

А. Н. Притыченко, А. П. Лысенко, М. В. Кучвальский, Е. Л. Красникова

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого,
Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь*

АЛЛЕРГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ТУБЕРКУЛИНА С 30–50 % СЛАБОСЕКРЕТИРУЮЩИХСЯ АНТИГЕНОВ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА

Аннотация: Туберкулёз крупного рогатого скота остается глобальной мировой проблемой. Внутрикожная проба с туберкулином – основной метод определения статуса стад, что предъявляет особые требования к активности и специфичности диагностикума. Основу современных туберкулинов составляют антигены микобактерий туберкулёза, которые легко секретируются в жидкую синтетическую среду в процессе роста, но целый ряд антигенов с низким показателем секретиремости находится в составе туберкулинов в незначительных количествах. Цель работы – получение слабосекретирующихся антигенов из отхода производства – автоклавированной бактериальной массы производственного штамма микобактерий туберкулёза (МБТ) с использованием ультразвука и неионного детергента, исследование диагностических свойств туберкулина с 30–50 % таких антигенов. Установлено, что автоклавированная бактериальная масса производственного штамма МБТ, являющаяся отходом производства туберкулина, может быть дополнительным источником туберкулопротеинов, представляющих собой слабосекретирующиеся (СС) антигены МБТ, которые в эквивалентной дозе примерно на 30 % активнее, чем стандартный туберкулин на основе легкосекретирующихся антигенов, и не уступает ему по видовой специфичности. При этом в состав туберкулина можно включать до 50 % очищенных СС туберкулопротеинов из бактериальной массы. Получаемый препарат не реактогенен, в эквивалентной дозе не отличается по активности от международного стандарта ППД туберкулина, но превосходит его по видовой специфичности. Показано, что в стадах с неопределённым статусом по туберкулёзу на туберкулины с 30–50 % очищенных СС туберкулопротеинов реагирует в 2,2 раза больше коров, чем стандартные препараты на основе легкосекретирующихся антигенов микобактерий туберкулёза. Углубленные исследования реагиовавших коров с применением методов детекции генома микобактерий туберкулёза и бактериологических маркеров туберкулёзной инфекции подтвердили наличие у них латентной туберкулёзной инфекции. Включение в состав туберкулина до 50 % туберкулопротеинов из бактериальной массы повышает диагностические свойства целевого продукта и существенно снижает его себестоимость. **Благодарности.** Исследования выполнены в рамках научно-технической программы «Агропромкомплекс – устойчивое развитие» на 2019–2020 годы.

Ключевые слова: туберкулёз крупного рогатого скота, антигены, туберкулин, автоклавированная бактериальная масса производственного штамма микобактерий туберкулёза, ультразвук, неионный детергент, диагностические свойства туберкулина со слабосекретирующимися антигенами микобактерий туберкулёза

Для цитирования: Аллергическая активность и специфичность препаратов туберкулина с 30–50 % слабосекретирующихся антигенов микобактерий туберкулёза / А. Н. Притыченко, А. П. Лысенко, М. В. Кучвальский, Е. Л. Красникова // Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. аграр. наук. – 2020. – Т. 58, №4. – С. 472–482. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-4-472-482>

Andrei N. Prytychenko, Aleksandr P. Lysenko, Maxim V. Kuchvalski, Elena L. Krasnikova

*Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Vyshellessky,
National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

ALLERGIC ACTIVITY AND SPECIFICITY OF TUBERCULIN PREPARATIONS WITH 30-50% OF WEAKLY SECRETED MYCOBACTERIAL ANTIGENS OF TUBERCULOSIS

Abstract: Bovine tuberculosis remains a global problem. An intracutaneous test with tuberculin is the main method for determining the status of herds, which poses special requirements for the activity and specificity. The basis of cotemporal tuberculins are antigens of tuberculosis mycobacteria easily secreted to the liquid synthetic medium during growth, but a range of antigens with a low secretion index are in composition of tuberculins in small quantities. The purpose of the research is to obtain weakly secreted antigens from a production waste – autoclaved bacterial mass of production strain of tuberculosis mycobacteria (MTB) using ultrasound and nonionic detergent, to study the diagnostic properties of tuberculosis with 30-50% of such antigens. It has been determined that autoclaved bacterial mass of industrial MBT strain, which is a waste of tuberculin production, can be an additional source of tuberculo-proteins, which are low-secreting (LS) MBT antigens, which in an equiv-

alent dose are about 30% more active compared to standard tuberculin based on easily secreted antigens and is not inferior in terms of species specificity. Whereas, up to 50% of purified LS of tuberculoproteins from the bacterial mass can be included in tuberculin composition. The obtained preparation is not reactogenic, in an equivalent dose it does not differ in terms of activity from the international standard for PPD of tuberculin, but surpasses it in terms of species specificity. It has been shown that in herds with an undetermined tuberculosis status, 2.2 times more cows respond to tuberculins with 30-50% of purified LS tuberculoproteins compared to standard preparations based on easily secreted antigens of tuberculosis mycobacterium. Profound studies of reacting cows using methods for detecting the genome of tuberculosis mycobacterium and bacteriological markers of tuberculosis infection have confirmed the presence of latent tuberculosis infection in cow body. The inclusion of up to 50% of tuberculoproteins from the bacterial mass in tuberculin increases the diagnostic properties of the target product and significantly reduces its price cost. **Acknowledgments.** The research was carried out as part of the Research and Technical Program “Agropromkompleks – sustainable development” for 2019-2020.

Keywords: bovine tuberculosis, antigens, tuberculin, autoclaved bacterial mass of industrial strain of tuberculosis mycobacterium, ultrasound, non-ionic detergent, diagnostic properties of tuberculin with weakly secreted antigens of tuberculosis mycobacteria

For citation: Prytychenko A. N., Lysenko A. P., Kuchvalski M. V., Krasnikova E. L. Allergic activity and specificity of tuberculin preparations with 30-50% of weakly secreted mycobacterial antigens of tuberculosis. *Vestsi Natsyyanal'nay akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2020, vol. 58, no 4, pp. 472–482 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-4-472-482>

Введение. Туберкулёз крупного рогатого скота остается глобальной мировой проблемой. По данным Всемирной информационной системы здоровья (WAHIS), в 2017–2018 гг. заболевание встречалось почти в половине (44 %) стран мира¹. Основным методом определения статуса стад является внутрикожная аллергическая проба с туберкулином для млекопитающих [1–3], что предъявляет особые требования к диагностикуму, производство и контроль которого строго регламентируется [4]. Тем не менее широко используемые туберкулины (PPD – Purified protein derivative, HCSM – heat concentrated synthetic medium) не лишены недостатков. Туберкулины представляют собой смесь частично денатурированных антигенов микобактерий туберкулёза бычьего вида (*Mycobacterium bovis*), секретлируемых в процессе роста в жидкую синтетическую питательную среду, очищенных осаждением трихлоруксусной кислотой и сульфатом аммония от полисахаридов и других примесей или ультрафильтрацией от низкоспецифичных высокомолекулярных фракций [5–7]. Значительная часть антигенов туберкулина иммунохимически родственна антигенам нетуберкулёзных микобактерий (НТМБ) [8], встречающихся во внешней среде [9]. Поэтому при попадании в организм крупного рогатого скота НТМБ могут индуцировать гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к туберкулину, что существенно затрудняет аллергическую диагностику туберкулёза [2, 10]. С другой стороны, в зависимости от особенностей препарата туберкулина, диагностической дозы, состояния обследуемого поголовья средняя чувствительность туберкулиновой пробы находится в пределах 70–90 % [2, 10]. Кроме того, у 2,5–10 % больных животных может развиваться временная или постоянная аллергия к туберкулину [11], что делает проблематичным оздоровление стад путём аллергических исследований и удаления туберкулинпозитивных особей.

Технология получения туберкулинов принципиально не менялись с 30–40-х годов прошлого века [5]. Микобактерии туберкулёза (МБТ, *M. bovis*, чаще штаммы AN5, Vallee, №8) культивируют на синтетической питательной среде 6–8 недель. В процессе роста в культуральную жидкость секретируются микобактериальные антигены и накапливаются продукты аутолиза клеток. Полученные культуры инактивируют автоклавированием, бактериальную массу удаляют, культуральную жидкость подвергают стерилизующей фильтрации. Туберкулопротеины (частично денатурированные антигены МБТ) выделяют из фильтрата культуральной жидкости осаждением трихлоруксусной кислотой и сульфатом аммония [12]. Для частичной очистки и повышения специфичности препарата используют ультрафильтрацию [7, 12]. Препараты стандартизируют по концентрации туберкулопротеинов, суммарной аллергической активности и физико-химическим показателям [4, 12]. Тем не менее диагностическая ценность туберкулинов разных производителей и даже разных серий препаратов может различаться из-за варьирования относительной концентрации индивидуальных антигенов, обладающих разными свойствами

¹ Bulletin [Electronic resource] // OIE : World Organisation for Animal Health. Mode of access: <https://oiebulletin.com/>. Date of access: 10.09.2020.

и играющими разную роль в иммунном ответе и возникновении ГЗТ к туберкулину [6, 8]. В этой связи идеальным диагностикумом мог бы быть препарат, состоящий из определенных количеств очищенных или рекомбинантных индивидуальных антигенов, что пока трудно реализовать из-за технических сложностей и высокой стоимости производства.

Доступным направлением совершенствования технологии получения туберкулинов и увеличения выхода целевого продукта может быть повышение в их составе доли антигенов, связанных с клеткой, клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной. Известно, что антигены МБТ существенно различаются по способности секретироваться в культуральную жидкость [13–15], поэтому в туберкулинах, приготовленных по традиционной технологии, превалируют антигены с высоким индексом секретрируемости. Вместе с тем целый ряд антигенов с низким показателем секретрируемости (МРТ 57/BCG_a, МРТ46, ag 78/a5, ag 84, ag 10, ag 82/65 kD/P64, ag 63/hsp 70, МРВ 83), играющих значительную роль в инфекционном процессе и иммунном ответе, находятся в составе туберкулинов в незначительных количествах [14, 15]. В частности, ag 78/a5 и МРВ 83 считаются строго специфичными для *M. bovis* и *M. tuberculosis* [16, 17], увеличение их доли в составе диагностикума может явно повысить его видовую специфичность.

Слабосекретрируемые антигены связаны с клеткой и клеточной стенкой, которая рассматривается как один из факторов патогенности МБТ, поэтому именно на них развивается наиболее сильный иммунный ответ. Соответственно, диагностикумы с высокой концентрацией таких антигенов будут обладать более высокой специфической активностью.

Цель настоящей работы – исследование диагностических свойств препаратов туберкулина для млекопитающих с повышенным содержанием слабосекретрирующихся антигенов, ассоциированных с микобактериальной клеткой и клеточными стенками.

Материалы и методы исследования. В работе использовали туберкулин очищенный для млекопитающих (ТО) ОАО «БелВитунифарм» серии «К» с содержанием туберкулопротеинов (ТП) 0,59 мг/мл и активностью 18 055 IU/мл (относительно 1st International standard Purified protein derivative (PPD) *Mycobacterium bovis*), а также серий 1/9, 2/0, 2/4, стандартизированных в установленном порядке. ТО приготовлены из культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* 8 (КМИЭВ 9), очищенного ультрафильтрацией², соответственно, они содержали преимущественно антигены, секретрирующиеся в процессе роста в культуральную среду.

Слабосекретрирующиеся антигены (ССА) получали из автоклавированной бактериальной массы производственного штамма *M. bovis* 8 (КМИЭВ 9), отхода производства ТО, путем обработки ультразвуком (Bandelin Sonopuls 2400) и неионным детергентом [18]. Для удаления клеток и клеточных стенок экстракт центрифугировали при 14 тыс. об/мин и фильтровали через Millex® GP 0,45 и 0,22 µm. Туберкулопротеины (ТП) очищали осаждением трихлоруксусной кислотой (ТХУ) с последующим диализом.

Концентрацию ТП определяли путем осаждения ТХУ (0,5 мл пробы + 2,0 мл H₂O + 2,5 мл 20 % ТХУ – определяли % пропускания при 540 нм по сравнению с контролем – 2,5 мл H₂O + 2,5 мл 20 % ТХУ) и рассчитывали по калибровке, построенной по растворам известных количеств сухого ППД туберкулина.

Концентрацию полисахаридов определяли по следующей методике: 0,5 мл пробы + 0,5 мл 5%-ного фенола + 2,5 мл концентрированной серной кислоты – прогревание 10 мин при 100 °С – определение % пропускания при 540 нм относительно стандартного раствора ППД туберкулина.

Для приготовления опытных образцов туберкулина использовали стерильный культуральный фильтрат *M. bovis* 8 с концентрацией туберкулопротеинов 0,36–0,38 мг/мл, к которому добавляли очищенные ССА в количестве 30 %, 44 %, 50 % до достижения общей концентрации ТП 0,59–0,63 мг/мл (варианты туберкулина со слабосекретрирующимися антигенами – ТССА 30 %, ТССА 44 %, ТССА 50 %).

Реактогенность вариантов ТССА (возможность индукции реакций у здоровых животных) была проверена на 421 корове благополучных ферм путём симультанного введения ТССА и стандартного ТО с. 1/9 и 2/0.

² Аллерген для диагностики туберкулеза и способ его получения : пат. ВУ 11119 / А.П. Лысенко, Т.Н. Агеева, А.П. Лемиш, А.Н. Притыченко, Е.Л. Красникова. Оpubл.: 30.10.2008.

Аллергическую активность и видовую специфичность препаратов определяли на крупном рогатом скоте, сенсibilизированном *M. bovis* 8 и *M. avium* 1603, инактивированные в 3%-ном растворе фенола (по 2 мг/1 кг живой массы в минеральном масле подкожно). Аллергические исследования проводили с интервалом 30–35 дней. Аллергены вводили внутрикожно безыгольным инъектором в область шеи по 0,2 мл. Реакцию учитывали через 72 ч, определяя изменение размера кожной складки в месте инъекции. Кроме того, аллергическую активность и специфичность ТССА по сравнению с эталоном ППД туберкулина *M. bovis* (1st International standard PPD *Mycobacterium bovis*) исследовали на 10 морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* 8 и *M. avium* 1603 (по 0,5 мг/мл бакмассы, прогретой при 85 °С 15 мин в смеси с ISA 70). Контролем служили 3 интактные морские свинки. Статистическую обработку результатов провели с помощью теста Манна–Уитни в программе Statistica 6.0.

Препараты ТССА 30 %, 44 %, 50 % по сравнению с ТО для млекопитающих были испытаны на 1830 коровах из стад с неопределённым статусом по туберкулёзу. Препараты вводились внутрикожно по 0,2 мл, положительной реакцией считали утолщение кожной складки на 4 мм, неопределённой – на 3 мм.

Для оценки статуса реагировавших на ТО и ТССА коров исследовали молоко в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и проводили его посев для выявления бактериологических маркеров туберкулёзной инфекции [19].

Для ПЦР пробы молока смешивали с лизирующим буфером, прогревали 5 мин (95 °С). ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на S1000™ Thermal Cycler (BioRad) с праймерами 16S RNA *Mycobacteria*, MPB 70, MPB 64, IS 6110 («Прайм-тех»). Электрофорез амплификатов проводили в 2%-ном агарозе, результаты учитывали на Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BioRad).

Для бактериологического посева пробы молока прогревали 2 раза по 15 мин при 99 °С, смешивали (1 : 2) со стимулятором роста *MycCel* DW, инкубировали 24 ч при 37 °С и высевали на питательную среду *MycCel* DW [19, 20]. Посевы инкубировали при 37 °С. Изоляты идентифицировали в ПЦР и в реакции иммунодиффузии (РИД) [4] с антисыворотками к штаммам микобактерий туберкулёза с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v, *M. bovis* 8, к изолятам CWD МБТ из FLK-BLV (bovine leukemia virus) с. 30 и FLK-BLV с. HC 0,22 µm [21] и из мозга козы с губкообразными изменениями “Br 2” [22].

Результаты и их обсуждение. В опыте на крупном рогатом скоте установлено, что СС туберкулопротеины у животных, сенсibilизированных *M. bovis*, вызывали аллергические реакции, которые по интенсивности, в среднем на 31,5 %, превышали таковой показатель ТО серии «К», несмотря на то что их доза (по концентрации туберкулопротеинов) была лишь на 5,1 % больше, чем у ТО (табл. 1).

У животных группы *M. avium* СС туберкулопротеины в одном случае индуцировали положительную реакцию (5 мм), во втором – неопределённую (3 мм). ТО с. «К» лишь в 1 случае вызывал положительную (6 мм) реакцию, тем не менее из-за более высокой активности СС

Т а б л и ц а 1. Аллергическая активность и видовая специфичность очищенных слабосекретирующихся (СС) туберкулопротеинов у крупного рогатого скота, сенсibilизированного *M. bovis* 8 и *M. avium* 1603, утолщение кожной складки в месте введения аллергенов, мм

T a b l e 1. Allergic activity and species specificity of purified low-secreting (LS) tuberculoproteins in cattle sensitized with *M. bovis* 8 and *M. avium* 1603, thickening of skin fold in the spot of allergen injection, mm

Вид МБТ, № животного	ТО с. «К» в дозе 0,118 мг/0,2 мл (3611 IU/0,2 мл)	СС туберкулопротеины в дозе 0,124 мг/0,2 мл
<i>M. bovis</i> 650	11	13
<i>M. bovis</i> 832	5	8
Показатель активности	8,0	10,5 (превышение на 31,5 %)
<i>M. avium</i> 992	6	5
<i>M. avium</i> 910	1	3
Показатель видовой специфичности	3,5 (превышение на 14,3 %)	4,0
Показатель специфической активности	5,5	6,5 (превышение на 18 %)

Таблица 2. Аллергическая активность и видовая специфичность ТССА с разной долей СС туберкулопротеинов у крупного рогатого скота, сенсibilизированного микобактериями туберкулёза бычьего и птичьего вида, утолщение кожных складок в месте инъекции через 72 ч, мм

Table 2. Allergic activity and species specificity of tuberculin with different proportions of LS tuberculoproteins in cattle sensitized with bovine and avian tuberculosis mycobacteria, thickening of skin fold in the spot of allergen injection after 72 h, mm

№ животного	ТО с. 1/9	ТССА 30 %	ТССА 44 %	ТССА 50 %
<i>M. bovis</i> 650	7	8	12	9
<i>M. bovis</i> 832	8	5	14	12
с. а. показатель активности	7,5	6,5	13	10,5
<i>M. avium</i> 992	6	0	7	4
<i>M. avium</i> 910	0	0	0	0
Показатель видовой специфичности	3,0	0	3,5	2
Показатель специфической активности	4,5	6,5	9,5	8,5

ных *M. avium*) на ТССА 44 и 50 % практически не отличалась от ТО (положительная реакция у 1 животного из 2), а на ТССА 30 % животные этой группы не реагировали. То есть включение в состав туберкулина ССА повышает его активность и не снижает видовую специфичность. Показатели специфической активности – разница между интенсивностью реакций у животных, инфицированных *M. bovis* и *M. Avium*, были в 1,4–2,1 раза выше у ТССА. Такие же закономерности были отмечены при сравнении ТССА 50 % с 4 сериями ТО, причем показатели активности, видовой специфичности, специфической активности ТССА 50 % также были существенно выше (табл. 3, 4).

Таблица 3. Аллергическая активность и видовая специфичность ТССА 50 % и 3 серий ТО у крупного рогатого скота, сенсibilизированного микобактериями туберкулёза бычьего и птичьего вида, утолщение кожных складок в месте инъекции через 72 ч, мм

Table 3. Allergic activity and species specificity of tuberculin with 50 % of LS tuberculoproteins and 3 lots of standard purified tuberculin in cattle sensitized with bovine and avian tuberculosis mycobacteria, thickening of skin fold in the spot of allergen injection after 72 h, mm

№ животного	ТО с. «К»	ТО с. 2/2	ТО с. 2/4	ТССА 50 %
<i>M. bovis</i> 650	9	4	4	15
<i>M. bovis</i> 832	4	6	5	10
Показатель активности	6,5	5,0	4,5	12,5
<i>M. avium</i> 992	3	2	3	0
<i>M. avium</i> 910	0	1	0	0
Показатель видовой специфичности	1,5	1,5	1,5	0
Показатель специфической активности	5,0	3,5	3,0	12,5

туберкулопротеинов показатель их специфической активности был на 18 % выше (табл. 1). Полученные результаты показали, что СС туберкулопротеины в сопоставимой дозе обладают более высокой активностью, чем ТО на основе секретирующихся антигенов МБТ, что позволяет включать их в состав туберкулина.

При проверке на здоровом крупном рогатом скоте установлено, что все исследованные животные (421 гол.) не реагировали на ТССА и стандартный ТО (с. 1/9, 2/0). В опыте на животных, экспериментально сенсibilизированных *M. bovis* и *M. avium*, сравнили аллергическую активность и видовую специфичность ТССА 30 %, ТССА 44 %, ТССА 50 % и ТО (табл. 2).

Животные группы *M. bovis* реагировали как на ТО, так и на ТССА, причём более интенсивные реакции отмечались на ТССА с большей дозой ССА. При этом видовая специфичность (индукция аллергических реакций у животных, сенсibilизированных

Таблица 4. Аллергическая активность и видовая специфичность ТССА 50 % и ТО с. 2/0 у крупного рогатого скота, сенсibilизированного микобактериями туберкулёза бычьего и птичьего вида, утолщение кожных складок в месте инъекции через 72 ч, мм

Table 4. Allergic activity and species specificity of tuberculin with 50% of LS tuberculoproteins and standard purified tuberculin lot 2/0 in cattle sensitized with bovine and avian tuberculosis mycobacteria, thickening of skin fold in the spot of allergen injection after 72 h, mm

№ животного	ТО с. 2/0	ТССА 50 %
650 <i>M. bovis</i>	6	16
832 <i>M. bovis</i>	5	13
Показатель активности	5,5	14,5
992 <i>M. avium</i>	6	9
910 <i>M. avium</i>	4	4
Показатель видовой специфичности	5,0	6,5
Показатель специфической активности	0,5	8,0

Таблица 5. Диаметр папул через 24 ч у морских свинок, заражённых *M. bovis* 8 и *M. avium* 1603, после инъекций 1st International standard PPD *M. bovis*, ТССА 50 %, ППД туберкулина для птиц (по 0,001 мг/0,2 мл), мм

Table 5. Papule diameters in mm in 24 h in guinea pigs infected with *M. bovis* 8 and *M. avium* 1603 after injections of 1st International standard PPD *M. bovis*, tuberculin with 50 % of LS tuberculoproteins, PPD *M. avium* (0.001 mg/0.2 ml each)

Штамм для заражения, № животного	1 st International standard PPD <i>M. bovis</i> (32 IU)	ТО ОПС с.1 (50 %)	ППД туберкулин для птиц
<i>M. bovis</i> 8 №1	15,5	14,3	8,5
<i>M. bovis</i> 8 №2	16,5	17,3	11
<i>M. bovis</i> 8 №3	22,5	17,8	10,5
<i>M. bovis</i> 8 №4	13	11,3	7
<i>M. bovis</i> 8 №5	16,5	18,3	9
$\bar{x} \pm \sigma$	16,8±3,5	15,8±3,5	9,2±3,5
<i>M. avium</i> 1603 №1	11	7	12
<i>M. avium</i> 1603 №2	16,3	12,3	15
<i>M. avium</i> 1603 №3	18,5	13,5	20
<i>M. avium</i> 1603 №4	9	12,5	17
<i>M. avium</i> 1603 №5	8	8	9
$\bar{x} \pm \sigma$	12,6±4,6	10,7±2,9	14,6±4,3
Показатель специфической активности	4,2	5,1	5,4

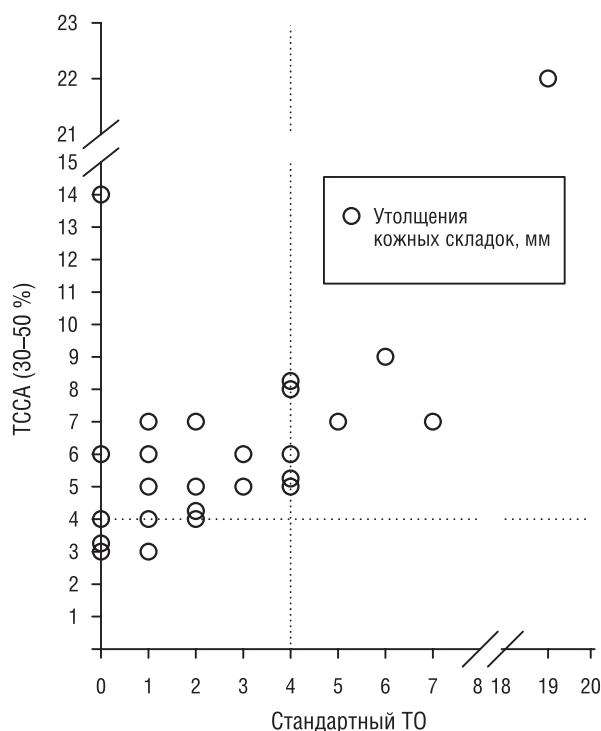


Рис. 1. Интенсивность реакций в мм на стандартный ТО (ось абсцисс) и ТССА (ось ординат) при исследовании 1830 коров стад с неопределённым статусом по туберкулёзу

Fig. 1. Intensity of reactions in mm to standard purified tuberculin (abscissa axis) and tuberculins with low-secreting (LS) tuberculoproteins (ordinate axis) in the study of 1830 cows in herds with uncertain TB status

Диагностические свойства ТССА 50 % были подтверждены на морских свинках, заражённых *M. bovis* и *M. Avium*, при сравнительном испытании с 1st International standard PPD tuberculin *M. bovis* и ППД туберкулином для птиц (табл. 5). Оказалось, что ТССА в эквивалентной дозе имеет одинаковую активность со стандартом ППД туберкулина ($p = 0,92$), при этом специфичнее его ($p = 0,047$). Реакции на ТССА 50 % у морских свинок, заражённых *M. Bovis*, были интенсивнее, чем на ППД туберкулин для птиц, и наоборот, в группе *M. avium* во всех случаях они были менее интенсивными, что указывает на возможность использования ТССА в симультанной пробе.

При испытании на 1830 коровах стад с неопределённым статусом по туберкулёзу на ТССА реагировало 22 (1,2 %) коровы, у 3 (0,16 %) особей наблюдалась неопределённая реакция, на ТО реагировало 10 (0,55 %) животных, у 2 (0,11 %) коров отмечены неопределённые реакции, при этом во всех случаях более интенсивные реакции наблюдались на ТССА (рис. 1).

При диагностическом убое части реагировавших животных не было обнаружено типичных туберкулёзных изменений, т. е. не было выявлено активного заболевания туберкулёзом. Поэтому для исключения гипердиагностики при применении ТССА провели исследование молока части реагировавших коров в ПЦР и его посев для выявления бактериологических маркеров туберкулёзной инфекции. Во всех исследованных пробах молока обнаружили геном МБТ (реакции с праймерами МРВ 64 и МРВ 70) (рис. 2, табл. 6).

Более того, пробы молока, прогретого 2 раза по 15 мин при 99 °С, инкубированные в стимуляторе роста, дали на среде МусСел DW рост МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient - CWD), что было подтверждено в ПЦР с ДНК изолятами (табл. 6, рис. 3), т.е. у реагировавших животных была латентная туберкулёзная инфекция.

С данными ПЦР коррелировали результаты изучения антигенного состава изолятов из молока коров, реагировавших на ТССА и ТО. Установлено, что изоляты имели одинаковый набор основных

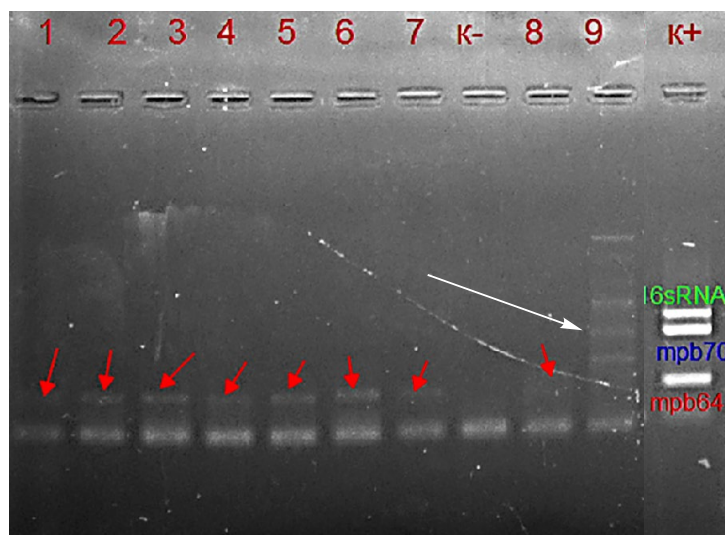


Рис. 2. Детекция продуктов амплификации ДНК из молока коров, реагирующих на ТССА. Все пробы реагируют с праймерами МРВ 64, проба 9 - с МРВ 64 и МРВ 70 (белая стрелка)

Fig. 2. Detection of DNA amplification products from milk of cows reacting to tuberculins with low-secreting (LS) tuberculoproteins. All samples react with primers MPB 64, and sample No9 with MPB 64 and MPB 70 (white arrow)

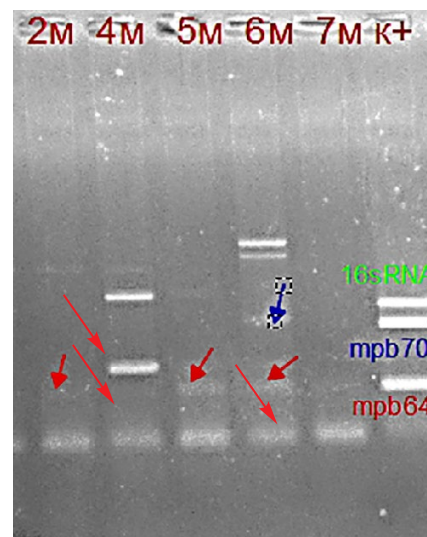
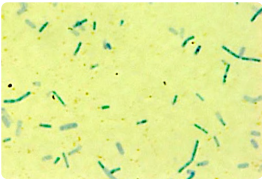
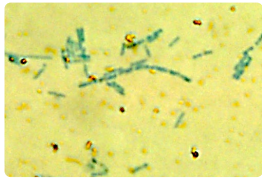
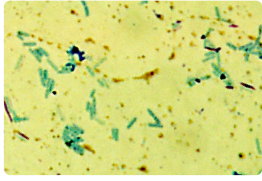
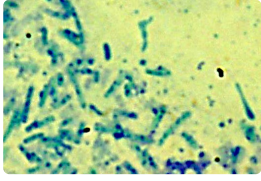


Рис. 3. Идентификация в ПЦР изолятов из молока коров, реагирующих на ТССА. ДНК изолята 6 м реагирует с праймерами МРВ 70 (синяя стрелка)

Fig. 3. Identification in PCR of isolates from milk of cows reacting to tuberculins with low-secreting (LS) tuberculoproteins. DNA of isolate 6m reacts with primers of MPV 70 (blue arrow)

Т а б л и ц а 6. Результаты ПЦР и посева молока, прогретого 2 раза по 15 мин при 99 °С, на среду MycCel DW

Т а b l e 6. Results of PCR and inoculation of milk heated 2 times for 15 min at 99 °C on medium MycCel DW

№ коровы, реакция на ТО/ТССА, мм	ПЦР с молоком	Микроскопия изолятов	ПЦР ДНК изолята
3/1 3/6 мм	MPB 64+	—	16s RNA+, MPB 64±
4/2 Б-а 4/5 мм	MPB 64+		16sRNA+, MPB70+ MPB 64+ IS6 110 33.7+
5/3 А-я 4/8 мм	MPB 64+		16s RNA±, MPB 64±IS6 110 34.75+
630 2/4 мм	MPB 64+		MPB 64+ IS6 110 33.89+
7/5 0/6 мм	MPB 64+, IS6110 37.05+		MPB 70+, MPB 64+ IS6110+ 36.17

№ коровы, реакция на ТО/ТССА, мм	ПЦР с молоком	Микроскопия изолятов	ПЦР ДНК изолята
9/7 0/14 мм	MPB 64+, IS6110 36.20+	—	MPB64+ IS6110 34.52
11/9 268 4/6 мм	MPB 64+ IS6110 34,83+	—	MPB 70+, MPB 64+

антигенов (плавное слияние преципитатов в РИД) с CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v и *M. bovis* 8 (рис. 4). Кроме того, было установлено антигенное родство изолятов из молока с изолятами из культуральной жидкости FLK-BLV и с CWD МБТ восстановившими жизнеспособность после летального химического стресса [23].

Заключение. Автоклавированная бактериальная масса производственного штамма МБТ, являющаяся отходом производства туберкулина, может быть дополнительным источником туберкулопротеинов, представляющих собой слабосекретирующиеся (СС) антигены МБТ, которые в эквивалентной дозе (примерно на 30 %) активнее, чем стандартный туберкулин на основе легкосекретирующихся антигенов, и не уступает ему по видовой специфичности.

В состав туберкулина можно включать до 50 % очищенных СС туберкулопротеинов из бактериальной массы. Получаемый препарат не реактогенен, в эквивалентной дозе не отличается по активности от международного стандарта ППД туберкулина, но превосходит его по видовой специфичности.

В стадах с неопределенным статусом по туберкулезу на туберкулины с 30–50 % очищенных СС туберкулопротеинов реагирует в 2,2 раза больше коров, чем на стандартные препараты на основе легкосекретирующихся антигенов микобактерий туберкулеза. Углубленные исследования реагировавших коров с применением методов детекции генома микобактерий туберкулеза и бактериологических маркеров туберкулезной инфекции подтвердили наличие у них латентной туберкулезной инфекции.

В состав туберкулина можно включать 50 % очищенных туберкулопротеинов из бактериальной массы производственного штамма *M. bovis*, что повышает диагностические свойства целевого продукта и существенно снижает его себестоимость.

Антигенное родство изолятов из молока реагировавших коров с изолятами CWD МБТ из опухолевых клеток (FLK-BLV) свидетельствует об их возможной этиологической роли в патологии и указывает на целесообразность

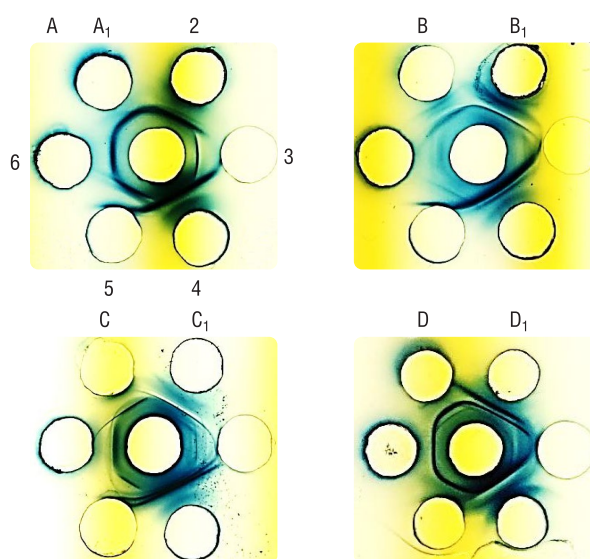


Рис. 4. Результаты изучения антигенного состава изолятов из молока коров, реагировавших на ТССА и ТО в РИД с CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v и *M. Bovis* 8. РИД с антисыворотками (в центральных лунках): А – к CWD *M. Tuberculosis* H₃₇R_v; В – к CWD МБТ из FLK-BLV с. 30; С – к CWD МБТ “Br2” из мозга козы с губкообразными изменениями; D – к CWD МБТ из FLK-BLV с. HC 0,22 μm, в периферических лунках соникаты А1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v; В1 и С1 – CWD *M. bovis*, восстановивший жизнеспособность после инактивации глутаровым альдегидом; D1 – CWD МБТ из FLK-BLV с. HC 0,22 μm; cow milk isolates 2 – 4/2 B-a, 3 – 5/3 A-a, 4 – 6/30, 6 – 9/7, 5 – CWD *M. bovis* из лимфатического узла коровы с туберкулезными изменениями (позиции симметричны)

Fig. 4. Results of studying the antigenic composition of isolates from milk of cows reacting to tuberculins with low-secreting (LS) tuberculo proteins and LS in RID with CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v и *M. Bovis* 8. AGID with antisera (in central wells) A – to CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v, B – to CWD MBT from FLK-BLV I. 30, C – to CWD MBT “Br2” from goat brain with spongiphorm-like lesions, D – to CWD MBT from FLK-BLV I. HC 0.22 μm, in peripheral wells sonicates A1 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇R_v, B1 and C1 – CWD *M. bovis*, which restored viability after inactivation with glutaraldehyde, D1– CWD MBT from FLK-BLV I. HC 0.22 μm; cow milk isolates 2 – 4/2 B-a, 3 – 5/3 A-a, 4 – 6/30, 6 – 9/7, 5 – CWD *M. bovis* from cow lymph node with tuberculosis lesions

использования более активных аллергенов для выявления и удаления из стад потенциально опасных животных.

Благодарности. Исследования выполнены в рамках научно-технической программы «Агропромкомплекс – устойчивое развитие» на 2019–2020 годы, 3.15.05 «Разработать технологию, позволяющую повысить в 2–3 раза эффективность производства туберкулина очищенного на ОАО «БелВитунифарм» и обеспечить его соответствие международным требованиям».

Список использованных источников

1. Terrestrial animal health code / World Organisation for Animal Health. – 28th ed. – Paris : OIE, 2019. – 2 vol.
2. The tuberculin test / M. L. [et al.] // *Veterinary Microbiology*. – 1994. – Vol. 40, N 1. – 2. – P. 111–124. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7)
3. Cousins, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock / D. V. Cousins // *Rev. Sci. et Techn. de l'OIE*. – 2001. – Vol. 20, N 1. – P. 71–85. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1263>
4. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012: OIE Terrestrial manual 2012 / World Organisation for Animal Health. – 7th ed. – Paris, 2012. – 2 vol.
5. Seibert, F. B. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analyses of a large quantity for standard / F. B. Seibert, J. T. Glenn // *Amer. Rev. of Tuberculosis*. – 1941. – Vol. 44, N 1. – P. 9–25.
6. Pemberton, J. R. Chemical, physical, and immunological characteristics of purified protein derivatives from *Mycobacterium bovis* : dissertations / J. R. Pemberton ; Iowa State Univ. – Ames, Iowa, 1971. – 115 p. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-2247>
7. Получение высокоактивного и специфичного аллергена для массовой диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота с помощью ультрафильтрации / А. П. Лысенко [и др.] // *Ветеринар. медицина Беларуси*. – 2001. – № 4–№ 1. – 2002. – С. 12–14.
8. Лысенко, А. П. Антигенный состав ППД туберкулина для млекопитающих / А. П. Лысенко // *Ветеринария*. – 1989. – № 5. – С. 30–32.
9. Honda, J. R. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches / J. R. Honda, R. Viridi, E. D. Chan // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – Art. 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029>
10. Шаров, А. Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных и повышение ее эффективности : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03 / А. Н. Шаров. – М., 1989. – 37 с.
11. Выявление больного туберкулезом крупного рогатого скота в состоянии анергии к туберкулину / А. Х. Найманов [и др.] // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. – 2019. – № 1. – С. 17–21. <https://doi.org/10.26155/vet.zoo.bio.201901003>
12. Козлов, В. Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: совершенствование производства и стандартизация : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23, 16.00.03 / В. Е. Козлов ; Центр качества и стандартизации лекарств. средств для животных и кормов. – М., 2007. – 43 с.
13. Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG / C. Abou-Zeid [et al.] // *Infection a. Immunity*. – 1988. – Vol. 56, N 12. – P. 3046–3051. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.12.3046-3051.1988>
14. Wiker, H. A localization index for distinction between extracellular and intracellular antigens of *Mycobacterium tuberculosis* / H. Wiker, M. Harboe, S. Nagai // *J. of General Microbiology*. – 1991. – Vol. 137, N 4. – P. 875–884. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-4-8751991>
15. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells / M. Harboe [et al.] // *Infection a. Immunity*. – 1998. – Vol. 66, N 1. – P. 289–296. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.289-296.1998>
16. Olds, G. R. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies / G. R. Olds, A. J. Sanson, T. M. Daniel // *J. of Clinical Microbiology*. – 1987. – Vol. 25, N 3. – P. 471–475. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.3.471-475.1987>
17. Wiker, H. G. MPB 70 and MPB 83 – major antigens of *Mycobacterium bovis* / H. G. Wiker // *Scand. J. of Immunology*. – 2009. – Vol. 69, N 6. – P. 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02256.x>
18. Hall, M. R. Preparation of biologically active components of *Mycobacterium bovis* using Triton X-100 or potassium chloride / M. R. Hall, C. O. Thoen // *Amer. J. of Veterinary Research*. – 1983. – Vol. 44, N 8. – P. 1602–1604.
19. Оценка эффективности термического обеззараживания молока туберкулин-положительных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и живот. мир*. – 2017. – № 1. – С. 41–47.
20. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: эпидемиологические, клинико-диагностические, медико-социальные и организационно-правовые аспекты противотуберкулезной помощи в странах СНГ : материалы I Междунар. заоч. науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Центр. науч.-исслед. ин-т туберкулеза, Рост. гос. мед. ун-т. – Ростов н/Д, 2014. – С. 176–198.*
21. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и живот. мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.

22. Cwd tuberculosis found in spongiform disease formerly attributed to prions: its implication towards mad cow disease, scrapie and Alzheimer's / A. P. Lysenko [et al.] // *J. of MPE Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, N 3:3. – P. 1–13. <https://doi.org/10.5281/zenodo.894183>

23. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / А.Э. Высоцкий [и др.] // *Эпизоотология. Иммунобиология. Фармакология. Санитария*. – 2019. – №2. – С. 26–35.

References

1. World Organisation for Animal Health. *Terrestrial animal health code*. 28th ed. Paris, OIE, 2019. 2 vol.
2. Monaghan M. L., Doherty M. L., Collins J. D., Kazda J. F., Quinn P. J. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology*, 1994, vol. 40, no. 1-2, pp. 111-124. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90050-7)
3. Cousins D. V. Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 2001, vol. 20, no. 1, pp. 71-85. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1263>
4. World Organisation for Animal Health. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2012: OIE Terrestrial manual 2012*. 7th ed. Paris, 2012. 2 vol.
5. Seibert F. B., Glenn J. T. Tuberculin purified protein derivative: preparation and analyses of a large quantity for standard. *American Review of Tuberculosis*, 1941, vol. 44, no. 1, pp. 9-25.
6. Pemberton J. R. *Chemical, physical, and immunological characteristics of purified protein derivatives from Mycobacterium bovis: dissertations*. Ames, Iowa, 1971. 115 p. <https://doi.org/10.31274/rtd-180813-2247>
7. Lysenko A. P., Bezgin V. M., Kozlov V. E., Pritychenko A. N. Obtaining a highly active and specific allergen for the mass diagnosis of tuberculosis in cattle using ultrafiltration. *Veterinarnaya meditsina Belarusi* [Veterinary Medicine of Belarus], 2001, no. 4–1 (2002), pp. 12-14 (in Russian).
8. Lysenko A. P. Antigenic composition of PPD tuberculin for mammals. *Veterinariya* [Veterinary], 1989, no. 5, pp. 30-32 (in Russian).
9. Honda J. R., Viridi R., Chan E. D. Global environmental nontuberculous mycobacteria and their contemporaneous man-made and natural niches. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, art. 2029. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02029>
10. Sharov A. N. *Allergic tuberculosis diagnosis of animals and increasing of its effectiveness*. Abstract of Ph.D. diss. Moscow, 1989. 37 p. (in Russian).
11. Naimanov A. Kh., Kalmykov V. M., Kalmykova M. S., Mukovnin A. A. Identification of cattle infected with tuberculosis in the state of anergy to tuberculin. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya = Veterinary Medicine, Zootechnics and Biotechnology*, 2019, no. 1, pp. 17-21 (in Russian). <https://doi.org/10.26155/vet.zoo.bio.201901003>
12. Kozlov V. E. *Allergens for tuberculosis diagnosis: production improvement and standardization*. Abstract of Ph.D. diss. Moscow, 2007. 43 p. (in Russian).
13. Abou-Zeid C., Ratliff T. L., Wiker H. G., Harboe M., Bennedsen J., Rook G. A. Characterization of fibronectin-binding antigens released by Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis BCG. *Infection and Immunity*, 1988, vol. 56, no. 12, pp. 3046-3051. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.12.3046-3051.1988>
14. Wiker H. G., Harboe M., Nagai S. A localization index for distinction between extracellular and intracellular antigens of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of General Microbiology*, 1991, vol. 137, no. 4, pp. 875–884. <https://doi.org/10.1099/00221287-137-4-875>
15. Harboe M., Wiker H. G., Ulvund G., Lund-Pedersen B., Andersen Å. B., Hewinson R. G., Nagai S. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infection and Immunity*, 1998, vol. 66, no. 1, pp. 289–296. <https://doi.org/10.1128/iai.66.1.289-296.1998>
16. Olds G. R., Sanson A. J., Daniel T. M. Characterization of Mycobacterium tuberculosis antigen 5 epitopes by using a panel of 19 monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987, vol. 25, no. 3, pp. 471–475. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.3.471-475.1987>
17. Wiker H. G. MPB 70 and MPB 83 – major antigens of Mycobacterium bovis. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2009, vol. 69, no. 6, pp. 492–499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02256.x>
18. Hall M. R., Thoen C. O. Preparation of biologically active components of Mycobacterium bovis using Triton X-100 or potassium chloride. *American Journal of Veterinary Research*, 1983, vol. 44, no. 8, pp. 1602-1604.
19. Lysenko A. P., Vlasenko V. V., Krasnikova E. L., Van Kh. Evaluation of the efficiency of thermal disinfection of milk from tuberculin-positive cows using methods for detecting CWD forms of mycobacterium tuberculosis. *Ekologiya i zhivotnyi mir* [Ecology and Fauna], 2017, no. 1, pp. 41-47 (in Russian).
20. Lysenko A. P., Vlasenko V. V., Broxmeyer L., Lemish A. P., Novik T. P., Bukova N. K., Mikhalevich E. A., Bogdanovich S. V. The phenomenon of variability of mycobacterium tuberculosis and its use for the detection of tuberculosis infection. *Tuberkulez – global'naya katastrofa chelovechestva: epidemiologicheskie, kliniko-diagnosticheskie, mediko-sotsial'nye i organizatsionno-pravovye aspekty protivotuberkuleznoi pomoshchi v stranakh SNG: materialy I Mezhdunarodnoi zaochnoi nauchno-prakticheskoi konferentsii, 24 marta 2014 g.* [Tuberculosis as a global disaster of the mankind: epidemiological, clinic diagnostic, medico-social, organizational and legal aspects of anti-tuberculosis care in the CIS countries: proceedings of I International correspondence scientific and practical conference, March 24, 2014]. Rostov-on-Don, 2014, pp. 176-198 (in Russian).
21. Lysenko A. P., Vlasenko V. V., Krasnikova E. L., Lemish A. P., Aksenichik M. A., Pritychenko A. N. Is bovine leukemia virus a virus-like form of mycobacterium tuberculosis? *Ekologiya i zhivotnyi mir* [Ecology and Fauna], 2019, no. 1, pp. 15-24 (in Russian).

22. Lysenko A. P., Broxmeyer L., Vlasenko V. V., Krasochko P. A., Lemish A. P., Krasnikova E. L. Cwd tuberculosis found in spongiform disease formerly attributed to prions: its implication towards mad cow disease, scrapie and Alzheimer's. *Journal of MPE Molecular Pathological Epidemiology*, 2017, vol. 3, no. 3:3, pp. 1–13. <https://doi.org/10.5281/zenodo.894183>

23. Vysotskii A. E., Lysenko A. P., Kuchval'skii M. V., Krasnikova E. L., Prokopenko T. M. Mycobacterium tuberculosis after lethal exposure to disinfectants can restore viability in the form of mycobacteria with a defective cell wall. *Epizootologiya. Immunobiologiya. Farmakologiya. Sanitariya* [Epizootology. Immunobiology. Pharmacology. Sanitation], 2019, no. 2, pp. 26-35 (in Russian).

Информация об авторах

Притыченко Андрей Николаевич – кандидат ветеринарных наук, доцент, директор филиала, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: bievmvitebsk@gmail.com

Лысенко Александр Павлович – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом молекулярной биологии, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lysenkoap@tut.by

Кучвальский Максим Владимирович – аспирант, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kuchvalskimv@gmail.com

Красникова Елена Леонидовна – научный сотрудник отдела молекулярной биологии, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: krasnikovy@tut.by

Information about authors

Andrei N. Prytychenko – Ph. D. (Veterinary), Associate Professor. Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Wyshelesky, National Academy of Sciences of Belarus (28 Briketa Str., Minsk 220003, Republic of Belarus). E-mail: bievmvitebsk@gmail.com

Aleksandr P. Lysenko – D. Sc. (Veterinary), Professor. Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Wyshelesky, National Academy of Sciences of Belarus (28 Briketa Str., Minsk 220003, Republic of Belarus). E-mail: lysenkoap@tut.by

Maxim V. Kuchvalski – M. S. (Veterinary), Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Wyshelesky, National Academy of Sciences of Belarus (28 Briketa Str., Minsk 220003, Republic of Belarus), PhD Student. E-mail: uchvalskimv@gmail.com

Elena L. Krasnikova – Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Wyshelesky (28 Briketa Str., Minsk 220003, Republic of Belarus), Researcher. E-mail: krasnikovy@tut.by