

## AVISALMVAC: STUDII DE EVALUARE A STABILITĂȚII ȘI A TOXICITĂȚII

### AVISALMVAC: EVALUATION STUDIES OF STABILITY AND TOXICITY

Daniela Botuș, Virgilia Popa, E. Bucur, E. Caplan, M. Pirvulescu, C. Belteghi, F. Pastrama  
SN Institutul Pasteur SA

**Cuvinte cheie:** Salmonella, pasari, vaccin, ELISA, MTT, histologie

**Key words:** Salmonella, poultry, vaccine, ELISA, MTT, histology

#### Rezumat

În laboratoarele SN Institutul Pasteur a fost dezvoltat vaccinul AVISALMVAC contra salmonelozelor aviare, un produs biologic ce conține bacterina *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, cu adjuvant uleios. Lucrarea de față prezintă rezultatele studiilor privind evaluarea stabilității și toxicității acestui vaccin păstrat în condițiile recomandate de producător (2-8°C), la sfârșitul perioadei de valabilitate. Stabilitatea vaccinului Avisalmvac a fost evaluată prin analiza serologică și histopatologică a probelor provenite de la păsări SPF vaccinate cu produsul aflat la sfârșitul perioadei de valabilitate. Studiul toxicității vaccinului Avisalmvac s-a realizat prin inocularea produsului ca atare sau a componentelor acestuia pe monostrat celular Vero, la momentul pasării celulelor sau după constituirea monostratului celular, iar evaluarea efectelor a fost înregistrată microscopic sau prin testul MTT, aplicat la 6 zile post-inoculare. Valorile titrurilor serologice înregistrate la 2 și 3 săptămâni post vaccinare demonstrează capacitatea vaccinului Avisalmvac (utilizat la un an de la fabricare) de a induce sinteza anticorpilor specifici și deci, în acest mod, este dovedită stabilitatea preparatului. Examenele histopatologice realizate pe probe prelevate de la locul de vaccinare (mușchi scheletic și piele) și splină la 18 zile post vaccinare, nu au relevat niciun aspect lezional asociat vaccinării cu acest produs. În testele de citotoxicitate prin punerea în contact a vaccinului / componentelor vaccinale cu monostratul celular Vero deja constituit, la examenul microscopic (figura 10) nu au fost înregistrate efecte citopatice vizibile, la niciuna dintre diluții sau componente vaccinale. Testul de evaluare a metabolismului celular cu MTT practicat la 6 zile de la inocularea produsului / componentelor vaccinale pe monostratul celular Vero deja constituit a evidențiat capacitatea vaccinului și a adjuvantului uleios de a stimula metabolismul celular, și un oarecare grad de toxicitate / inhibiție a metabolismului dehidrogenazic asociat unuia dintre emulgatori, dar la diluții mai mari decât cele folosite în formula vaccinală.

#### Abstract

In Pasteur Institute laboratories there was developed AVISALMVAC, a vaccine against avian Salmonella, a biological product that contains *S. enteritidis* and *S. typhimurium* bacterin, with oil adjuvant. This paper presents the results of the studies regarding the stability and toxicity evaluation of this vaccine stored under conditions recommended by the manufacturer (2-8°C) at the end of the period of validity. The vaccine stability was assessed by serological and histopathological analysis of samples from SPF chickens vaccinated with the product at the end of the period of validity. The study of Avisalmvac toxicity was carried out by inoculation of the product or its components on Vero cell monolayer, and the effects were microscopically recorded or by MTT test, applied at 6 days post-inoculation. Antibody titers recorded at 2 and 3 weeks post vaccination demonstrated the vaccine ability (used after an year since manufacture) to induce synthesis of specific antibodies and therefore, the product stability was proven. Histopathological examinations carried out on samples taken at 18 days post vaccination from the vaccination site (skeletal muscle and skin) and spleen, did not show any lesions associated to vaccination with Avisalmvac. The cytotoxicity analysis made by inoculating the vaccine or its components on Vero cell monolayer and the microscopic examination did not record visible cytopathic effects for any vaccine dilutions or vaccine components. The cell metabolism evaluation by MTT assay made at 6 days after vaccine / vaccine components inoculation on Vero monolayer, shown the ability of the vaccine and oil adjuvant to stimulate cell metabolism, and a certain degree of toxicity / inhibition of dehydrogenase metabolism associated to one of emulsifier but at dilutions higher than those used in the vaccine formula.

Printre infecțiile bacteriene întâlnite la păsări, salmonelozele (paratifozele asociate cel mai frecvent cu *Salmonella enteritidis* și *S. typhimurium* și tifo-puloroza, asociată serovarului *S. gallinarum - pullorum*) reprezintă una dintre cauzele principale ale morbidității și mortalității, fiind responsabile de pierderi economice semnificative (de la 20% până la 100%), în regiunile unde industria avicolă este o producție economică majoră

și ocupă un loc important pe piața alimentară. Infecțiile salmonelice sunt înscrise în lista unică de boli al căror control este reglementat de Oficiul Internațional de Epizootii și fac obiectul unor directive și programe europene specifice, care impun monitorizarea fermelor de creștere a păsărilor incluse în lanțul alimentar, așa cum este prevăzut și în Programul strategic al acțiunilor sanitare veterinare din România. Paratifozele

reprezintă de asemenea o gravă problemă de sănătate publică, deoarece ocupă primul loc între toxi-infecțiile de origine alimentară înregistrate la om, dintre care mai mult de o treime s-au datorat consumului de carne de pasăre sau ouă contaminate cu tulpini de *Salmonella*.

Una dintre "armele" tradiționale contra bolilor infecțioase majore este reprezentată de vaccinuri.

În acest sens, în laboratoarele Institutului Pasteur a fost dezvoltată o metodologie vaccinală destinată controlului infecțiilor salmonelice la păsări [8].

Vaccinul, denumit **Avisalmvac**, este un vaccin inactivat adjuvantat cu ulei mineral (Drakeol 5LT) ce conține bacterină de *S. enteritidis* (tulpina 13a) și *S. typhimurium* (tulpina 504) (min.  $10^9$  UFC/doză) obținută în condiții favorabile expresiei receptorilor chelatorilor de fier, acest vaccin fiind recomandat în profilaxia specifică salmonelozelor aviare asociate tulpinilor de *S. enteritidis* și *S. typhimurium* [2,6,7].

Lucrarea de față prezintă rezultatele studiilor privind evaluarea stabilității și toxicității acestui vaccin păstrat în condițiile recomandate de producător ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ), la sfârșitul perioadei de valabilitate.

## MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul toxicității vaccinului Avisalmvac s-a realizat prin inocularea produsului ca atare sau a componentelor acestuia pe monostrat celular Vero, la momentul pasării celulelor sau după constituirea monostratului celular, iar evaluarea efectelor a fost înregistrată microscopic sau prin testul MTT, aplicat la 6 zile post-inoculare (figura 8).



**Fig. 8. Tesarea de citotoxicitate la Alvisalmvac**  
Vaccin integral sau componente vaccinale (pe placa de 96 de godeuri și substrat celular Vero).

Stabilitatea vaccinului Avisalmvac a fost evaluată prin analiza serologică și histopatologică a probelor provenite de la păsări SPF vaccinate cu produsul aflat la sfârșitul perioadei de valabilitate.

## Examenle serologice

Experimentul s-a realizat pe un lot de 20 de păsări SPF în vârstă de 2 luni, ce au fost vaccinate intramuscular cu vaccin Avisalmvac, 0,5 ml/pasăre.

Pentru compararea rezultatelor, s-a constituit și un lot martor de 10 păsări nevaccinate.

Au fost prelevate probe de ser de la ambele loturi înainte de vaccinare (moment 0), și la 2 și 3 săptămâni post-vaccinare.

La 3 săptămâni de la vaccinare, s-a realizat infecția de control: 10 din păsările vaccinate au fost inoculate cu *S. enteritidis*, tulpina 13a, iar celelalte 10 păsări au fost inoculate cu *S. typhimurium*, tulpina 504.

În paralel, au fost constituite două loturi martor a câte 5 păsări nevaccinate, ce au fost inoculate în mod similar cu *S. enteritidis*, tulpina 13a, respectiv *S. typhimurium*, tulpina 504.

Au fost prelevate probe de ser de la cele 4 loturi la 7 zile post - infecție de control.

Au fost realizate examene serologice ce au vizat detecția anticorpilor anti *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, utilizându-se truse comerciale ELISA varianta indirectă (ELISalmonella E și ELISalmonella T, SN Institutul Pasteur) [9].

Nivelul anticorpilor specifici s-a estimat în raport cu serurile de referință livrate în fiecare trusă.

Interpretarea rezultatelor s-a realizat cu ajutorul software-ului UNIVET care a permis calcularea procentului de pozitivitate (S/P), a unităților ELISA (UE) și a titrului pentru fiecare probă în parte, precum și calcularea titrului mediu/efectiv.

Conform instrucțiunilor de utilizare a truselor, valoarea de pozitivare a titrului a fost 400, un titru mai mic de 400 indicând un rezultat negativ.

## Examenle histopatologice

S-au efectuat examene microscopice ale mușchiului scheletic, pielii și splinei de la păsări vaccinate cu vaccin uleios

Avisalmvac și sacrificate la 18 zile post-vaccinare.

S-au prelevat fragmente de mușchi scheletic (mușchiul pectoral, mușchiul gambei și mușchiul cervical dorsal) și piele de la locul de inoculare și splină, examinându-se 50 de preparate histologice.

Fixarea preparatelor s-a făcut în formaldehidă neutră 10%, incluzia în parafină, secționarea la 5μm, iar colorarea secțiunilor prin metoda tricromică Masson (HEA).

### Examenele de citotoxicitate

Au fost efectuate trei tipuri de teste de citotoxicitate, realizate pe plăci cu 96 de godeuri (unul în momentul pasării celulelor Vero și două prin inoculare pe monostratul celular de 24 de ore, iar la unul dintre acestea din urmă a fost aplicat testul colorimetric MTT). În testul realizat la momentul pasării celulelor (11700 celule / 50μl / godeu), vaccinul a fost pus în contact în diluțiile 3/4, 1/2, 1/4 și 1/8; adjuvantul uleios (Drakeol), în amestec conform proporțiilor din vaccin cu celelalte componente cu rol adjuvant (Tween 20 - 5% și Span 80-3%), a fost pus în contact în diluțiile 1/1, 1/2, 1/4 și 1/8.

În testul realizat pe monostratul celular constituit (la 24 de ore de la pasare), vaccinul și amestecul adjuvant au fost puse în cantitate de 150 μl / godeu din diluțiile menționate mai sus, în locul mediului pentru culturi celulare.

**Testul MTT** (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Descriș prima dată în 1983 de către Mosmann este un test care analizează metabolismul celular și care se bazează pe capacitatea dehidrogenazelor mitocondriale din celulele viabile de a cliva inelele de tetrazolium din MTT (galben) și de a forma cristale de formazan (albastru închis) care sunt impermeabile pentru membrana celulară și astfel se vor acumula în interiorul celulelor sanatoase.

Solubilizarea celulelor prin adăugarea unui detergent determină eliberarea cristalelor care apoi sunt la rândul lor solubilizate într-o soluție colorată. Culoarea poate fi apoi cuantificată prin utilizarea unui test colorimetric, iar rezultatele pot fi citite spectrofotometric la un cititor ELISA [3,5].

Testul de citotoxicitate bazat pe aprecierea activității dehidrogenazelor prin test colorimetric (având ca substrat MTT, sarea de tetrazolium) s-a realizat pe plăci cu 96 de godeuri cu monostrat celular Vero care s-au inoculat cu câte 200μl/godeu din amestecuri în proporții egale de mediu MEM și diluții din produsele de testat, în așa fel ca diluțiile finale de vaccin sau componente vaccinale să fie de 1/10, 1/100, 1/1000 și respectiv 1/2000 [1,4].

Eventualele efecte citopatice au fost urmărite la microscopul răversat iar cele metabolice au fost apreciate la 6 zile prin testul MTT: s-au îndepărtat 100 μl de supernatant, s-au adăugat 10 μl soluție MTT (5mg/ml PBS), apoi plăcile au fost incubate 1h la 37°C, în atmosferă cu 5% CO<sub>2</sub>; reacția a fost stopată cu 100 μl din amestecul de izopropanol/acid clorhidric (14:1), cu agitare timp de 30' la RT°C.

Citirea valorilor de absorbantă a fost realizată la lungimea de undă de 540 nm.

Rezultatele obținute au fost interpretate prin diferența de absorbantă între probele testate și martorul celular, prin aplicarea formulei:

$$\% C = (1 - S/P) \times 100$$

sau a formulei

$$\% C = (1 - [(OD \text{ efector} + \text{tinta}) - OD \text{ efector}] / OD \text{ tinta}) \times 100$$

(Zhu 2005),

iar analiza statistică a fost efectuată prin testul **Anova** (MS Excel).

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

În laboratoarele SN Institutul Pasteur a fost dezvoltat vaccinul AVISALMVAC contra salmonelozelor aviare, un produs biologic ce conține bacterina *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, cu adjuvant uleios.

În vederea evaluării stabilității și toxicității acestui vaccin, au fost realizate experimente pe păsări SPF ce au fost inoculate cu o șarjă de vaccin aflată la sfârșitul perioadei de valabilitate, stocată în condițiile indicate de producător (2-8°C).

### Evaluarea stabilității

#### Analiza serologică

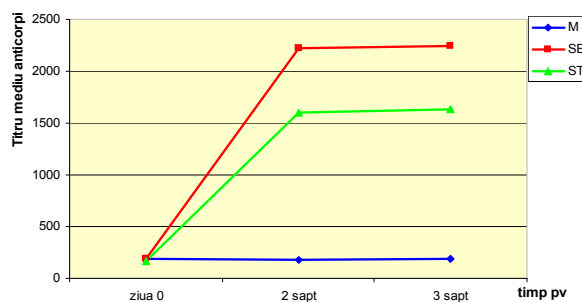
Au fost analizate probe de ser recoltate de la păsări SPF ce au fost vaccinate cu

Avisalmvac, în paralel cu un lot martor de păsări nevaccinate, în vederea detectării anticorpilor specifici *S. enteritidis* și *S. typhimurium*.

Au fost determinate titrul de anticorpi pentru fiecare probă testată și titrul mediu / lot. Distribuția în dinamică a titrurilor medii ale anticorpilor specifici *S. enteritidis* și *S. typhimurium* este redată în figura 1.

Analizând figura 1, se poate observa că înainte de vaccinare, pentru ambele loturi de păsări testate nu s-au detectat anticorpi anti *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, probele fiind deci negative.

Păsările din lotul martor au rămas negative pe toată perioada testărilor.



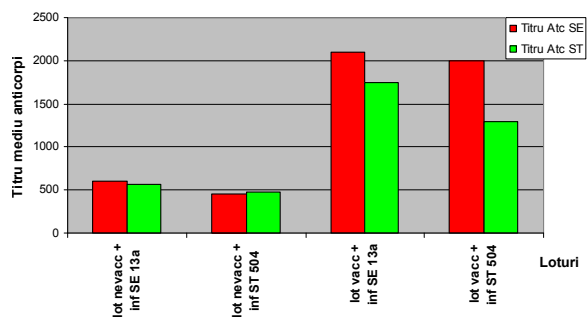
**Fig. 1. Dinamica răspunsului imun umoral pentru *S. enteritidis* și *S. typhimurium***

ELISA (ELISalmonella E și ELISalmonella T). **M** – titru anticorpi pentru lotul martor păsări nevaccinate; **SE** – titru anticorpi anti *S. enteritidis* și **ST** – titru anticorpi anti *S. typhimurium* pentru lotul de păsări vaccinat cu Avisalmvac

În schimb, pentru lotul de păsări vaccinate cu vaccin Avisalmvac, atât la 2 cât și la 3 săptămâni post-vaccinare, s-au detectat nivele semnificative de anticorpi specifici *S. enteritidis* și *S. typhimurium*, un titru mai ridicat înregistrându-se pentru *S. enteritidis*. Valorile titrurilor înregistrate demonstrează capacitatea vaccinului Avisalmvac (utilizat la un an de la fabricare) de a induce sinteza anticorpilor specifici și deci, în acest mod, este dovedită stabilitatea preparatului.

În urma infecției de control realizată la 3 săptămâni post-vaccinare, au fost analizate seruri provenind de la 2 loturi de păsări vaccinate cu Avisalmvac și inoculate cu *S. enteritidis* tulpina 13a și respectiv *S. typhimurium* tulpina 504, în paralel cu 2 loturi de păsări nevaccinate, dar care au fost inoculate cu tulpinile de control.

Toate loturile au fost testate atât pentru detecția anticorpilor anti *S. enteritidis* cât și a celor anti *S. typhimurium* (figura 2).



**Fig. 2. Rezultatele examenelor serologice**  
Realizate la 7 zile post - infecție de control

După cum se remarcă în figura de mai sus, pentru loturile martor de păsări nevaccinate care au primit doar infecția de control s-au înregistrat nivele scăzute de anticorpi, plasate totuși în zona de pozitivare. Păsările vaccinate și inoculate cu tulpinile de control au prezentat titruri de anticorpi similare cu cele înregistrate la 2 și 3 săptămâni post-vaccinare.

### Analiza histopatologică

Au fost sacrificate păsări la 18 zile post-vaccinare și s-au realizat examene histopatologice pe probe prelevate de la locul de vaccinare (mușchi scheletic și piele) și splină.

Mușchiul a relevat la toate cazurile examinate un aspect normal manifestat prin intensă bazofilie a miofibrilelor, cu prezența striatiunilor transversale și longitudinale (figurile 3, 4 și 5).

De asemenea, pielea nu a prezentat modificări microscopice.



**Fig. 3. Muschi pectoral ( zona de inoculare)**  
Miofibrile de aspect normal evidențiind prezenta striatiunilor. Colorația tricromică (HEA)×450. Microscop Axiostar Plus, Zeiss. Foto Canon Power Shot G3.

În mușchi, la păsările inoculate cu vaccin uleios Avisalmvac, nu s-au constatat după 18 zile de la vaccinare leziuni la locul de inoculare (mușchii pectorali, mușchii

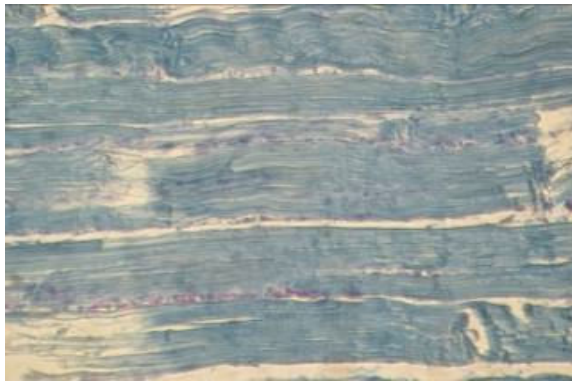


gambei, mușchii cervicali dorsali și pielea) comparativ cu cazurile de la lotul martor.



**Fig. 4. Muschi gamba (zona de inoculare)**

Miofibrile bazofile cu prezenta striatiunilor care relevă aspectul normal. Coloratia tricromica (HEA) × 450. Microscop Axiostar Plus Zeiss. Foto Canon Power Shot G3.

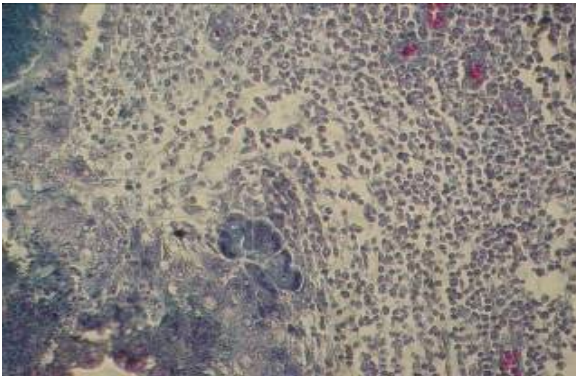


**Fig. 5. Muschi cervical dorsal ( zona de inoculare)**

Miofibrile de aspect normal. Coloratia tricromica (HEA) × 450. Microscop Axiostar Plus Zeiss. Foto Canon Power Shot G3.

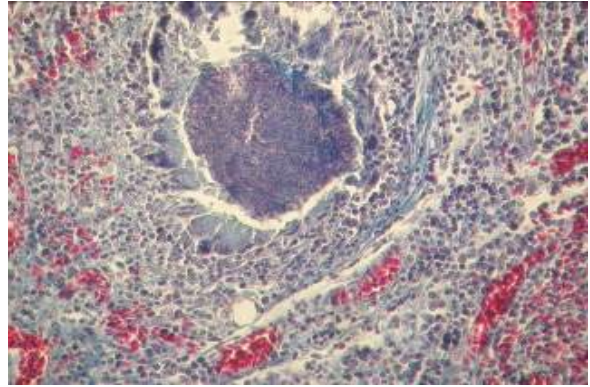
La o pasăre vaccinată splina a relevat aspecte lezionale caracterizate prin: splenită granulomatoasă ca o consecință posibilă a unei infecții colibacilare (coligranulomatoză).

Aspectele lezionale întâlnite în splină nu au fost influențate de vaccinarea antisalmonelică.



**Fig. 6. Imagine splină.**

Granulom infecțios prezentând celule epitelioidice cu cazeificare centrala și hiperplazie cu limfoblaste. Coloratie tricromica (HEA) × 450. Microscop Axiostar Plus Zeiss. Foto Canon Shot Power G3.



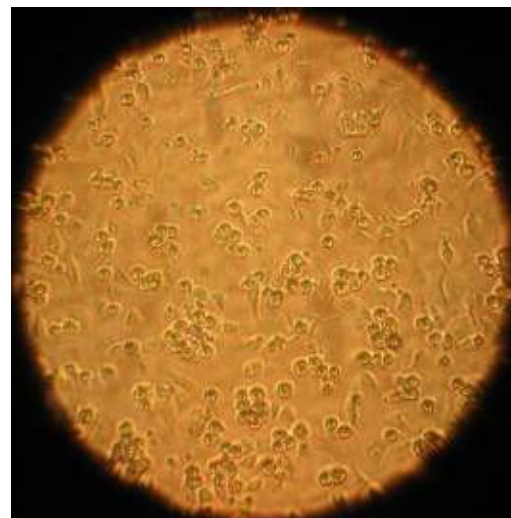
**Fig. 7. Imagine splina.**

Inflamație granulomatoasă cu cazeificare centrala și intensă proliferare cu celule epitelioidice; hiperemie și intensă reacție cu limfoblaste. Coloratie tricromica (HEA) × 450. Microscop Axiostar Plus Zeiss. Foto Canon Power Shot G3.

În splină la un singur caz s-a constatat o intensă hiperplazie cu limfoblaste și numeroase focare necrotice cu proliferarea de celule epitelioidice gigante (figurile 6 și 7).

### Evaluarea toxicității

În testele de evaluare a citotoxicității prin punerea în contact a vaccinului / componentelor vaccinale cu suspensia celulară Vero la examenul microscopic (figura 9), s-au constatat întârzieri în dezvoltarea monostratului: la 24 de ore post-contact fiind înregistrată prezența de celule mari rotunde refringente înconjurate de picături mici de ulei, iar la diluția 1/8 de Drakeol apariția de celule moarte; apoi însă monostratul s-a dezvoltat normal și nu au mai fost înregistrate alte efecte citopatice.

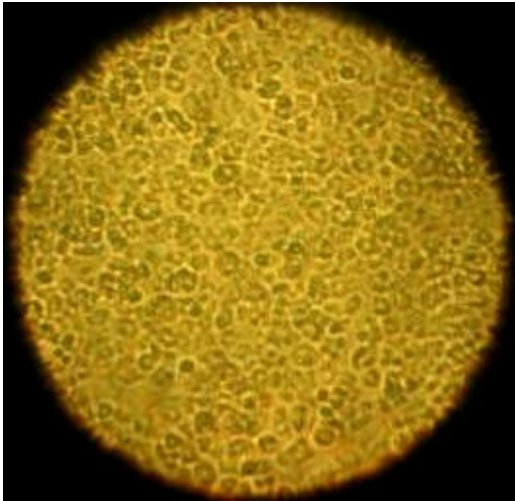


**Fig. 9. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe substrat celular Vero: aspect microscopic la două ore după contactul dintre produs Foto Canon Power Shot G3 și suspensia celulară.

În testele de citotoxicitate prin punerea în contact a vaccinului / componentelor

vaccinale cu monostratul celular Vero deja constituit, la examenul microscopic (figura 10) nu au fost inregistrate efecte citopatice vizibile, la nici una dintre dilutiile sau componente vaccinale.



**Fig. 10. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe monostrat celular Vero: aspect microscopic la doua ore dupa inocularea produsului. Foto Canon Power Shot G3.

In testul de evaluare a metabolismului celular cu MTT (figura 11), practicat la 6 zile de la inocularea produsului / componentelor vaccinale pe monostratul celular Vero deja constituit, s-au obtinut rezultatele ilustrate in figurile 12 – 14.



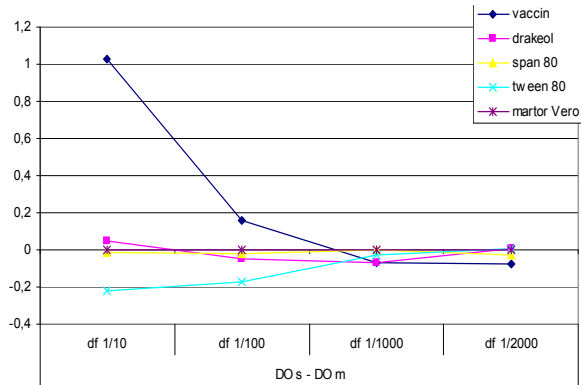
**Fig. 11. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe monostrat celular Vero: evaluarea activitatii dehidrogenazelor celulare prin testul MTT la 6 zile de la inoculare. Foto Canon Power Shot G3.

S-a constatat ca vaccinul integral in primele dilutii, ca si prima dilutie de adjuvant uleios, au indus o crestere a activitatii dehidrogenazice.

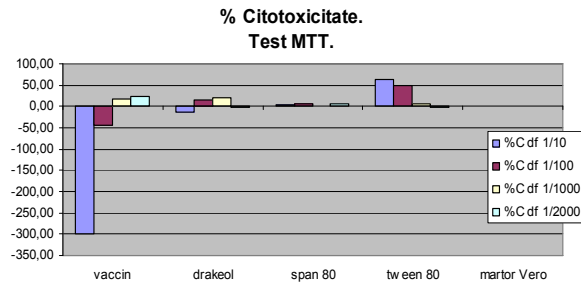
In schimb, dintre celelalte componente vaccinale, tween-ul a fost cel care a indus la primele dilutii efecte inhibitorii asupra activitatii dehidrogenazelor.

In analiza statistica a rezultatelor obtinute, efectuata prin Anova/testul t, la comparatia dintre vaccin si adjuvant, valoarea P a fost 0.0019, înalt semnificativa; la comparatia dintre vaccin si matorul celular, valoarea P a fost 0,0113, semnificativa; la comparatia dintre Tween si matorul celular, valoarea P a fost 0,4379, fara semnificatie statistica.



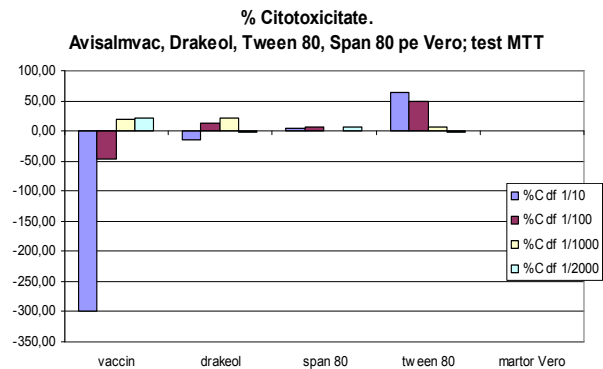
**Fig. 12. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe monostrat celular Vero. Evaluarea activitatii dehidrogenazelor celulare prin testul MTT la 6 zile de la inoculare. Rezultate exprimate prin diferenta de absorbanta dintre probele testate si matorul celular.



**Fig. 13. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe monostrat celular Vero: evaluarea activitatii dehidrogenazelor celulare prin testul MTT la 6 zile de la inoculare. Rezultate exprimate conform formulei %C=1 - S / P x 100.



**Fig. 14. Avisalmvac**

Test de citotoxicitate pe monostrat celular Vero. Evaluarea activitatii dehidrogenazelor celulare prin testul MTT la 6 zile de la inoculare. Rezultate exprimate conform formulei Zhu 2005.

## CONCLUZII

1. Produsul vaccinal Avisalmvac aflat la sfarsitul perioadei de valabilitate si-a pastrat caracteristicile imunogene
2. Examenenele histopatologice nu au relevat niciun aspect lezional asociat vaccinarii cu acest produs
3. Testele de citotoxicitate au evidentiat capacitatea vaccinului si a adjuvantului uleios de a stimula metabolismul celular, si un oarecare grad de toxicitate / inhibitie a metabolismului dehidrogenazic asociat unuia dintre emulgatori, dar la dilutii mai mari decat cele folosite in formula vaccinala.

## BIBLIOGRAFIE

1. **GIENI R.S., YAN LI, K.T. HAY GLASS (1995)** Comparison of [3H]-thymidine incorporation with MTT and MTS-based bioassay for human and murine IL-2 and IL-4 analysis. Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity, *J. Immunol. Methods*, 187: 85-93
2. **JANSEN T., MARIJ P.M. HOFMANS, M.J.G. THEELEN, F. MANDERS, V.E.J. SCHIJNS (2006)** Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants, *Vaccine*, 24: 5400-5405
3. **QING-XIA NIU, CHENG-YAN ZHAO, ZHI-AN JING (2001)** An evaluation of the colorimetric assay based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity, *J. Immunol. Methods*, 251: 11-19.
4. **RIBEIRO-DIAS FATIMA, J.A.M. BARBUTO, MARISTELA TSUJITA, SONIA JANCAR (2000)** Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differential inhibition by PGE2 and EDTA, *J. Immunol. Methods*, 241: 121-129.
5. **ROLLINO CRISTIANA, SIMONA BORSA, GRAZIELLA BELLONE, G. PICCOLI, G. EMANUELLI (1995)**. False positive results with MTT assay, *J. Immunol. Methods*, 185: 141-143.
6. **POPA VIRGILIA, BEATRICE STIRBU – TEOFĂNESCU, M. SAMARINEANU, M. PIRVULESCU, E. CAPLAN, DANIELA BOTUȘ, RAMONA MIHĂILESCU, C. STIRBU, A. POPOVICI, (2006)**. Studii privind obținerea unor biopreparate destinate controlului infecțiilor salmonelice la păsări (I), Buletinul informativ al Societății Medicilor Veterinari in Patologia Aviară și a Animalelor Mici din România, 1/2006
7. **POPA VIRGILIA, BEATRICE STIRBU – TEOFĂNESCU, ILEANA BEM, GEORGETA VOICU, DANIELA BOTUȘ, RAMONA MIHĂILESCU, N. CATANĂ (2006)**. Studii privind obținerea unor biopreparate destinate controlului infecțiilor salmonelice la păsări (II), Buletinul informativ al Societății Medicilor Veterinari in Patologia Aviară și a Animalelor Mici din România, 17 (4): 12-15.
8. **POPA VIRGILIA, BEATRICE ȘTIRBU – TEOFĂNESCU, RAMONA MIHĂILESCU, DANIELA BOTUȘ, M. PÎRVULESCU, E. CAPLAN (2006)** Derivatives from the phase 1 flagellin to detect the

presence of *Salmonella enteritidis* strains, *Romanian Revue of Veterinary Medicine*, 16(3): 55-70, ISSN:1220-3173

9. **STIRBU-TEOFĂNESCU BEATRICE, VIRGILIA POPA, (2005)** Truse pentru detecția anticorpilor anti-Salmonella enteritidis și S. typhimurium prin tehnica imunoenzimatică (ELISA), *Buletin informativ*, Societatea medicilor veterinari în patologia aviară și a animalelor mici din România, 16 (3): 34-40.