

**ЖУРАВЛЕВА МАРИЯ СПАРТАКОВНА**

**Количественная характеристика показателей иммунного  
ответа у кур на различные типы антигенов**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология  
с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко» (ФГБНУ ВИЭВ).

Научный руководитель: доктор биологических наук **Ездакова Ирина Юрьевна**

Официальные оппоненты:

**Ирза Виктор Николаевич**, доктор ветеринарных наук, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», начальник отдела по болезням птиц

**Брылина Вера Евгеньевна**, кандидат ветеринарных наук, доцент, ФГБНУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», профессор кафедры

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт птицеводства (ФГБНУ ВНИВИП).

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 при Всероссийском научно-исследовательском институте экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЭВ.  
Диссертация опубликована на официальном сайте ФГБНУ ВИЭВ – <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

А. Х. Найманов

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Иммунная система животных в процессе эволюции изменялась от примитивных защитных форм у беспозвоночных до сложнейших регуляторных механизмов у млекопитающих, где основные компоненты иммунитета, играющие важную роль в защите от инфекции, по своей структуре и функциям обладают значительной степенью гомологии. Поэтому экспериментальные исследования, проводимые на таких животных, как куры, помогают понять закономерности иммуногенеза, начиная с ранних этапов формирования иммунной системы.

Количественная и функциональная характеристика различных компонентов иммунной системы показывает различия в ее способности давать сильный или слабый иммунный ответ на различные типы антигенов, что важно учитывать при проведении иммунопрофилактики (А. Heriazon et al., 2007).

Иммуногенными свойствами обладает широкий круг природных высокомолекулярных соединений и, в первую очередь белки, полисахариды и их комплексы. Существует несколько критериев, по которым классифицируются антигены: происхождение, химическая природа, чужеродность, характер иммунного ответа. По механизму формирования иммунного ответа выделяют Т-зависимые и Т-независимые антигены (А.А. Ярилин, 2000). Т-зависимые антигены обладают способностью индуцировать иммунный ответ с участием всех компонентов иммунной системы: макрофаги осуществляют фагоцитарную защиту организма на ранней стадии иммунного ответа, также функция макрофагов предполагает процессинг и презентацию антигена Т-лимфоцитам, которые активируют В-клетки в медуллярной зоне вторичных лимфоидных органов (Дж. Плейфэр, 1999; Р.М. Хаитов и др., 2000).

Т-независимые антигены (митогены) первого и второго типов (полисахариды, липополисахариды, высокополимерные белки, синтетический поливинилпирролидон) характеризуются многократным повторением структурно идентичных В-эпитопов, что приводит к поликлональной стимуляции В-лимфоцитов с преимущественным синтезом IgM и отсутствием формирования

клеток памяти (А. А. Тотолян, 2000; А.А. Михайленко и др., 2000; А. Ройт, 2000; Р. Цинкернагель, 2008).

Несмотря на то, что опубликован ряд работ (Т.К. Борисова, 2006; И.Ю. Ездакова, 2007), посвященных Т-зависимому и Т-независимому иммуногенезу у лабораторных животных, неосвященными остаются аспекты формирования иммунного ответа у кур на данные типы антигенов. В настоящее время это является особенно актуальным, так как в России насчитывается большое количество иммунопрофилактических препаратов для птицеводства, а именно вакцин против основных инфекционных болезней кур, к которым следует применять научно обоснованные методы биологического контроля, а для этого необходимо изучать механизмы формирования поствакцинального иммунного ответа. Поэтому в наших исследованиях мы дали сравнительную характеристику показателям иммунного ответа на три модели антигенов (Т-зависимый (эритроциты барана (диаметр 5 мкм) и вирус-вакцина (0,12 мкм) - белковые антигены, Т-независимый (поливинилпирролидон – 750 кДа) - небелковый антиген).

Вакцинный процесс, обусловленный введением специфических профилактических препаратов, отражает сложные механизмы взаимодействия макроорганизма и антигена со стороны иммунной системы. Известно, что для полноценного развития специфического иммунного ответа на антиген необходима кооперация макрофагов, Т- и В-клеток (Е.И. Соколов, 1998; Р.М. Хаитов и др., 2000; А.В. Караулов, 2002; G. Burmester, 2003; F. Davison, 2008; А.А. Ярилин, 2010). При этом практически все органы и ткани участвуют в иммунологической перестройке, характер которой обусловлен особенностями иммунной системы животного, свойствами и дозой вводимого антигена (Р. Цинкернагель, 2008; И.Н. Громов, В.С. Прудников, 2011).

Важное значение данных о состоянии поствакцинального иммунитета для практической и фундаментальной ветеринарии подтверждено многочисленными исследованиями (Б.Я. Бирман и др., 2008; Е.В. Зайцева, 2011; С. Casteleyn, 2010; F. Davison, 2008; А. Larsson, 1993; В. Mobini, 2012).

Целью любой вакцинации является защита организма от инфекции, однако в большинстве случаев полностью достичь этого эффекта не удастся, так как иммунорегуляторные механизмы поствакцинального иммунного ответа изучены не в полной мере. В связи с этим актуальными являются исследования по изучению механизмов формирования иммунного ответа на различные типы антигенов, получению препаратов для оценки эффективности вакцинных и лекарственных средств для кур, оптимизации и использованию методов для определения состояния иммунной системы в процессе онто- и иммуногенеза. Результаты подобных исследований будут иметь не только научный интерес в изучении механизмов формирования иммунного ответа у птиц, но и практическую значимость для ветеринарии, способствуя производству эффективных вакцинных препаратов.

**Цель исследований** – дать сравнительную характеристику показателям иммунного ответа у кур на различные типы антигенов с помощью полученных препаратов и оптимизированных методов исследования иммунитета.

Для решения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

- выделить иммуноглобулин Y из биологических жидкостей кур;
- получить моноспецифическую сыворотку к IgY, антисыворотки к белкам крови и  $\gamma$ -глобулинам кур;
- изучить показатели иммунного ответа у кур на T-зависимый антиген;
- дать характеристику показателям T-независимого иммунного ответа у кур;
- определить показатели иммунного ответа на введение живой вакцины против инфекционного бронхита кур (ИБК);
- дать сравнительную характеристику основным критериям оценки иммунного ответа у кур на различные типы антигенов;
- определить функциональную активность иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулина Y на разных этапах иммунного ответа.

**Научная новизна.** Впервые проведены сравнительные исследования на антигены различной структуры в процессе иммунного ответа у кур. На основании полученных экспериментальных данных подтверждены некоторые закономерности регуляции иммунной системы животных. Установлена

отрицательная корреляция между количеством псевдоэозинофилов и лимфоцитов в крови кур в процессе Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа.

Отработаны способы выделения иммуноглобулина Y из биологических жидкостей кур. Установлено, что электрофоретические свойства IgY, полученного из сыворотки крови и желтка яиц идентичны. Получена моноспецифическая сыворотка к IgY кур для его количественного определения в реакции иммунодиффузии по методу Манчини.

Впервые дана сравнительная характеристика показателей иммунного ответа у кур и использованы нагрузочные тесты на основе методов иммунодиффузии, спонтанного розеткообразования, определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови для оценки функциональных свойств различных компонентов иммунной системы у кур в процессе иммунного ответа на различные типы антигенов.

Установлено, что *in vitro* метаболиты дрожжеподобных грибов рода *Candida* значительней метаболитов дерматофитных грибов *Trichophyton* и *Microsporum*, а также метаболитов бактерий рода *Salmonella*, снижают преципитирующие свойства иммуноглобулина Y и фагоцитарную активность лейкоцитов крови кур.

Получены новые данные о неодновременной функциональной активности отдельных компонентов иммунитета в процессе первичного иммунного ответа. Определено, что на 7-е сутки первичного иммунного ответа на Т-зависимый и Т-независимый антигены активность фагоцитов крови находится в обратной зависимости от адгезивной способности Т-спленоцитов.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученные данные дают объективное представление о динамике иммунного ответа у кур и позволяют прогнозировать его развитие на различные типы антигенов.

В результате исследований определены параметры иммуноглобулина класса Y, а также проведена оценка клеточных показателей иммунного ответа с учетом возрастных и сезонных факторов.

Разработаны методические положения по получению моноспецифической антисыворотки к IgY кур (утверждены директором ФГБНУ ВИЭВ, протокол №7 от 19 ноября 2014 г.).

Для дальнейших исследований механизмов иммунного ответа предлагается методический подход к оценке иммунного ответа у кур, который заключается в определении взаимосвязи псевдоэозинофилов и лимфоцитов и дифференцированном анализе показателей иммунного ответа на различных этапах его развития. Показана возможность использования данного подхода на примере живой вирус-вакцины для оценки поствакцинального иммунного ответа у кур.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы были доложены, обсуждены и получили положительную оценку на Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп сельскохозяйственных животных, рыб и пчел» (Москва, 2011 г.); на 3-й Международной научно-практической конференции молодых ученых «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» (Владимир, 2012 г.); на Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России» (Москва, 2013 г.); на Международной научно-практической конференции «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве» (Санкт-Петербург, 2014 г.); на Ученом Совете и методической комиссии ФГБНУ ВИЭВ в 2012-2014 гг.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 6 работ в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией.

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена соискателем самостоятельно, участие соавторов отражено в совместно изданных научных статьях. Автор приносит глубокую благодарность научному руководителю доктору биологических наук Ездаковой Ирине Юрьевне за оказание научно-методической помощи в анализе полученных результатов. Автор также благодарна доктору ветеринарных наук В.Н. Скворцову, доктору ветеринарных наук А.М. Литвинову и кандидату ветеринарных наук М.Н. Лощинину за научно-методическую помощь в проведении исследований.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 174 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений и списка литературы.

Материалы диссертации иллюстрированы 24 таблицами и 36 рисунками. Список литературы включает 228 источников, из них 67 зарубежных авторов.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- получение препаратов для изучения и характеристики иммунного ответа на различные типы антигенов;
- основные показатели Т-зависимого и Т-независимого иммунного ответа у кур;
- динамика поствакцинального иммуногенеза на живую вакцину против ИБК;
- сравнительная характеристика параметров иммунного ответа у кур на различные типы антигенов;
- функциональная активность структурных компонентов иммунной системы кур на разных этапах иммуногенеза.

**СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Материалы и методы**

Исследования выполнены в лаборатории иммунологии Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко в период 2011-2014 гг. Общая схема исследований представлена на рисунке **Ошибка! Источник ссылки не найден.** В качестве объектов исследования использовали цыплят яичного кросса «Хайсекс Браун», общее количество которых составило 400 голов, в возрасте от 6-и суток до 1,5 месяцев. Материалом для исследований служили: стабилизированная гепарином кровь, сыворотка крови, лимфоидные органы

(тимус, бурса, селезенка) и перитонеальные макрофаги кур. Гамма-глобулины из сыворотки крови и желтка осаждали кристаллическим сульфатом аммония. Для получения иммунохимически чистых иммуноглобулинов кур проводили гель-фильтрацию на Sephacryl S-500 и ионообменную хроматографию на DEAE-Sephrose CL-6B.



Сорбенты для гель-фильтрации и ионообменной хроматографии уравнивали буферными растворами 0,1 М Tris-HCl, pH 8,0 и 0,02 М Tris-HCl, pH 7,2 соответственно. Элюцию проводили в градиенте NaCl (0,05 М, 0,15 М, 0,25 М, 0,5 М, 1,0 М). Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Иммуноэлектрофоретический анализ в 1,0 % агарозе, приготовленной на 0,05 М веронал-мединаловом буфере pH 8,6, проводили в течение 1,5 ч. при 25 мА. (Г. Фримель, 1987). Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-ДСН) определяли степень чистоты выделенного иммуноглобулина и его молекулярную массу. Компоненты для электрофореза в (+) и (-) вариантах готовили согласно инструкции производителя.

Для получения антисывороток проводили иммунизацию лабораторных животных (кроликов, овец) по методу, разработанному М.А. Мисниковой и А.Ю. Самострельским (1976), в нашей модификации. Для пролонгированного действия антигена и усиления иммунного ответа применяли полный адьювант Фрейнда (ПАФ). Рабочее разведение антисывороток определяли в РДП. Количественное содержание иммуноглобулина в сыворотках крови кур определяли в РИД по методу Манчини.

Относительное содержание форменных элементов стабилизированной гепарином крови подсчитывали общепринятым способом. Методом адгезии на пластик получали перитонеальные макрофаги кур. Фагоцитарную активность лейкоцитов крови и перитонеальных макрофагов исследовали с помощью взвеси частиц латекса ( $0,5-1 \times 10^6$  ч.л./мл, размер частиц - 1,5 мкм). Иммунокомпетентные мононуклеарные клетки (МНК) выделяли из крови, первичных (тимус, бурса) и вторичных (селезенка) лимфоидных органов (Ю.Н. Федоров, И.Ю. Ездакова, 2008). Применяли метод розеткообразования (И.П. Кондрахин, 2004) с использованием 0,5% взвеси эритроцитов барана и комплекса зимозана с С3-компонентом комплемента.

Для выявления Т-хелперов и цитотоксических клеток из взвеси МНК органов иммунной системы и крови применяли теофиллиновый тест. Нагрузочные тесты (А.В. Караулов, 2002) с метаболитами микроорганизмов

(*Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Salmonella cholerasuis*, *Salmonella enteritidis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*) проводили на основе реакций по определению количества Т-спленоцитов цыплят, фагоцитарной активности лейкоцитов крови и содержанию иммуноглобулина Y в сыворотке крови.

Для оценки результатов нагрузочного теста вычисляли индекс сдвига (А.В. Караулов, 2002). В экспериментах использовали 0,5% суспензию эритроцитов барана (ЭБ) – Т-зависимый антиген, 2,0% раствор поливинилпирролидона (ПВП) – Т-независимый антиген, отечественную производственную живую сухую вакцину из штамма «Н-120» против инфекционного бронхита кур (ИБК) производства ФГБУ «ВНИИЗЖ».



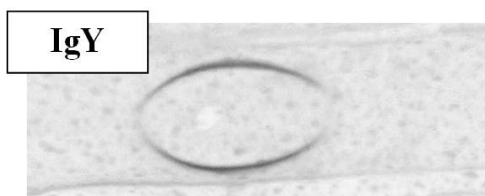
*Рис. 1. Общая схема исследований.*

Статистическую обработку результатов проводили согласно стандартным методам (Г.Ф. Лакин, 2000) и с помощью программы Microsoft Excel 2010. Значение критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Выделение IgY из сыворотки крови и желтка яиц кур

В ходе работы был оптимизирован процесс выделения IgY из сыворотки крови и желтка яиц кур. После третьего этапа солевого осаждения гамма-глобулиновая фракция содержала меньше белковых примесей по результатам иммуноэлектрофореграммы. Для выделения IgY проводили гель-фильтрацию препарата, в ходе которой установили, что IgY с меньшим количеством примесей других белков элюировался в нисходящей части первого пика хроматограммы. Так как данный хроматографический метод не позволил получить элюат IgY без примесей белков, следующим этапом выделения была ионообменная хроматография. После первичного проведения ионообменной хроматографии иммуноглобулин Y элюировался во втором пике в 0,15 M NaCl на 0,02 M Tris-HCl, pH 7,2. Повторное выделение на сорбенте DEAE-Sepharose CL-6B позволило получить иммунохимически чистый IgY (рис. 1) в 0,02M Tris-HCl буфере, pH 7,2 без градиента соли. Методом электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ-ДСН) определяли степень чистоты выделенного иммуноглобулина Y и его молекулярную массу (180 кДа).



*Рис. 1. Иммуноэлектрофореграмма иммунохимически чистого IgY сыворотки крови кур (в лунке – иммунохимически чистый иммуноглобулин Y, в траншеях – антисыворотка к гамма-глобулинам сыворотки крови кур).*

Для выделения иммуноглобулина Y из желтка яиц одним из оптимальных методов являлось сочетание ионообменной хроматографии предварительно очищенных от липидов гамма-глобулинов желтка, концентрация фракций,

которые по результатам иммуноэлектрофореза содержали IgY, и, при наличии других белковых примесей в элюате после концентрации, проведение повторной ионообменной хроматографии с получением иммунохимически чистого иммуноглобулина.

Таким образом, в результате проведенных исследований было получено 1,8 мг/мл и 5,3 мг/мл иммунохимически чистого IgY из желтка яиц и сыворотки крови кур соответственно.

В ходе исследований было определено, что расположение, форма и характер полос преципитации IgY, выделенного из сыворотки крови и желтка яиц, аналогичны, что свидетельствует об идентичных иммуноэлектрофоретических свойствах иммуноглобулина, выделенного из разных биологических жидкостей.

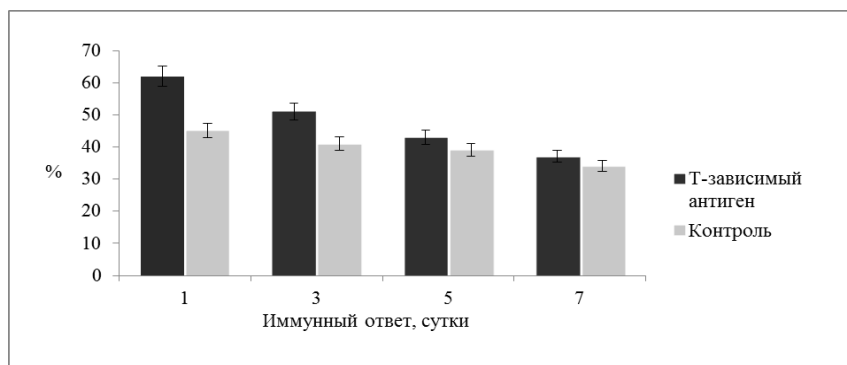
Для дальнейшей работы по получению моноспецифической антисыворотки (иммунизировали кроликов по методу, разработанному А.Ю. Самострельским и М.А. Мисниковой (1976), в нашей модификации) использовали иммунохимически чистый иммуноглобулин Y, полученный из сыворотки крови кур, так как это соответствовало задачам нашего исследования.

### **Количественная характеристика иммунологических показателей в процессе Т-зависимого иммунного ответа у кур**

Введение антигена не вызвало достоверных изменений в показателях лейкограммы, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов и моноцитов. Индекс соотношения относительного содержания лимфоцитов и псевдоэозинофилов в опытной группе имел тенденцию к снижению в 1-е, 3-и, 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено перераспределением Т- и В-лимфоцитов из системной циркуляции во вторичные лимфоидные органы.

Был вычислен коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между относительным содержанием лимфоцитов, как маркеров адаптивного иммунитета, и псевдоэозинофилов – показателей врожденной иммунной системы. В первичном иммуногенезе коэффициент корреляции в контрольной группе составил -0,81, в опытной группе -0,97. Отрицательный коэффициент корреляции

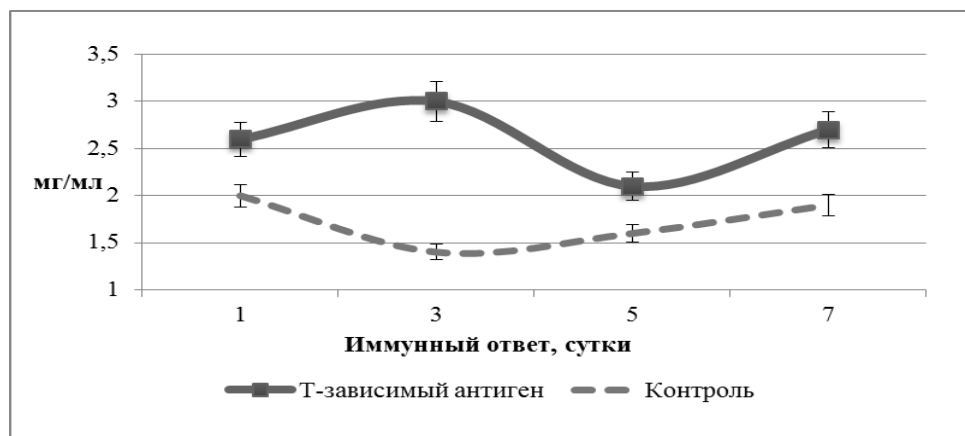
между количеством лимфоцитов и псевдоэозинофилов является показателем адаптивных возможностей иммунной системы.



*Рис. 2. Динамика уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови кур при первичном иммуногенезе.*

Согласно представленным данным (рис. 2) фагоцитарная активность клеток была выше по сравнению с контрольными значениями на всех этапах исследования. Установлено, что развитие Т-зависимого иммунного ответа у кур имело циклический характер, связанный с компенсаторными реакциями иммунной системы, то есть тенденция к снижению фагоцитарной активности на 3-и сутки влекло за собой повышение количества В-клеток и, как следствие, уровня IgY в сыворотке крови кур (рис. 3).

Для оценки гуморального иммунного ответа на введение тимусзависимого антигена исследовали содержание IgY в сыворотке крови в РИД с помощью полученной моноспецифической антисыворотки.

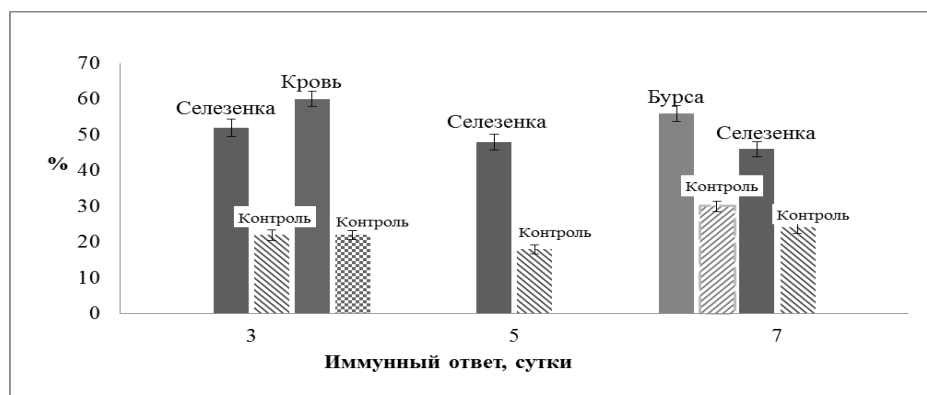


*Рис. 3. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур.*

На 3-и сутки первичного иммуногенеза (рис. 3) наблюдали достоверное увеличение концентрации IgY, которое составило 3,1 мг/мл (контроль - 1,4 мг/мл). В остальные сутки исследования опытной группы сохранялась динамика увеличения показателей по сравнению с контрольными значениями. Взаимосвязь показателей фагоцитарной активности лейкоцитов

крови и содержания IgY в сыворотке крови кур отражает регуляторные аспекты функционирования иммунной системы.

На 1-е сутки иммунного ответа наблюдали повышение общего числа Т-лимфоцитов, CD4- и CD8-клеток в тимусе и крови опытной группы. На 3-и сутки сохранялась та же тенденция с достоверным увеличением количества CD4-клеток в крови ( $34,0 \pm 1,7\%$ , контроль -  $20,0 \pm 0,4\%$ ). Кроме того, содержание Т-хелперов селезенки также увеличилось на 3-и сутки ( $28,4 \pm 1,3\%$ , контроль -  $14,2 \pm 0,9\%$ ). На 5-е сутки иммунного ответа в тимусе наблюдали увеличение числа CD4-клеток ( $16,5 \pm 1,3\%$ ; контроль -  $7,0 \pm 0,2\%$ ), а на 7-е сутки в тимусе регистрировали повышение содержания общего числа Т-лимфоцитов и CD8-клеток ( $43,0 \pm 1,3\%$  и  $40,0 \pm 1,2\%$  соответственно, контроль —  $24,6 \pm 0,9\%$  и  $22,6 \pm 1,8\%$  соответственно). В результате проведенных исследований установлено, что введение Т-зависимого антигена привело к увеличению количества цитотоксических Т-лимфоцитов в тимусе в процессе первичного иммунного ответа.



*Рис. 4. Динамика количества В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови в процессе первичного Т-зависимого иммунного ответа.*

На диаграмме (рис. 4) видно, что на 3-и сутки иммуногенеза содержание В-клеток в крови увеличилось более чем в 2,5 раза ( $55,0 \pm 1,4\%$ , контроль -  $22,1 \pm 0,9\%$ ). В селезенке число В-лимфоцитов на 3-и, 5-е и 7-е сутки также повысилось и составило  $52,0 \pm 2,4\%$ ,  $48,1 \pm 1,9\%$  и  $46,0 \pm 1,3\%$  (контроль -  $22,0 \pm 0,9\%$ ,  $18,0 \pm 1,4\%$ ,  $24,4 \pm 2,3\%$  соответственно). На 7-е сутки достоверно увеличилось содержание В-лимфоцитов в бурсе ( $56,2 \pm 1,7\%$ , контроль -  $30,0 \pm 1,4\%$ ). Таким образом, внутрибрюшинное введение Т-зависимого антигена вызывало активную пролиферацию В-лимфоцитов в селезенке, крови и бурсе, что коррелировало с уровнем IgY в крови в процессе первичного иммунного ответа (рис. 2).

В процессе вторичного иммунного ответа на Т-зависимый антиген наблюдали тенденцию к повышению уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови во все сутки исследования.

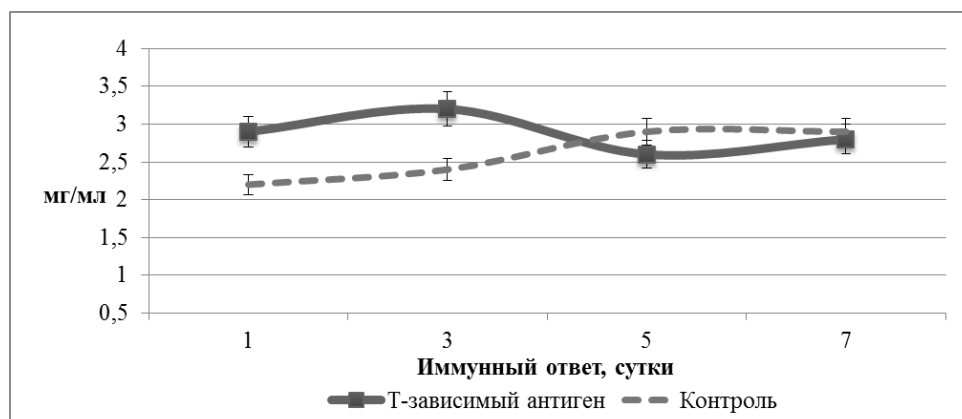
Таблица 1

**Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов,  $M \pm m$**   
(вторичный иммунный ответ на введение Т-зависимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	<b>36,0±0,9</b>	7,5±0,4	<b>38,0±1,6</b>	4,0±0,2
3	<b>20,1 ±1,7</b>	5,0±1,3	<b>30,0±0,9*</b>	7,2±1,6
5	<b>21,0±1,1</b>	9,0±1,6	<b>20,6±1,4</b>	5,1±0,2
7	<b>16,3±2,6</b>	1,9±0,3	<b>19,0±0,7</b>	3,0±0,1

Примечание: \* - значение достоверно по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

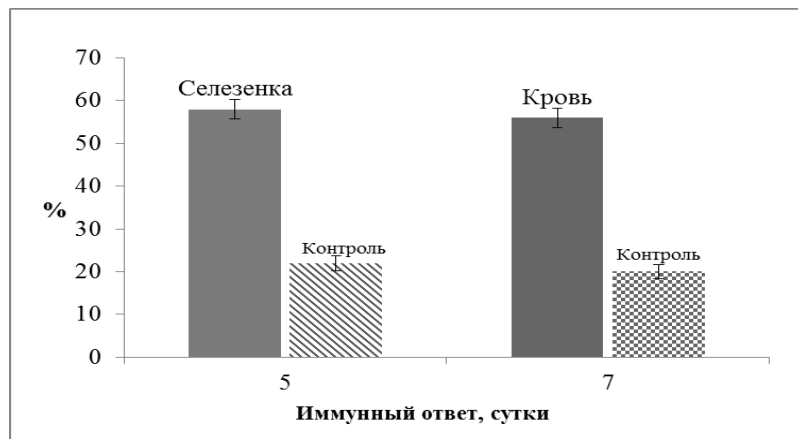
Согласно представленным данным (табл. 1) повторное введение антигена вызвало достоверное повышение фагоцитарной активности макрофагов на 3-и сутки иммуногенеза.



*Рис. 5. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур в процессе вторичного иммуногенеза.*

На графике (рис. 5) видно, что достоверных отличий от контрольной группы не наблюдали, но в 1-е и 3-и сутки иммунного ответа содержание иммуноглобулина Y повышалось по сравнению с контрольными значениями (1-е сутки – 2,9±0,08мг/мл, 3-и сутки – 3,1±0,07мг/мл, контроль -2,2±0,06мг/мл, 2,5±0,05мг/мл соответственно). Зарегистрировано достоверное повышение содержания Т-хелперов в селезенке и крови на 3-и сутки иммунного ответа (26,3±1,4% и 41,0±2,3% соответственно, контроль – 14,2±0,9% и 20,0±0,4%). На 5-е сутки достоверно повышалось содержание CD4-клеток в крови (20,6±0,9%, контроль - 9,0±1,4%). В остальные сутки исследования достоверных отличий от контрольной группы не наблюдали. Установлено, что введение Т-зависимого

антигена в первичном и вторичном иммуногенезе привело к увеличению цитотоксических Т-лимфоцитов в тимусе. Характер соотношения CD4- и CD8-клеток в 1-е и 3-и сутки иммунного ответа в крови и селезенке соответствовал уровню IgY в сыворотке крови кур.



*Рис. 6. Динамика числа В-лимфоцитов в селезенке и крови в процессе вторичного иммунного ответа.*

На диаграмме (рис. 6) видно, что на 5-е сутки исследования количество В-спленоцитов увеличились более чем в 2,5 раза ( $58,0 \pm 1,6\%$  контроль –  $22,0 \pm 1,6\%$ ), кроме того содержание В-лимфоцитов в крови на 7-е сутки также достоверно повышалось ( $56,0 \pm 2,8\%$ , контроль –  $20,0 \pm 1,5\%$ ).

#### **Динамика количественных показателей Т-независимого иммунного ответа у кур**

В процессе первичного иммуногенеза на введение Т-независимого антигена достоверных изменений в показателях лейкограммы не было, но наблюдалась тенденция к увеличению числа эозинофилов, псевдоэозинофилов и моноцитов.

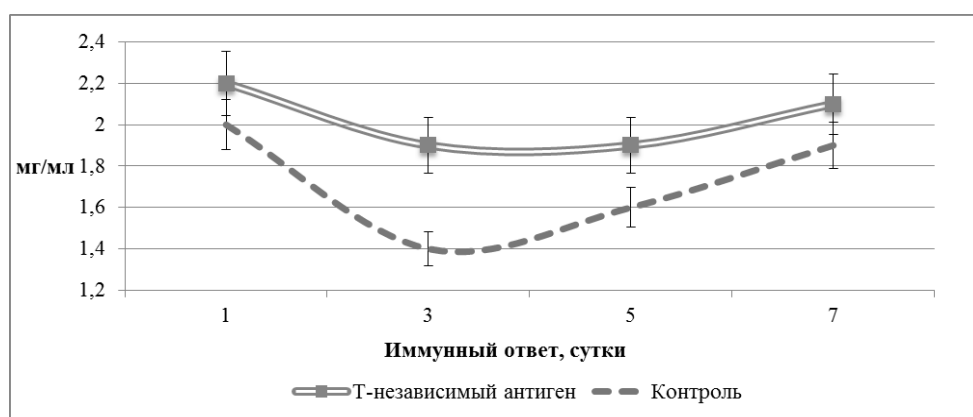
Индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов в опытной группе снижался в 1-е, 3-и, 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено перераспределением Т- и В-лимфоцитов во вторичные лимфоидные органы. Был вычислен коэффициент корреляции, отражающий взаимосвязь между лимфоцитами и псевдоэозинофилами. В процессе иммунного ответа коэффициент корреляции в контрольной группе составил  $-0,81$ , а в опытной группе  $-0,97$ . Отрицательные показатели коэффициента корреляции отражали обратную зависимость врожденных и адаптивных компонентов иммунной системы в ответ на введение Т-зависимого антигена.



Фагоцитарная активность лейкоцитов крови кур была выше по сравнению с контрольными значениями на всех этапах исследования. На 7-е сутки фагоцитарная активность клеток достоверно увеличилась по сравнению с контролем и составила  $50,0 \pm 5,4\%$  (контроль –  $34,0 \pm 2,2\%$ ).

Результаты исследования показали, что уровень фагоцитарной активности при введении Т-независимого антигена не снижался в течение 7-и суток исследования, что коррелировало с концентрацией IgY в сыворотке крови ( $r = 0,89$ ) в процессе первичного иммунного ответа (рис. 7).

Для оценки гуморального иммунного ответа на введение тимуснезависимого антигена определяли содержание IgY в сыворотке крови кур.



*Рис. 7. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови кур.*

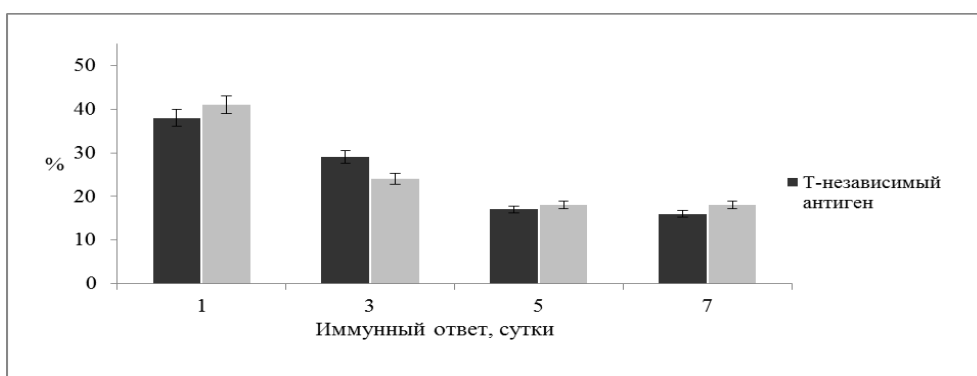
На графике (рис. 7) видно, что введение Т-независимого антигена не вызвало достоверного увеличения количества иммуноглобулина Y, но его содержание на 3-и, 5-е и 7-е сутки исследования было выше, чем контрольные показатели. Относительное содержание Т-клеток и их субпопуляций на 1-е сутки исследования повысилось в селезенке и крови. На 3-и сутки иммунного ответа эта тенденция сохранялась при достоверном увеличении общего числа Т-лимфоцитов и CD8-клеток в крови (Т-лимфоциты –  $52,6 \pm 2,9\%$ ; CD8-клетки –  $36,4 \pm 2,2\%$ , контроль –  $22,0 \pm 1,5\%$  и  $2,0 \pm 0,1\%$  соответственно). На 5-е сутки достоверно увеличивалось количество CD4-клеток в тимусе до  $19,7 \pm 2,2\%$  (контроль –  $7,0 \pm 0,2\%$ ). В результате проведенных исследований установлено, что введение поливинилпирролидона привело к увеличению цитотоксических Т-лимфоцитов в процессе первичного иммунного ответа в тимусе.

В селезенке и крови иммунорегуляторный индекс имел циклический характер, что связано с перераспределением иммунокомпетентных клеток из циркуляции во вторичные лимфоидные органы.

При определении относительного содержания В-лимфоцитов в органах иммунной системы и крови на 3-и сутки иммуногенеза достоверно увеличилось содержание В-спленоцитов ( $62,0 \pm 2,4\%$ , контроль –  $22,0 \pm 1,0\%$ ), при этом тенденция к увеличению сохранилась до 7-х суток иммунного ответа. В остальные сутки исследования достоверных различий в показателях опытной группы от контрольной не было.

Таким образом, введение Т-независимого антигена в процессе первичного иммунного ответа не вызвало достоверных изменений показателей лейкограммы, но способствовало активации лейкоцитов крови и макрофагов в течение 7-и суток первичного иммунного ответа.

Введение Т-независимого антигена не вызвало достоверных увеличений в лейкограмме. Индекс соотношения лимфоцитов и псевдоэозинофилов опытной группы был ниже в 3-и, 5-е и 7-е сутки иммунного ответа по сравнению со значениями контрольной группы, что обусловлено увеличением количества клеточных факторов врожденного звена иммунитета. Повышение степени выраженности корреляции показателей обусловлено воздействием антигена.



*Рис. 8.  
Показатели уровня фагоцитарной активности в процессе вторичного иммунного ответа.*

На диаграмме (рис. 8) видно, что введение антигена способствовало повышению уровня фагоцитарной активности лишь на 3-и сутки иммунного ответа, в остальной период исследования его значения не превышали контрольных. Была установлена взаимосвязь между уровнем фагоцитарной активности лейкоцитов крови и содержанием IgY в сыворотке крови ( $r = - 0,57$ ),

которая показывает, что снижение активности лейкоцитов соответствует повышению концентрации IgY (рис. 7).

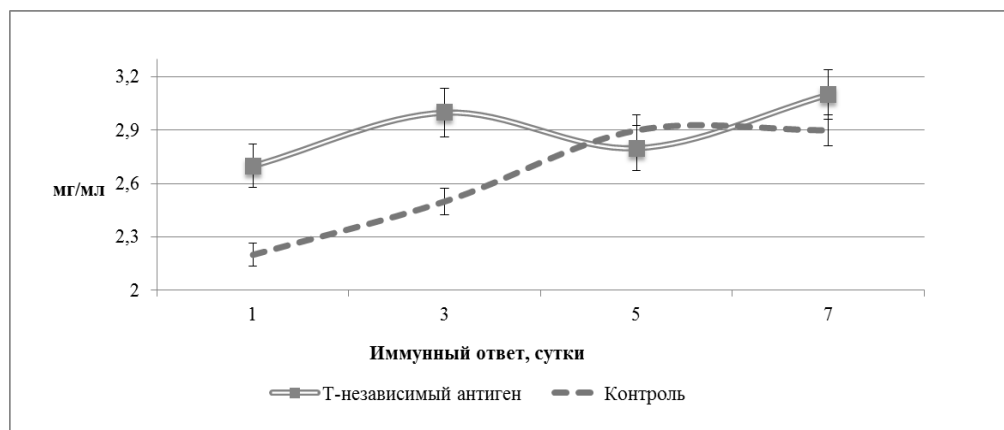
Таблица 2

**Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов,  $M \pm m$**   
(вторичный иммунный ответ на введение Т-независимого антигена)

Сутки иммунного ответа	Контроль (n=20)		Опыт (n=20)	
	ФА, %	ФЧ, ч.л.	ФА, %	ФЧ, ч.л.
1	36,0±0,9	7,5±0,4	25,4±0,9	5,0±1,1
3	20,1 ±1,7	5,0±1,3	32,4±0,7*	6,3±2,0
5	21,0±1,1	9,0±1,6	30,3±1,4*	3,7±0,6
7	16,3±2,6	1,9±0,3	20,0±1,2	5,0±0,4

Примечание: \* - значение достоверно по сравнению с контролем при  $p < 0,05$ .

Согласно данным (табл. 2) повторное введение антигена вызвало активацию макрофагов на 3-и и 5-е сутки иммунного ответа ( $32,4 \pm 0,7\%$  - на 3-и сутки,  $30,3 \pm 1,4\%$  - на 5-е сутки; контроль -  $20,1 \pm 1,7\%$  и  $21,0 \pm 1,1\%$  соответственно). В остальной период исследования достоверных отличий от контрольной группы не было.



*Рис. 9. Динамика количественного содержания IgY в сыворотке крови в процессе вторичного иммуногенеза.*

На графике (рис. 9) отражены изменения количества IgY при повторном введении Т-независимого антигена. Достоверных отличий от контрольной группы не наблюдалось, но в 1-е и 3-и и 7-е сутки иммунного ответа отмечалось незначительное повышение содержания иммуноглобулина Y по сравнению с контрольными значениями. Это свидетельствует об участии Т-клеточных факторов в развитии иммунного ответа на Т-независимый антиген 2 типа.

На 1-е сутки иммунного ответа наблюдалось достоверное повышение общего количества Т-лимфоцитов, CD4- и CD8-клеток в крови ( $50,8 \pm 2,6\%$ ;

32,5±0,9%; 18,3±1,7% соответственно, контроль — 16,0±1,2%, 12,5±1,0% и 3,5±0,1%). На 3-и сутки иммунного ответа достоверно повышалось содержание Т-хелперов в селезенке, которое увеличилось более чем в 2 раза (32,0±2,3%, контроль — 14,2±0,9%) и в крови (47,5±2,8%; контроль – 20,0±0,4%). На 3-и сутки иммунного ответа увеличилось число В-спленоцитов и составило 52,0±1,6% (контроль – 22,3±0,9%), на 5-е и 7-е сутки тенденция увеличения сохранялась.

### Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток и уровня IgY в процессе иммунного ответа на живую вакцину против ИБК

Для проведения исследований использовали живую сухую вакцину против ИБК из штамма «Н-120». Нами был выбран способ окулярного введения вакцины, который проводили по предложенной методике согласно инструкции.

Таблица 3

#### Показатели лейкоцитарной формулы крови цыплят при окулярном методе введения живой вакцины, M±m (первичный иммунный ответ)

Показатели	Контроль (n=20)				Опыт (n=20)			
	Сутки иммунного ответа							
	1	3	5	7	1	3	5	7
Базофилы, %	0,0	0,2±0,04	0,0	0,0	0,4±0,04	0,0	0,2±0,04	0,0
Эозинофилы, %	6,4±0,7	3,0±0,6	6,6±0,7	6,0±0,8	8,5±0,3	1,3±0,3	6,4±0,6	8,3±0,9
Псевдоэозинофилы, %	19,0±2,4	14,8±1,7	21,6±1,9	13,2±2,0	16,0±1,8	12,0±1,9	14,0±2,5	16,0±1,7
Моноциты, %	3,0±0,3	2,4±0,6	4,4±0,8	6,6±1,0	<b>14,7±1,6*</b>	<b>10,0±0,8*</b>	7,3±2,1	7,6±0,8
Лимфоциты, %	71,6±2,1	79,6±0,4	67,4±2,3	74,2±2,5	60,4±0,2	76,7±1,2	73,4±2,1	66,1±2,9
Коэффициент корреляции, r (Л/ПЭ)	-0,81				-0,79			
Л/ПЭ	3,8	5,4	3,1	5,6	3,8	6,4	5,2	3,7

Примечание: r-коэффициент корреляции, \* - значение достоверно по сравнению с контролем при p<0,05.

Из данных таблицы 3 видно, что количество моноцитов достоверно увеличивалось на 1-е и 3-и сутки первичного иммунного ответа (1-е сутки - 14,7±1,6%; 3-и сутки - 10,0±0,8%; контроль - 3,0±0,3% и 2,4±0,6% соответственно). В последующие сутки первичного и вторичного иммуногенеза среди показателей лейкограммы достоверных отличий от контроля обнаружено не было. Определение уровня фагоцитарной активности лейкоцитов крови кур показало, что на 1-е сутки первичного и вторичного иммунного ответа значения в опытной группе были выше контрольной (1-е сутки первичного иммуногенеза –

54,0±1,3%, контроль – 45,0±0,9%, 1-е сутки вторичного иммуногенеза – 48,7±0,7%, контроль – 41,0±0,4%). Такая динамика подтверждает, что клетки врожденной иммунной системы, а именно псевдоэозинофилы, активируются только в течение первых суток первичного и вторичного иммунного ответа.

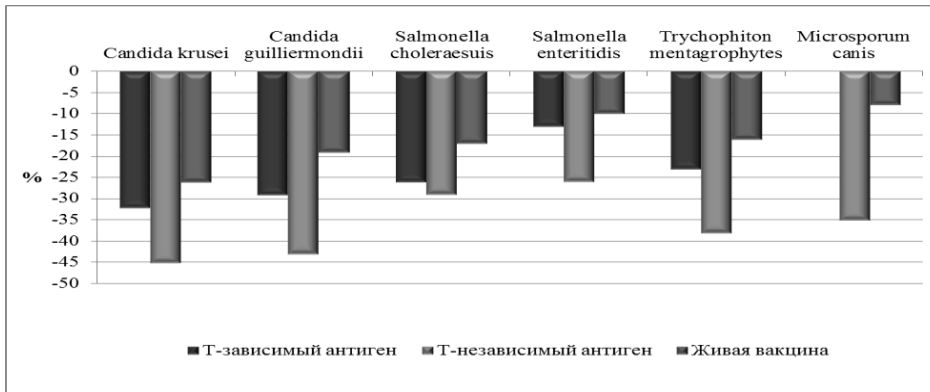
Уровень фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов был достоверно выше на 5-е сутки первичного иммунного ответа и составил 65,0±2,0% (контроль – 50,2±1,0%). По-видимому, в данный период произошла активация макрофагов не только как фагоцитирующих клеток, но и как антигенпрезентирующих. Определение количественного содержания иммуноглобулина Y в сыворотке крови цыплят на введение живой вакцины выявило его достоверное повышение на 3-и сутки иммунного ответа (3,0 мг/мл, контроль – 1,4 мг/мл). В остальные сутки исследования первичного и вторичного иммуногенеза достоверных различий в показателях опытной группы по сравнению с контрольной не наблюдали.

В результате проведенных исследований установлено, что число цитотоксических Т-лимфоцитов увеличивалось в процессе первичного и вторичного иммунного ответа в тимусе, что связано с презентацией вирусных антигенов. В селезенке в процессе первичного иммунного ответа установлены циклические изменения числа CD8- и CD4-клеток, что обусловлено функциональными особенностями вторичных лимфоидных органов. А во вторичном иммуногенезе в селезенке преобладали CD4-клетки, что связано с процессом антителообразования. Динамика Т-хелперов в крови коррелировала с уровнем IgY в сыворотке крови.

### **Функциональная активность компонентов иммунной системы под влиянием метаболитов микроорганизмов в процессе иммуногенеза**

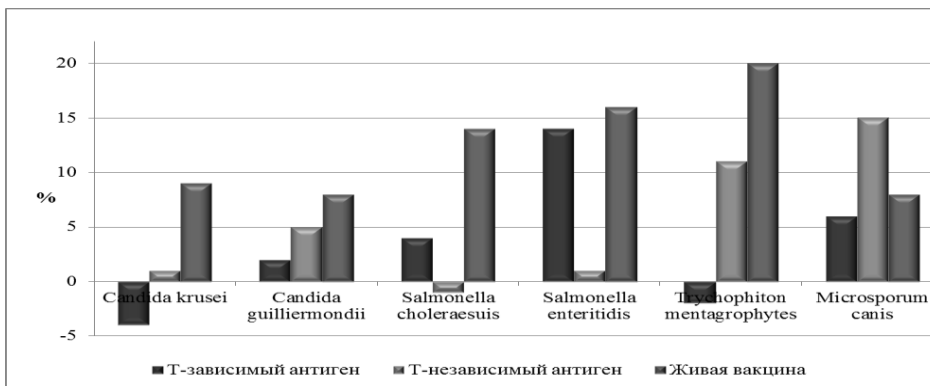
Были определены уровни функциональной активности иммунокомпетентных клеток и иммуноглобулина Y в процессе иммунного ответа под влиянием метаболитов микроорганизмов.

Первичный иммуногенез на все типы антигенов характеризовался различной фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и рецепторной способностью Т-спленоцитов.



*Рис. 10.  
Фагоцитарная  
активность  
лейкоцитов крови под  
влиянием  
метаболитов в  
процессе первичного  
иммунного ответа.*

На 1-е, 5-е и 7-е сутки (рис.10) первичного иммунного ответа метаболиты микроорганизмов, в большей степени кандид и сальмонелл, угнетали фагоцитарную активность лейкоцитов крови. При вторичном иммунном ответе супрессивное влияние различной степени наблюдалось только при взаимодействии с метаболитами патогенных грибов рода *Candida*.



*Рис. 11.  
Рецепторная  
способность  
T-лимфоцитов  
селезенки на 7-е сутки  
первичного иммунного  
ответа.*

На 1-е сутки первичного иммунного ответа рецепторная способность T-спленоцитов была более подвержена супрессивному влиянию метаболитов возбудителей трихофитии и микроспории, а на 7-е сутки (рис.11) наблюдалась стимуляция адгезивной активности T-клеток селезенки под влиянием всех изучаемых метаболитов.

В результате проведенных исследований установлена обратная взаимосвязь между фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и адгезивной способностью T-спленоцитов на 7-е сутки первичного иммуногенеза при инкубации с метаболитами всех изучаемых микроорганизмов. Это связано с тем, что структурные компоненты иммунной системы при воздействии антигенов распределяют функциональную нагрузку неодинаково в зависимости от особенностей антигена.

## Показатели иммунного ответа на введение антигенов в процессе первичного иммуногенеза

Антигены Показатели иммунного ответа	Т-зависимый антиген	Т-независимый антиген	Живая вакцина
Лейкоцитарная формула	Увеличение числа псевдозозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдозозинофилов и моноцитов	Достоверное увеличение моноцитов на 1-е и 3-и сутки (1-е сутки - $14,7 \pm 1,6\%$ ; 3-и сутки - $10,0 \pm 0,8\%$ ; в контроль - $3,0 \pm 0,3\%$ и $2,4 \pm 0,6\%$ соответственно)
Фагоцитарная активность лейкоцитов крови	Увеличение активности на 1-е сутки, далее снижение показателей	Увеличение активности во все сутки исследования	Увеличение активности только на 1-е сутки исследования
Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов	Не повышалась по сравнению с контрольными значениями, но фагоцитарное число было достоверно выше в 1-е сутки ( $15,0 \pm 0,4\%$ , контроль - $6,2 \pm 1,2\%$ ) и сохраняло тенденцию к увеличению в остальные сутки исследования	Тенденция к увеличению во все сутки исследования	Достоверное увеличение на 5-е сутки ( $65,0 \pm 2,0\%$ , контроль - $50,2 \pm 1,0\%$ ), в остальные сутки исследования показатели не превышали контрольных значений
Содержание IgY в сыворотке крови	Достоверно выше на 3-и сутки исследования ( $3,1$ мг/мл, контроль – $1,4$ мг/мл)	Достоверного повышения показателей нет	Достоверно выше на 3-и сутки исследования ( $3,0$ мг/мл, контроль – $1,4$ мг/мл)
Т-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Повышение общего числа тимоцитов, преобладание CD8-клеток в тимусе во все сутки исследования и увеличение CD4-клеток в крови и селезенке на 3-и сутки исследования	Преобладание CD8-клеток в тимусе. Соотношение CD4- и CD8-клеток в селезенке и крови аналогично на 1-е и 3-и сутки исследования	Повышение общего числа тимоцитов. Наблюдалось выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. На 3-и сутки в крови достоверно увеличивалось число CD4-клеток, на 1-е сутки - в селезенке
В-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке на 3-и, 5-е и 7-е сутки, в крови – на 3-и сутки и в бурсе – на 7-е сутки исследования	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке на 3-и сутки исследования	Достоверное увеличение В-спленоцитов в селезенке на 3-и, 5-е и 7-е сутки, в крови достоверное увеличение на 3-и, в бурсе - на 5-е и 7-е сутки иммунного ответа

**Показатели иммунного ответа на введение антигенов в процессе вторичного иммуногенеза**

Антигены Показатели иммунного ответа	Т-зависимый антиген	Т-независимый антиген	Живая вакцина
Лейкоцитарная формула	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов	Увеличение числа псевдоэозинофилов и моноцитов
Фагоцитарная активность лейкоцитов крови	Увеличение активности во все сутки исследования	Увеличение активности только на 3-и сутки, в остальные сутки исследования значения не превышали контрольных	Увеличение на 1-е сутки, в остальные сутки исследования значения не превышали контрольных
Фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов	Достоверное увеличение на 3-и сутки (30,0±0,9%, контроль - 20,1 ±1,7%), в остальные сутки исследования значения были выше контрольных	Достоверное увеличение на 3-и и 5е сутки исследования (32,4±0,7% - на 3-и сутки, 30,3±1,4 – на 5-е сутки; контроль -20,1 ±1,7% и 21,0±1,1% соответственно)	Тенденция к увеличению во все сутки исследования
Содержание IgY в сыворотке крови	Тенденция к повышению на 1-е и 3-и сутки исследования	Тенденция к повышению на 1-е и 3-и сутки исследования	Достоверного повышения концентрации IgY нет
Т-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Преобладание CD8-клеток в тимусе, увеличение CD4-клеток в селезенке на 3-и сутки, в крови - на 3-и и 5-е сутки исследования	Менее выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. Количество CD4-клеток в селезенке и крови преобладают на 1-е и 3-и сутки исследования	Выраженное преобладание CD8-клеток в тимусе. В крови и в селезенке преобладали CD4-клетки
В-лимфоциты в органах иммунной системы и крови	Достоверное увеличение В-лимфоцитов в селезенке и крови на 5-е сутки исследования	Достоверное увеличение В-спленоцитов в селезенке на 3-и сутки	Достоверного повышения концентрации IgY нет



## ВЫВОДЫ

1. Определены иммунохимические свойства иммуноглобулина класса Y, выделенного из сыворотки крови и желтка яиц кур. По данным электрофоретического анализа установлено, что сывороточный и желточный IgY имеют молекулярную массу 180 кДа.
2. Получена моноспецифическая антисыворотка к IgY, выделенному из сыворотки крови кур для количественного определения данного иммуноглобулина в реакции иммунодиффузии (титр 1:16).
3. Дана количественная характеристика и установлена различная динамика иммунологических показателей в процессе T-зависимого и T-независимого иммунного ответа у кур при сохранении основных иммунологических критериев функционирования иммунной системы животных (отрицательная корреляция между показателями лимфоцитов и псевдоэозинофилов при введении T-зависимого антигена  $r = - 0,97$  и  $- 0,93$  в процессе первичного и вторичного иммуногенеза, при введении T-независимого антигена  $r = - 0,82$  и  $- 0,98$  соответственно).
4. Определены показатели иммунного ответа на введение живой вакцины и установлено, что они коррелируют с параметрами иммунного ответа на T-зависимый антиген, несмотря на различие путей их презентации антигенпредставляющими клетками (экзогенный и эндогенный пути).
5. Установлено, что максимальный уровень IgY в сыворотке крови на T-зависимые антигены (эритроциты барана и аттенуированный вирус) регистрируется на 3-и сутки иммунного ответа (3,1 мг/мл и 3,0 мг/мл соответственно, контроль - 1,4 мг/мл), что отличается от динамики антителообразования при T-независимом иммунной ответе.
6. Показано, что в процессе вторичного T-независимого иммунного ответа у кур повышается содержание IgY в сыворотке крови, что косвенно свидетельствует об участии T-клеточных факторов (3-и сутки  $-3,0 \pm 0,09$  мг/мл, контроль  $-2,5 \pm 0,04$  мг/мл соответственно) в иммуногенезе.

7. Определено, что метаболиты патогенных грибов рода *Candida* наиболее супрессивно влияют на преципитирующие свойства IgY, фагоцитарную активность лейкоцитов крови и рецепторную способность Т-спленоцитов кур по сравнению с метаболитами дерматофитных грибов *Trichophyton* и *Microsporum* и бактерий рода *Salmonella*.

8. На 7-е сутки первичного иммунного ответа на все типы изучаемых метаболитов установлена обратная взаимосвязь между фагоцитарной активностью лейкоцитов крови и адгезивной способностью Т-спленоцитов, что связано с конституционными закономерностями распределения функциональной нагрузки иммунной системой.

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Разработаны методические положения по получению моноспецифической антисыворотки к IgY кур.

РИД с использованием моноспецифических антисывороток может быть рекомендована в качестве метода оценки эффективности профилактических препаратов, а также возрастной динамики становления гуморального звена иммунитета у птицы в онтогенезе.

Для клинических исследований предлагается методический подход к оценке поствакцинального иммунного ответа у кур. Этот методический подход заключается в определении соотношения псевдоэозинофилов и лимфоцитов ( $r < - 0,5$ ) и в дифференцированном анализе показателей иммунного ответа на различных этапах его развития. Показана возможность использования данного подхода на примере живой вирус-вакцины для оценки поствакцинального иммунного ответа у кур.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ездакова И.Ю., Гончарова И.С., Ефремова М.С. Эволюционные аспекты развития иммунной системы животных //Мат. конф. «Актуальные проблемы инфекционных болезней молодняка и других возрастных групп

- сельскохозяйственных животных, рыб и пчел»: Сб. науч. тр.-М: ВИЭВ. -2011.- С.249-251.
2. Ездакова И.Ю. Количественная характеристика иммунокомпетентных клеток кур в процессе поствакцинального иммунного ответа/И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова // Ветеринария и кормление. -2013.-№1.-С.28-29.
  3. Методические основы получения иммуноглобулинов животных/И.Ю. Ездакова, Т.А. Чеботарева, М.С. Ефремова, И.С. Гончарова, В.Г. Окунева, Е.В. Попова// Ветеринария и кормление. - 2013. -№4.-С.32-33.
  4. Ефремова М.С. Выделение иммуноглобулина Y из сыворотки крови кур и желтка яиц /М.С. Ефремова/ Мат. конф. «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России» //Ветеринария и кормление. - 2013.-№4.-С.34-35.
  5. Диагностические критерии оценки состояния иммунной системы быков-производителей/ Ездакова И.Ю., Еремина М.А., Ефремова М.С., Фёдорова Е.В.// Ветеринария и кормление. -2014.-№2.- С.10-12.
  6. Ефремова М.С. Иммуногематологические показатели крови кур в процессе поствакцинального иммунного ответа / М. С. Ефремова /Мат. конф. «Достижения молодых ученых в ветеринарную практику» // Ветеринария и кормление. - 2012. - № 5. - С. 12-13.
  7. Ездакова И.Ю. Динамика уровня IgY в сыворотке крови кур в процессе иммуногенеза/ И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова// Мат. конф. «Ветеринарная наука в промышленном птицеводстве», посвященной 50-летию со дня основания ГНУ ВНИВИП, 30-31 октября 2014 года.-ВНИВИП, 2014. - С. 60-62.
  8. Ездакова И.Ю. Сравнительная характеристика показателей иммунного ответа на Т-зависимый и Т-независимый антигены у кур/И.Ю. Ездакова, М.С. Ефремова// Ветеринария и кормление. -2014.-№ 5.- С. 74-75.
  9. Ездакова И.Ю. Корреляции параметров иммунного ответа у мышей при подкожном и пероральном методах иммунизации/И.Ю. Ездакова, М.Н. Лощинин, М.С. Ефремова//Аллергология и иммунология. -2014. -Том 15, №3.- С. 225-226.