5	4.4±0.5	3.8±0.4
	9.00	3.6±0.5	3.4±0.5	3.2±0.4	3.0	2.4±0.5
	8.47	2.8±0.4	2.6±0.5	2.2±0.4	1.6±0.5	1.2±0.7
2	9.47	4.6±0.5	4.4±0.5	3.0	2.4±0.5	1.0±0.6
	9.00	3.4±0.5	3.6±0.5	2.4±0.5	2.2±0.4	0.4±0.5
	8.47	3.0	2.8±0.4	1.4±0.5	0.4±0.5	0.2±0.4
3	плацебо	0	0	0	0	0

Примечание: Образец №1 - вакцина, содержащая антиген, инактивированный формальдегидом; №2 - вакцина, содержащая антиген, инактивированный тиомерсалом; №3 – плацебо.

Активность антигена, инактивированного формальдегидом в процессе хранения снизилась на $0.6-1.7 \log_2$ ($p>0.05$), а инактивированного тиомерсалом - на $2.8-3.6 \log_2$ ($p<0.05$).

Таким образом, использование формолантигена *A. paragallinarum* для изготовления вакцины позволяет получить препарат со стабильными антигенными свойствами при хранении в течение 24 мес.

2.3.14 Изготовление опытного образца эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур

Использовали формолантигены штаммов *A. paragallinarum* №6261 серогруппы А, №5111 серогруппы В и №1919 серогруппы С. При этом общая концентрация антигенов

в дозе 0.5 см^3 составляла 9.95 lg м. к. при равном доленом содержании по 9.47 lg м. к. каждого, по оптическому стандарту мутности.

2.3.15 Иммуногенные свойства

С целью определения количественных характеристик зависимости между дозой каждого антигена в составе эмульсионной вакцины и защитным эффектом при заражении гомологичными штаммами использовали регрессионный анализ. Для этого птиц иммунизировали однократно, подкожно, в среднюю треть шеи с дорсальной стороны исходными препаратами и трехкратными последовательными разведениями в плацебо: 1:3, 1:9, 1:27, 1:81 и 1:243 в объеме 0.5 см^3 .

Соотношение между линейными эквивалентами долей защищенных птиц (Y) и количеством антигенов *A.paragallinarum* в дозе (X), а также регрессионные модели, характеризующие их связь, представлены на рис. 2.

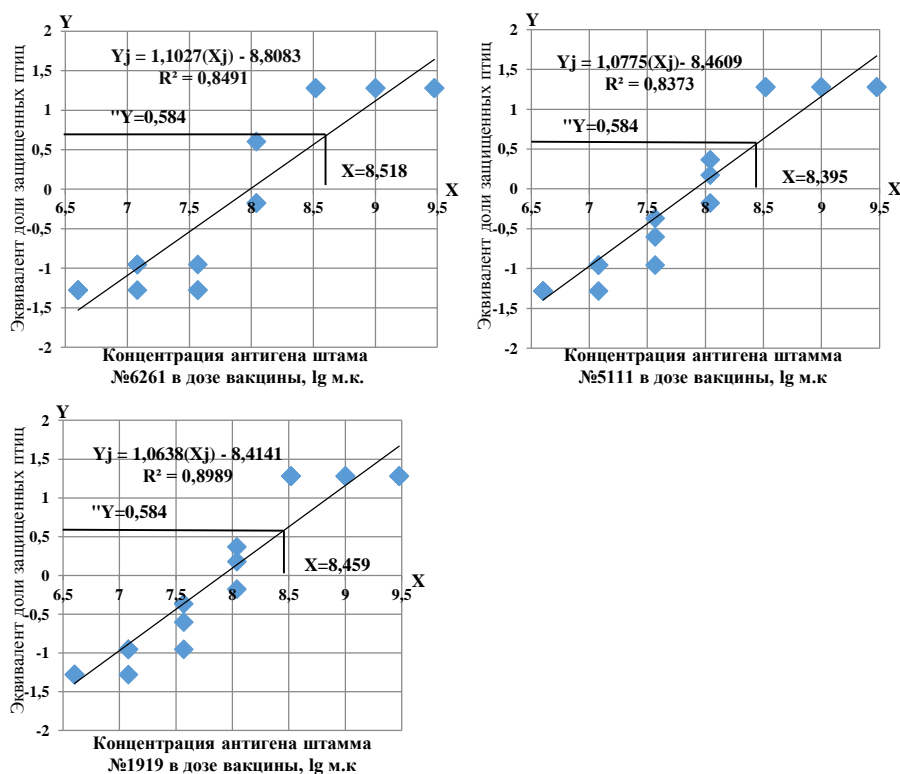


Рис. 2 Доля защищенных птиц (Y) в зависимости от концентрации антигенов *A. paragallinarum* штаммов №6261, №5111 и №1919 (X) в дозе эмульсионной вакцины.

Величина 80% доли защищенных птиц от экспериментального заражения птиц гомологичными штаммами возбудителя ожидается при концентрации антигена серогруппы А в дозе $8.52 \pm 0.11 \text{ lg м.к.}$, серогруппы В - $8.39 \pm 0.11 \text{ lg м.к.}$ и серогруппы С - $8.46 \pm 0.08 \text{ lg м.к.}$ ИмД₅₀ составила $7.99 \pm 0.10 \text{ lg м.к.}$ штамма №6261, $7.69 \pm 0.11 \text{ lg м.к.}$ штамма №5111 и $7.89 \pm 0.08 \text{ lg м.к.}$ штамма №1919.

При этом в одной протективной дозе эмульсионной вакцины (8.51 lg м.к.) содержалось 3.30 ИмД₅₀ антигена штамма №6261, 6.60 ИмД₅₀ антигена штамма №5111 и 4.23 ИмД₅₀ антигена штамма №1919.

При сравнении иммуногенной активности образца вакцины по антигену серогруппы В было установлено, что величина ИмД₅₀ при заражении гетерологичными штаммами №1116 и №1818 составляла в 4 и 3.3 раза выше, чем при заражении гомологичным штаммом, соответственно.

2.3.16 Антигенные свойства

За сутки до контрольного заражения гомологичными штаммами у всех птиц отобрали сыворотки крови для тестирования в серологической реакции.

Уровни специфических антител в РТГА находились в прямой зависимости от количества антигенов *A. paragallinarum* серогрупп А, В и С в вакцине.

Полученные результаты были обработаны методом регрессионного анализа и представлены графически на рис. 3.

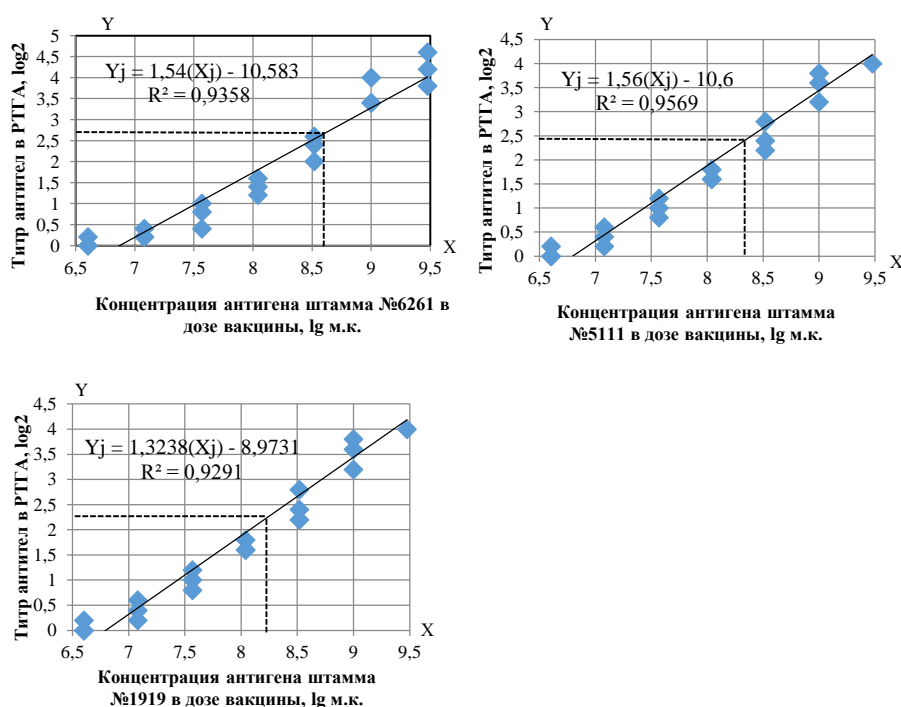


Рис. 3 Титры антител в РТГА (Y) соответственно величинам концентрации антигенов *A. paragallinarum* штаммов №6261, №5111 и №1919 (X) в дозе эмульсионной вакцины.

При концентрации антигена $8,52 \pm 0,11$ lg м.к. серогруппы А в дозе, обеспечивающей защиту 80% птиц против гомологичного заражения, ожидаемая величина титра специфических антител в сыворотке крови должна составлять

$2.54 \pm 0.11 \log_2$. В тоже время защите 50% кур в опыте соответствовал средний титр антител $1.72 \pm 0.10 \log_2$.

При концентрации антигена $8.39 \pm 0.11 \text{ Ig м.к.}$ серогруппы В в дозе, обеспечивающей защиту 80% птиц против гомологичного заражения, ожидаемая величина титра специфических антител в сыворотке крови должна составлять $2.49 \pm 0.11 \log_2$. При этом защите 50% кур соответствовал средний титр антител $1.39 \pm 0.11 \log_2$.

При концентрации антигена $8.46 \pm 0.08 \text{ Ig м.к.}$ серогруппы С в дозе, обеспечивающей защиту 80% птиц против гомологичного заражения, средний титр специфических антител в сыворотке крови составил $2.23 \pm 0.08 \log_2$. Защите 50% кур при этом соответствовал средний титр антител $1.47 \pm 0.08 \log_2$.

2.3.17 Изготовление экспериментальной серии эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур и изучение ее иммунобиологических свойств

При изготовлении экспериментальной серии эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур рассчитывали количество антигенов *A. paragallinarum* в одной протективной дозе с учетом значений ИмД_{50} после заражения птиц гомологичными и гетерологичными штаммами. Таким образом, в одной прививной дозе препарата концентрация антигена серогруппы В составляла 9.00 Ig м.к. , а антигенов серогрупп А и С - по 8.54 Ig м.к. , соответственно.

2.3.17.1 Безвредность эмульсионной вакцины

Препарат вводили птицам подкожно с дорсальной стороны шеи и внутримышечно в область груди в объеме 1.0 см^3 (двукратная доза). В течение 42 суток наблюдения проводили ежедневный клинический осмотр иммунизированных птиц, после чего осуществляли убой и оценку степени поражения тканей.

На основании результатов клинического осмотра было установлено, что отклонений в состоянии здоровья у иммунизированных птиц не наблюдали. Случаев падежа или выраженного угнетения отмечено не было. У 4 птиц через сутки после внутримышечного введения вакцины на месте инъекции наблюдали возникновение небольшой припухлости, которая исчезала через 3-5 суток.

При вскрытии на месте внутримышечного введения препарата у 6 птиц наблюдали среднюю степень поражения, проявляющуюся побледнением окружающих тканей, а также отмечалось присутствие не рассосавшейся эмульсии. У 4 цыплят

наблюдали тяжелые поражения в виде наличия в тканях выраженных олеогранулем. При этом наличие некрозов окружающих тканей или признаков воспаления в мышцах не обнаруживали.

На месте подкожного введения вакцины у всех птиц наблюдали образование олеогранулем без некротических поражений и без выраженной воспалительной реакции окружающих тканей.

2.3.17.2 Антигенные и иммуногенные свойства вакцины

Для проведения исследований иммунизировали цыплят экспериментальной вакциной подкожно с дорсальной стороны шеи по 0.5 см³. Аналогичное количество птиц контрольных подгрупп не вакцинировали. Спустя 20 суток после вакцинации у всех птиц отбирали кровь для исследования сывороток в РТГА. Результаты определения антигенной активности вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Антигенная активность вакцины против инфекционного ринита кур

№ п/п	Антиген штамма (серогруппа)	Количество антигена в дозе (lg м.к.)	Уровни специфических антител в РТГА, log ₂ (M±m)	
			Теоретический	Фактический
1	6261 (А)	8.54	2.57±0.6	2.68±0.4
2	5111 (В)	9.00	3.44±0.5	3.82±0.6
3	1919 (С)	8.54	2.23±0.5	2.24±0.8
4	Контроль	-	-	0

Через 21 сутки после иммунизации каждую группу цыплят заражали интраназально 18-часовыми бульонными культурами гомологичных штаммов в дозе $(4.75±0,35)×10^8$ КОЕ в объеме 0.5 см³. Иммуногенную активность вакцины оценивали по количеству не заболевших птиц в опытных подгруппах, а также по сумме баллов характеризующих тяжесть клинических проявлений. Результаты определения иммуногенности экспериментальной серии вакцины против инфекционного ринита кур инактивированной эмульсионной представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Иммуногенность вакцины против инфекционного ринита кур

№ п/п	Контрольное заражение штаммом (серогруппа)	Группа	Критерии оценки иммуногенности вакцины			Тяжесть течения заболевания (сумма баллов по группе)	Эффективность вакцины, %
			Кол-во выживших птиц	Кол-во незаболевших птиц	Кол-во птиц, с отрицательным результатом выделения возбудителя		
1	№6261 (А)	Опыт	10	10	10	0	100
		Контроль	9	0	0	1.86±0.4	

Продолжение таблицы 5

2	№5111 (B)	Опыт	10	9	9	0.16±0.2	90
		Контроль	7	0	0	2.30±0.5	
3	№1116 (B)	Опыт	10	9	9	0.12±0.2	90
		Контроль	9	0	0	1.32±0.4	
4	№1818 (B)	Опыт	10	10	10	0	100
		Контроль	10	2	2	0.74±0.4	
5	№1919 (C)	Опыт	10	8	8	0.22±0.2	80
		Контроль	10	9	0	2.36±0.5	

Анализ результатов, представленных в таблице 5, показал, что эффективность вакцинации при заражении птиц гомологичными и гетерологичными штаммами составила от 80 до 100%. При этом спустя 1-2 суток после заражения у большинства птиц контрольной группы и через 3-4 суток у отдельных цыплят опытных групп отмечали развитие однотипных клинических признаков, проявляющихся ринитом, синуситом и конъюнктивитом. Впоследствии, у больных цыплят контрольной группы наблюдали обильные выделения из носовых отверстий непрозрачного вязкого экссудата.

У отдельных вакцинированных птиц симптомы заболевания проявлялись в виде водянистого истечения из носовых отверстий и незначительного одно- или двустороннего опухания носовых пазух. При этом средняя продолжительность заболевания вакцинированных птиц составляла 3-4 суток, а цыплят контрольной группы - 5-7 суток.

Таким образом, результаты лабораторных испытаний показали, что экспериментальная серия вакцины против инфекционного ринита кур безвредна и обладает высокой антигенной и иммуногенной активностью.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

3.1 Выводы:

1. Изучены ростовые, морфологические, биохимические, серологические и патогенные свойства контрольно-производственных штаммов *A. paragallinarum* №6261 (серогруппа А), №5111 (серогруппа В) и №1919 (серогруппа С);

2. Подобрана оптимальная питательная среда для культивирования бактерий *A. paragallinarum* глубинным способом, на основе соево-казеинового бульона с добавлением 6.75 мкг/см³ НАДФ и 5% сыворотки крови лошади;

3. Определен оптимальный режим глубинного культивирования бактерий *A. paragallinarum* в ферментере Biotron LiFlus GX с принудительной подачей в суспензию смеси воздуха и углекислого газа. При этом максимальное накопление микробных

клеток в питательной среде с рН 7.90 ± 0.06 ед и еН 40 ± 3 мВ составляло 9.60 ± 0.15 lg КОЕ/см³.

4. Изучена кинетика инактивации бактерий *A.paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом. Установлено, что концентрация формалина 0.1% и тиомерсала - 0,04%, обеспечивают гибель возбудителя при сохранении антигенных и иммуногенных свойств. Показано, что инаktivация 7,0 дм³ бактериальной суспензии при добавлении 0.1% формалина происходит за 4.2 ± 0.1 часа, а при добавлении 0,04% тиомерсала – за 5.6 ± 0.1 часа;

5. Активность формолантигена через 24 мес хранения в опытах *in vitro* снизилась на $1.7 \log_2$ ($p > 0.05$), а инаktivированного тиомерсалом - на $3.3 \log_2$ ($p < 0.05$). В опытах *in vivo* за аналогичный период времени активность формолантигена снизилась на $0.6-1.7 \log_2$ ($p > 0.05$), а инаktivированного тиомерсалом - на $2.8-3.6 \log_2$ ($p < 0.05$);

6. Изучены антигенные и иммуногенные свойства опытного образца эмульсионной вакцины против инфекционного ринита кур с различной концентрацией антигена. Построенные регрессионные модели, характеризующие связь показателей дозы антигена, протективной функции иммунитета и титров специфических антител, могут быть использованы для прогноза защищенности вакцинированного поголовья птиц;

7. Экспериментальная серия вакцины против инфекционного ринита кур инаktivированной эмульсионной была безвредна при подкожном введении, индуцировала образование антигемагглютинирующих антител в титрах от $2.24 \pm 0.8 \log_2$ до $3.82 \pm 0.6 \log_2$ и обладала высокой иммуногенной активностью для кур при заражении гомологичными и гетерологичными штаммами.

3.2 Практические предложения

Материалы исследований использованы при оформлении нормативных документов по изготовлению и контролю «Вакцины против инфекционного ринита кур инаktivированной эмульсионной», которые одобрены ученым советом ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Кроме того, разработаны, одобрены ученым советом и утверждены директором ФГБУ «ВНИИЗЖ»: «Методические рекомендации по определению уровня антител к *Avibacterium paragallinarum* в реакции торможения гемагглютинации»; «Методические рекомендации по глубинному культивированию бактерий *Avibacterium paragallinarum*»; «Методические рекомендации по инаktivации бактерий *Avibacterium paragallinarum* формалином».

Методические рекомендации используются при производстве вакцины против инфекционного ринита кур инаktivированной эмульсионной.

В коллекцию штаммов микроорганизмов ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» после детального изучения заложены штаммы *A.paragallinarum* №6261 (серогруппа А) и 1919 (серогруппа С). На штаммы оформлено СТО, получены справки о депонировании.

4 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Баснакьян. – М.: Медицина. – 1992. – 192 с.
2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц / под ред. Б.У. Кэлнека. – М.: Аквариум, 2011. – 1232 с.
3. Методы общей бактериологии: в 3 т. Т. 1 / ред. Ф. Герхард. – М.: Мир, 1983. – 536 с.
4. Charoenvisal, N. Efficacy of four commercial infectious coryza vaccines on prevention of *Avibacterium paragallinarum* serovar A, B, and C infection in Thailand / N. Charoenvisal, P. Chansiripornchai, N. Chansiripornchai // Pakistan Vet. J. – 2017. – Vol. 37. – P. 287-292.
5. Isolation, identification, serotyping of *Avibacterium paragallinarum* from quails in Indonesia with typical infectious coryza disease symptoms / A.E.T. Wahyuni, C.R. Tabbu, S. Artanto [et al.] // Vet. World. – 2018. – Vol. 11. – P. 519-524.
6. Stone, H.D. Newcastle disease oil-emulsion vaccines prepared with animal, vegetable and synthetic oils / H.D. Stone // Avian Diseases. – 1997. – Vol. 41. – P. 591-597.
7. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum* / V.E. Soriano, G.M. Longinos, R.P. Fernandez [et al.] // Avian Diseases. – 2004. – Vol. 48, N 4. – P. 886-889.

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum* / **М.С. Фирсова**, В.А. Евграфова, А.В. Потехин // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 2. – С. 12-16.
2. Особенности инактивации бактерий *Avibacterium paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом / **М.С. Фирсова**, В.А. Евграфова, А.В. Потехин // Ветеринария сегодня. – 2019. – № 3. – С. 63-67.
3. Оценка безвредности, антигенной и иммуногенной активности опытных образцов вакцин против инфекционного ринита кур, изготовленных с разными адьювантами / **М.С. Фирсова**, А.В. Потехин; В.А. Евграфова // Достижения молодых ученых - в вет. практику: материалы 5-й Междунар. науч. конф. - Владимир, 2019. - С. 48-56.
4. Иммуногенные свойства изолятов и штаммов *Avibacterium paragallinarum* серогруппы В / **М. С. Фирсова**, В. А. Евграфова, А. В. Потехин, Р. В. Яшин, О. В. Прунтова, В. С. Русалеев. – Ветеринария сегодня. – 2020. – № 3. – С. 205-212.