

УДК 619:579.843.94:614.48:615.371

DOI: 10.29326/2304-196X-2019-3-30-63-67

ОСОБЕННОСТИ ИНАКТИВАЦИИ БАКТЕРИЙ *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* ФОРМАЛЬДЕГИДОМ И ТИОМЕРСАЛОМ

М. С. Фирсова¹, В. А. Евграфова², А. В. Потехин³¹ Аспирант, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: firsova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1531-004X² Ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: evgrafova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3053-6976³ Заведующий сектором, кандидат ветеринарных наук, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия, e-mail: potehin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3529-4809

РЕЗЮМЕ

Представлены результаты по отработке режимов инактивации штамма *Avibacterium paragallinarum* формальдегидом и тиомерсалом. Гибель бактерий при воздействии 0,20 и 0,10% формалина идет с постоянной скоростью, то есть процессы инактивации микроорганизмов подчиняются экспоненциальной зависимости. Данное обстоятельство позволяет рассчитать показатель константы скорости инактивации, который составляет для 0,10% формалина $2,94 \pm 0,37 \text{ ч}^{-1}$, а для 0,20% – $5,86 \pm 0,72 \text{ ч}^{-1}$. Режим инактивации формалином в конечной концентрации 0,10% при температуре 37 °C и постоянном перемешивании (60 об/мин) позволяет получать 7,0 дм³ бактерины с концентрацией $9,5 \pm 0,2 \text{ лг м.к./см}^3$ за 4,3 ± 0,1 ч. Тиомерсал обладает бактерицидным действием на клетки *Avibacterium paragallinarum* в концентрации 0,04% (1:2500) и выше. При этом процесс инактивации характеризуется линейностью, а константа скорости инактивации составляет $7,92 \pm 1,12 \text{ ч}^{-1}$. При действии тиомерсала в сублетальной концентрации 0,02% (1:5000) кривая выживания имеет сложную форму. При этом процесс гибели микроорганизмов не подчиняется экспоненциальной зависимости, а значение скорости инактивации, постоянно снижаясь, стремится к нулю, в связи с чем расчет показателя константы скорости инактивации невозможен. Режим инактивации с использованием 0,04% тиомерсала при температуре 37 °C позволяет получать 7,0 дм³ бактерины с концентрацией $9,5 \pm 0,2 \text{ лг м.к./см}^3$ за 5,8 ± 0,1 ч. Гемагглютинирующая активность антигена, инактивированного тиомерсалом, сразу после приготовления была выше, чем инактивированного формалином ($P < 0,05$). Однако через 10 мес. хранения активность антигена, инактивированного тиомерсалом, снизилась на $3,1 \log_2$ ($P < 0,05$), а инактивированного формалином – на $0,4 \log_2$ ($P > 0,05$). Приготовленный с помощью формалина антиген сохраняет высокую гемагглютинирующую активность в процессе хранения, что необходимо для изготовления качественных вакцин.

Ключевые слова: инфекционный ринит (гемофилез) кур, штамм, инактивация, формалин, тиомерсал, антиген, *Avibacterium paragallinarum*.

UDC 619:579.843.94:614.48:615.371

SPECIFIC ASPECTS OF *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* INACTIVATION WITH FORMALDEHYDE AND THIOMERSAL

M. S. Firsova¹, V. A. Yevgrafova², A. V. Potekhin³¹ Post-Graduate Student, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: firsova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-1531-004X² Leading Veterinarian, FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: evgrafova@arriah.ru; ORCID ID 0000-0003-3053-6976³ Head of Sector, Candidate of Science (Veterinary Medicine), FGBI "ARRIAH", Vladimir, Russia, e-mail: potehin@arriah.ru; ORCID ID 0000-0002-3529-4809

SUMMARY

The paper demonstrates results of testing different modes of *Avibacterium paragallinarum* inactivation with formaldehyde and thiomersal. The bacterium destruction by 0.20% and 0.10% formaldehyde proceeds at the constant rate thus indicating exponential dependence of the microorganism inactivation processes. This fact allows for calculation of the inactivation rate constant that amounts to $2.94 \pm 0.37 \text{ h}^{-1}$ for 0.10% formaldehyde and $5.86 \pm 0.72 \text{ h}^{-1}$ for 0.20% formaldehyde. Inactivation using formaldehyde at final concentration of 0.10% at 37 °C and continuous stirring (60 rpm) produces 7.0 dm³ of bacterin at concentration of $9.5 \pm 0.2 \text{ lg microbial cells (mc)/cm}^3$ in $4.3 \pm 0.1 \text{ h}$. Thiomersal demonstrated bactericidal action against *Avibacterium paragallinarum* at concentration of 0.04% (1:2500) or higher. Herewith, inactivation process is specified by linearity and the inactivation rate constant amounts to $7.92 \pm 1.12 \text{ h}^{-1}$. Under thiomersal sublethal concentration of 0.2% (1:5000) the survival curve is of irregular shape. However, the process of the microorganism death is not exponential, and under continuous decrease, the inactivation rate is going to zero thus making impossible the calculation of the inactivation rate constant. Inactivation mode involving use of 0.04% thiomersal at 37 °C allows production of 7.0 dm³ of bacterin at $9.5 \pm 0.2 \text{ lg mc/cm}^3$ concentration in $5.8 \pm 0.1 \text{ h}$. Right after production, the hemagglutination activity of the thiomersal inactivated antigen was higher as compared to formaldehyde inactivated antigen ($P < 0.05$). However, after 10-month storage the activity of the thiomersal inactivated antigen decreased by $3.1 \log_2$ ($P < 0.05$), and of the formaldehyde inactivated antigen – by $0.4 \log_2$ ($P > 0.05$). The antigen produced using formaldehyde maintains high hemagglutination activity during storage that is critical for high quality vaccine production.

Key words: infectious coryza (Haemophilus infection), strain, inactivation, formaldehyde, thiomersal, antigen, *Avibacterium paragallinarum*.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных причин снижения экономических показателей на птицефабриках промышленного типа являются респираторные заболевания. По происхождению и клинико-морфологическому проявлению они весьма разнообразны [12].

Из комплекса респираторных болезней птиц особый интерес для ветеринарных специалистов представляет инфекционный ринит (гемофилез) кур. Обусловлено это, с одной стороны, скудностью информации о заболевании, а с другой – отсутствием отечественных средств его специфической профилактики [3, 5, 14].

Для специфической профилактики инфекционного ринита кур в основном используют инаktivированные вакцины благодаря их существенным преимуществам перед живыми. Прежде всего, следует отметить их высокую безопасность и безвредность, возможность стандартизации, дозированного введения специфического антигена, стабильность основных биологических свойств, возможность создания системного напряженного и продолжительного иммунологического эффекта, возможность успешного применения в поливалентном или ассоциированном вариантах [1, 2, 8].

Для изготовления инаktivированных вакцин используют вирулентные штаммы *Avibacterium paragallinarum*. Важным условием получения качественного бактериального антигена является выбор инаktivанта и оптимальных условий инаktivации, позволяющих полностью лишить возбудителя инфекционной активности при максимальном сохранении антигенности. Процесс инаktivации в значительной степени зависит от условий проведения реакции, чистоты бактериосодержащей суспензии, концентрации и вида инаktivировающего вещества [1, 2, 5, 6]. Без изучения процессов инаktivации бактерий невозможно получить качественный антиген со стабильными иммунобиологическими свойствами.

Среди исследователей, занимающихся разработкой и изготовлением вакцин против инфекционного ринита кур, нет единого мнения по поводу влияния на возбудителя различных химических инаktivантов. В ряде работ показано, что инаktivированные тиомерсалом антигены *A. paragallinarum* превосходят по активности формолантигены [7, 8, 11]. При этом отмечается, что формалин не является идеальным инаktivантом, так как, реагируя с аминокислотами, он денатурирует белки. Приготовленные на основе квасцов, геля гидрооксида алюминия и минеральной масла формолвакцины уступали по иммуногенности аналогичным препаратам, инаktivированным тиомерсалом [7, 11]. На практике тиомерсал обычно используется для консервации иммунобиологических препаратов в концентрации 0,01–0,02% (0,1–0,2 мг/см³). Цитотоксическое действие тиомерсала основывается на взаимодействии и блокировании SH-групп белков клеточной мембраны и ферментов. Результатом инаktivации поверхностных ферментов является бактериостатическое действие, а инаktivации ферментов внутри клетки – бактерицидное действие [8, 11].

По другим сообщениям, с помощью формалина также возможно получить бактериальный антиген с высокими иммуногенными свойствами [10, 13]. Основное воздействие формальдегида распространяется на полинуклеотиды и аминокислоты белка. Реакции

формальдегида с белками и нуклеиновой кислотой приводят к образованию стабильных межмолекулярных поперечных связей между аминокислотами и основанием одной или двух нуклеиновых кислот. Этот механизм сопровождается первичными повреждениями, деспирализацией и инаktivацией нуклеиновых кислот, существенными конформационными изменениями полипептидной цепи, а также стабилизацией макроструктуры биополимеров. Кроме того, повреждающее действие формальдегида направлено на оболочку бактерий, мембрану цитоплазмы, а также на внутриклеточные ферменты. Формалин в концентрации 0,1% (по объему) убивает вегетативные клетки бактерий семейства *Pasteurellaceae* за несколько часов. При меньших концентрациях он оказывает бактериостатическое действие, которое обратимо при добавлении сульфата натрия. Одновременно ингибируются токсичность и стабилизируются антигенные и иммуногенные свойства биополимеров, это свойство лежит в основе производства иммунобиологических препаратов. Полученные с помощью формалина препараты, как правило, безвредны, сохраняют высокую антигенность, иммуногенность и стабильность при длительном хранении [4, 9, 11].

Целью данных исследований был подбор инаktivанта и отработка режима инаktivации бактерий *A. paragallinarum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штамм бактерии *A. paragallinarum* № 5111 серогруппы В, депонированный в коллекции штаммов микроорганизмов ФГБУ «ВНИИЗЖ» в 2017 г.

Культивирование *A. paragallinarum* проводили глубинным способом в лабораторном биореакторе Biotron LiFlus GX с рабочим объемом 7,0 дм³ в течение 12 ч при температуре 37 °С. В качестве питательной среды использовали соево-казеиновый бульон (СКБ) на основе энзиматического гидролизата казеина и сои фирмы Sigma с добавлением 20 мкг/мл НАД (AppliChem) и 5% сыворотки крови лошади производства «Микроген».

Бульонную культуру штамма *A. paragallinarum*, взятую в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста, с концентрацией $9,5 \pm 0,2$ lg КОЕ/см³ в объеме 100 см³ переносили в конические колбы и помещали в шейкер-инкубатор Biosan ES20. Процесс инаktivации осуществляли при температуре 37 °С и перемешивании 60 об/мин.

Для инаktivации бактерий использовали 36%-й водный раствор формальдегида (формалин) производства «Метафракс» и тиомерсал, содержащий 46% ртути фирмы Ferak Berlin (Германия).

Концентрацию живых микробных клеток в суспензии определяли путем посева десятикратных разведений культуры на плотную питательную среду по традиционной методике.

Расчет параметров инаktivации производили по формуле [5]:

$$e^{-kt} = X_t/X_0$$

где k – константа скорости инаktivации (ч⁻¹);

t – время инаktivации (ч);

X_0 – исходная концентрация микробных клеток (lg КОЕ/см³);

X_t – остаточное количество микробных клеток (lg КОЕ/см³).

Определение гемагглютинирующей активности антигенов проводили в реакции гемагглютинации (РГА), используя двукратные разведения от 1:50 до 1:3200 по традиционной методике. Реакцию учитывали визуально и оценивали в крестах. За титр антигена принимали наибольшее его разведение, дающее четко выраженную агглютинацию эритроцитов (+++ или ++++). Одновременно проводили тестирование на отсутствие спонтанной агглютинации эритроцитов (отрицательный контроль). Статистическую достоверность различия гемагглютинирующей активности антигенов определяли с вероятностью 95%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для отработки режима инаktivации бактерий *A. paragallinarum* формалином необходимо было сначала изучить выживаемость культуры данного микроорганизма при воздействии различных концентраций указанного инаktivирующего агента.

Для изучения процесса инаktivации в бульонные культуры вносили формалин в количестве 0,05%, 0,10% и 0,20% по объему. Концентрацию живых микробных клеток определяли перед внесением инаktivанта (X_0) и после, через каждые 60 мин (X_t) (см. рис. 1).

На рисунке 1 отображены графики инаktivации бактерий *A. paragallinarum* при действии формалина различных концентраций, а также естественной фазы отмирания (ФО).

Данные проведенных исследований свидетельствуют о том, что гибель бактерий *A. paragallinarum* при воздействии формалина в концентрациях 0,20 и 0,10% идет с постоянной скоростью, то есть процессы инаktivации микроорганизмов подчиняются экспоненциальной зависимости. Данное обстоятельство позволило нам рассчитать показатель константы скорости инаktivации (k), который составил для 0,10% формалина $k = 2,94 \pm 0,37 \text{ ч}^{-1}$, а для 0,20% – $k = 5,86 \pm 0,72 \text{ ч}^{-1}$.

Анализ данных значений k показал прямую зависимость скорости гибели микроорганизмов от концентрации инаktivирующего агента. При этом увеличение количества используемого инаktivанта в два раза повышало значение показателя k и, соответственно, сокращало время инаktivации культуры в аналогичное количество раз. В этом случае можно говорить о том, что процесс инаktivации бактерий *A. paragallinarum* формалином является полностью прогнозируемым процессом. В то же время график инаktivации бактерий формалином в концентрации 0,05% был не линейным.

Таким образом, руководствуясь принципом щадящей инаktivации и учитывая тот факт, что при использовании предельно низких концентраций формалина процессы инаktivации бактерий могут быть не линейны, мы определили 0,10% формалина как оптимальную концентрацию для инаktivации бактерий данного вида.

Поскольку всегда существует вероятность выживания хотя бы одного микроорганизма в единице объема инаktivируемой суспензии, следующим этапом работы было определение времени инаktivации (t).

По завершении процесса культивирования в бульонную суспензию штамма *A. paragallinarum* № 5111 в объеме 7,0 л добавляли формалин из расчета 0,10% по объему.

При расчете показателя t также учитывали допустимый уровень остаточного вирулентного материала

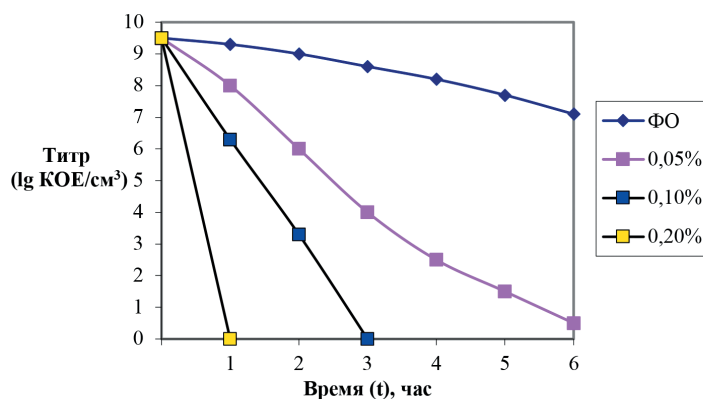


Рис. 1. Кинетика инаktivации культуры *A. paragallinarum* формалином, $n = 3$

в бульонной культуре, зависящий от ее объема. Поскольку рабочий объем инаktivируемой суспензии был равен 7,0 дм³, количество выживших бактерий не должно было превышать $-3,84 \text{ lg KOE/см}^3$.

На рисунке 2 отображен график инаktivации бактерий *A. paragallinarum* при воздействии 0,10% формалина с учетом константы скорости инаktivации и допустимого уровня остаточного вирулентного материала.

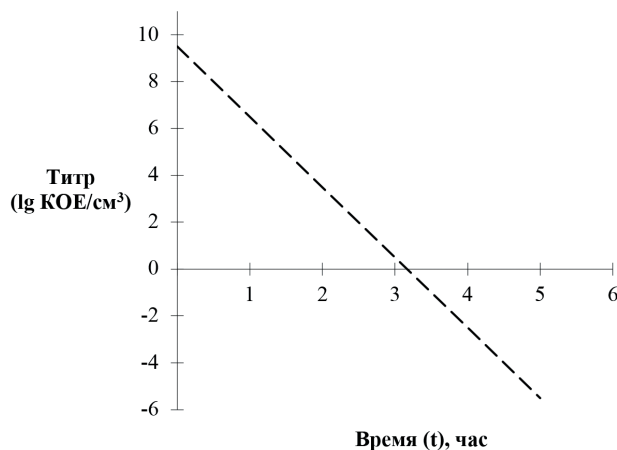
Данные расчета времени инаktivации показали, что использование указанного количества формалина обеспечивало гибель бактерий до $-3,84 \text{ lg KOE/см}^3$ в течение $4,3 \pm 0,1 \text{ ч}$.

Таким образом, отработанный режим инаktivации *A. paragallinarum* – 0,10% формалина при температуре 37 °С и постоянном перемешивании (60 об/мин) – позволяет получать 7,0 л бактериона с концентрацией $9,5 \pm 0,2 \text{ lg м.к./см}^3$ за $4,3 \pm 0,1 \text{ ч}$.

Следующим этапом исследования была отработка режима инаktivации *A. paragallinarum* тиомерсалом с изучением кинетики процесса. С этой целью бульонную суспензию бактерий, взятую в конце экспоненциальной – начале стационарной фазы роста, подвергали воздействию различных концентраций раствора тиомерсала – 0,02, 0,04 и 0,08%.

На рисунке 3 отображены графики инаktivации бактерий при воздействии различных концентраций тиомерсала.

Рис. 2. Инаktivация бактерий *A. paragallinarum* формалином в конечной концентрации 0,10%, $n = 3$



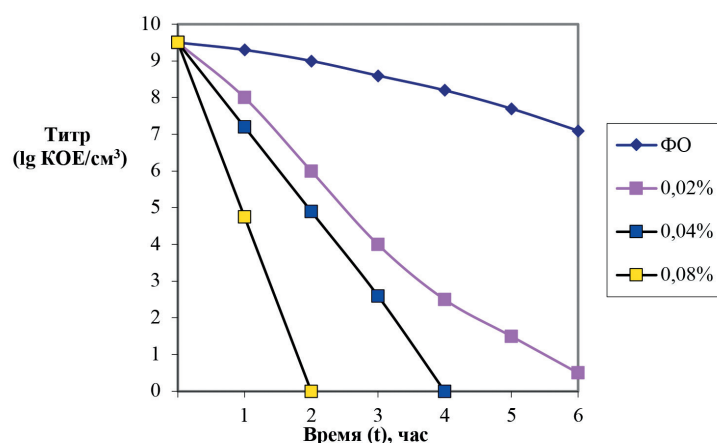


Рис. 3. Кинетика инактивации бактерий *A. paragallinarum* тиомерсалом, $n = 3$

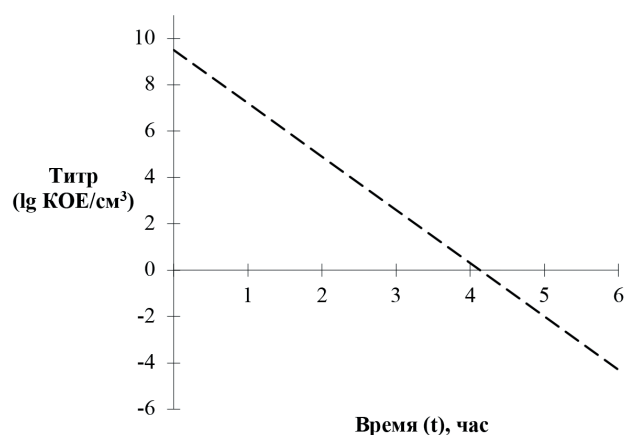


Рис. 4. Инактивация бактерий *A. paragallinarum* тиомерсалом в конечной концентрации 0,04%, $n = 3$

В ходе проведенных исследований было установлено, что тиомерсал обладает бактерицидным действием на клетки *A. paragallinarum* в концентрации 0,04% (1:2500) и выше. При этом процесс инактивации характеризовался линейностью, что позволило рассчитать константу скорости инактивации $k = 7,92 \pm 1,12 \text{ ч}^{-1}$. При действии инактиванта в сублетальной концентрации 0,02% (1:5000) график выживания имел сложную форму и включал начальный участок быстрой и последующий участок медленной инактивации. При этом процесс гибели микроорганизмов не подчинялся экспоненциальной зависимости, а значение скорости инактивации, постоянно снижаясь, стремилось к нулю, в связи с чем расчет показателя k представлялся невозможным.

В дальнейших исследованиях для инактивации бактерий *A. paragallinarum* использовали тиомерсал в концентрации 0,04%.

На очередном этапе работы определяли продолжительность инактивации микроорганизмов в рабочем объеме 7,0 л. Процесс инактивации проводили в стандартных условиях – при температуре 37 °C и постоянном перемешивании со скоростью 60 об/мин.

На рисунке 4 представлен график инактивации бактерий *A. paragallinarum* при воздействии 0,04% тиомерсала с учетом константы скорости инактивации и допустимого уровня остаточного вирулентного материала.

Данные расчета времени инактивации показали, что использование указанного количества тиомерсала обеспечивало гибель бактерий до $-3,84 \text{ lg KOE/cm}^3$ в течение $5,8 \pm 0,1 \text{ ч}$.

Таким образом, отработанный режим инактивации с использованием 0,04% тиомерсала позволяет получать 7,0 дм³ бактериона с концентрацией $9,5 \pm 0,2 \text{ lg м.к./см}^3$ за $5,8 \pm 0,1 \text{ ч}$.

После инактивации клетки осаждали центрифугированием при 3000 g в течение 20 мин при 4 °C, а осадок ресуспендировали в фосфатно-буферном растворе с pH 7,2 до концентрации 100 ед. ($10^{10} \text{ м.к./см}^3$) по оптическому стандарту мутности. Полученные антигены хранили при температуре +4 °C в течение 10 мес. (срок наблюдения).

Завершающим этапом работы было определение гемагглютинирующей активности антигенов *A. paragallinarum* после инактивации различными агентами (табл.).

Гемагглютинирующая активность антигена, инактивированного тиомерсалом, сразу после приготовления была выше, чем инактивированного формалином ($P < 0,05$). Однако через 10 мес. хранения активность антигена, инактивированного тиомерсалом, снизилась на $3,1 \log_2$ ($P < 0,05$), а инактивированного формалином – на $0,4 \log_2$ ($P > 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что формалин в конечной концентрации 0,10% при температуре 37 °C обеспечивает полную инактивацию бульонной культуры штамма *A. paragallinarum* за $4,3 \pm 0,1 \text{ ч}$. Тиомерсал в концентрации 0,04% при температуре 37 °C также обеспечивал полную инактивацию бактерий за $5,8 \pm 0,1 \text{ ч}$.

Для инактивации вирулентных штаммов бактерии *Avibacterium paragallinarum* целесообразно использовать формалин, так как при его воздействии антиген сохраняет высокую гемагглютинирующую активность в течение 10 мес. (срок наблюдения), тем самым позволяет получать качественное сырье для изготовления инактивированных вакцин.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Таблица

Гемагглютинирующая активность антигенов *A. paragallinarum* в РТА после инактивации различными агентами

Инактивант	Концентрация, %	Титр антигена ($\log_2$) после хранения, мес.					
		0	2	4	6	8	10
Формалин	0,10	$7,2 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,1$	$6,8 \pm 0,1$
Тиомерсал	0,04	$8,4 \pm 0,1$	$8,2 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биотехнология / И. В. Тихонов, Е. А. Рубан, Т. Н. Грязнева [и др.]; под ред. Е. С. Воронина. – СПб.: ГИОРД, 2005. – С. 241–268.
2. Борисова И. А. Разработка технологии изготовления и контроля инактивированной вакцины против ньюкаслской болезни и метапневмовирусной инфекции птиц: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Владимир, 2008. – 25 с.
3. Гемофилез птиц / Т. Н. Рождественская, Е. В. Кононенко, С. А. Емельянова [и др.] // Ветеринарная медицина. – 2016. – № 4. – С. 50–53.
4. Калашников Н. В. Особенности поражения бактерий формальдегидом // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1986. – № 6. – С. 35–41.
5. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология / пер. с англ. Л. Б. Меклера. – М.: Мир, 1967. – 347 с.
6. Сергеев В. А., Непоклонов Е. А., Алипер Т. И. Вирусы и вирусные вакцины. – М.: Библионика, 2007. – С. 206–223.
7. Blackall P. J., Reid G. G. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza // *Avian Dis.* – 1987. – Vol. 31. – P. 527–532; PMID: 2960312.
8. Blackall P. J. Vaccines against infectious coryza // *World's Poult. Sci. J.* – 1995. – Vol. 51 (1). – P. 17–26; DOI: 10.1079/WPS19950003.
9. Brown F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses // *Dev. Biol. Stand.* – 1993. – Vol. 81. – P. 103–107; PMID 8174792.
10. Coetzee L., Strydom G. S., Rogers E. J. The value of oil-adjuvant vaccines in the control of *Haemophilus paragallinarum* infection (infectious coryza) in egg producing birds in South Africa // *Dev. Biol. Stand.* – 1982. – Vol. 51. – P. 169–180.
11. Davis R. B., Rimler R. B., Shotts E. B. Efficacy studies on *Haemophilus gallinarum* bacterin preparations // *Am. J. Vet. Res.* – 1976. – Vol. 37. – P. 219–222; PMID: 1259216.
12. Mortality, disease and associated antimicrobial use in commercial small-scale chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam / J. Carrique-Mas, N. T. B. Van, N. V. Cuong [et al.] // *Prev. Vet. Med.* – 2019. – Vol. 165. – P. 15–22; DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.005.
13. Rimler R. B., Shotts E. B., Davis R. B. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza // *Avian Dis.* – 1975. – Vol. 19. – P. 318–322; PMID: 1156259.
14. Selection of *Avibacterium paragallinarum* Page serovar B strains for an infectious coryza vaccine / H. Sun, S. Xie, X. Li [et al.] // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2018. – Vol. 199. – P. 77–80; DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.04.001.
2. Borisova I. A. Development of manufacturing and control technology of inactivated vaccine against Newcastle diseases and avian metapneumovirus infection [Razrabotka tekhnologii izgotovleniya i kontrolya inaktivirovannoj vakciny protiv n'yukaslskoj bolezni i metapnevmo-virusnoj infekcii ptic]: author's abstract Thesis of Candidate of Science (Biology). Vladimir, 2008 (in Russian).
3. Haemophilus infection in birds [Gemofilez ptic]. T. N. Rozhdestvenskaya, Ye. V. Kononenko, S. A. Yemelyanova [et al.]. *Veterinarnaya Medicina*. 2016; 4: 50–53 (in Russian).
4. Kalashnikov N. V. Specifics of formaldehyde effect on bacteria [Osobennosti porazheniya bakterij formal'degidom]. *Molekularnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 1986; 6: 35–41 (in Russian).
5. Meynell G., Meynell E. Theory and Practice in Experimental Bacteriology [Eksperimental'naya mikrobiologiya]; translated from English by L. B. Mekler. M.: Mir, 1967 (in Russian).
6. Sergeyev V. A., Nepoklonov Ye. A., Aliper T. I. Viruses and Virus Vaccines [Virusy i virusnye vakciny]. M.: Biblionika, 2007 (in Russian).
7. Blackall P. J., Reid G. G. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis.* 1987; 31: 527–532; PMID: 2960312.
8. Blackall P. J. Vaccines against infectious coryza. *World's Poult. Sci. J.* 1995; 51 (1): 17–26; DOI: 10.1079/WPS19950003.
9. Brown F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses. *Dev. Biol. Stand.* 1993; 81: 103–107; PMID 8174792.
10. Coetzee L., Strydom G. S., Rogers E. J. The value of oil-adjuvant vaccines in the control of *Haemophilus paragallinarum* infection (infectious coryza) in egg producing birds in South Africa. *Dev. Biol. Stand.* 1982; 51: 169–180.
11. Davis R. B., Rimler R. B., Shotts E. B. Efficacy studies on *Haemophilus gallinarum* bacterin preparations. *Am. J. Vet. Res.* 1976; 37: 219–222; PMID: 1259216.
12. Mortality, disease and associated antimicrobial use in commercial small-scale chicken flocks in the Mekong Delta of Vietnam. J. Carrique-Mas, N. T. B. Van, N. V. Cuong [et al.]. *Prev. Vet. Med.* 2019; 165: 15–22; DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.005.
13. Rimler R. B., Shotts E. B., Davis R. B. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. *Avian Dis.* 1975; 19: 318–322; PMID: 1156259.
14. Selection of *Avibacterium paragallinarum* Page serovar B strains for an infectious coryza vaccine. H. Sun, S. Xie, X. Li [et al.]. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018; 199: 77–80; DOI: 10.1016/j.vetimm.2018.04.001.

REFERENCES

1. Biotechnology [Biotehnologiya]. I. V. Tikhonov, Ye. A. Ruban, T. N. Gryazneva [et al.]; ed. by Ye. S. Voronina. SPb.: GIORД, 2005 (in Russian).

Поступила 28.05.2019
Принята в печать 19.08.2019