

ISSN 1561-8323 (Print)
ISSN 2524-2431 (Online)

БИОЛОГИЯ
BIOLOGY

УДК 679.66:615.371+579.842.11
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-2-185-190>

Поступило в редакцию 20.01.2021
Received 20.01.2021

**И. С. Казловский¹, член-корреспондент А. И. Зинченко¹, А. В. Соловьева²,
О. Н. Новикова², Ю. В. Ломако²**

¹*Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь*

²*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого, Минск, Республика Беларусь*

**СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI*,
ПРОДУЦИРУЮЩЕГО СУБЪЕДИНИЦУ ГОМОЛОГИЧНОГО
ТЕРМОЛАБИЛЬНОГО ТОКСИНА**

Аннотация. Колибактериоз – это остро протекающая зоонозная болезнь, проявляющаяся септициемией, токсемией, энтеритом, обезвоживанием организма и поражением центральной нервной системы. Энтеротоксигенные штаммы *Escherichia coli* занимают одно из ведущих мест в этиологической структуре колибактериоза телят во многих животноводческих хозяйствах Республики Беларусь. Основная причина, из-за которой развивается данная болезнь, это наличие термолабильных и термостабильных токсинов в штамме-возбудителе. Субъединица В термолабильного токсина является сильным антигеном, который позволяет домашним животным приобрести иммунитет против диареи крупного рогатого скота, вызванной *E. coli*. Многие зарубежные вакцины, используемые против кишечных инфекций крупного рогатого скота, содержат в себе либо нативный, либо рекомбинантный вариант субъединицы В. В результате выполнения работы нами создан новый штамм *E. coli* 42eLTB – продуцент рекомбинантной субъединицы В термолабильного токсина энтеротоксикогенного штамма *E. coli*. При этом продуцирующая способность полученного штамма составляет 480 мг с 1 л культуральной жидкости, что превышает аналогичный показатель уже известных штаммов в 1,37 раза.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, термолабильный токсин, колибактериоз, генная инженерия, рекомбинантный штамм

Для цитирования. Создание рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, продуцирующего субъединицу гомологичного термолабильного токсина / И. С. Казловский [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2021. – Т. 65, № 2. – С. 185–190. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-2-185-190>

**Ilia S. Kazlouski¹, Corresponding Member Anatoly I. Zinchenko¹, Anastasiya V. Solovyova²,
Oksana N. Novikova², Yuri V. Lomako²**

¹*Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

²*S. N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine, Minsk, Republic of Belarus*

**CONSTRUCTION OF THE RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* STRAIN PRODUCING
A HOMOLOGOUS THERMOLABILE TOXIN SUBUNIT**

Abstract. Colibacteriosis is an acute zoonotic disease manifested by septicaemia, toxemia, enteritis, body dehydration, and central nervous system damage. Depending on the presence of virulence factors and the nature of interaction with the intestinal mucosa, enterotoxigenic, enteroinvasive, enteropathogenic, and enterohemorrhagic *E. coli* are isolated. Enterotoxigenic strains of *E. coli* occupy one of the leading places in the etiological structure of calf colibacteriosis in many livestock farms of the Republic of Belarus. The main reason why this disease develops is the presence of thermolabile and thermostable toxins in the causative strain. The thermolabile toxin subunit B is a potent antigen that allows pet immunity to be acquired against *E. coli*-induced cattle diarrhea. Many foreign vaccines used against intestinal infections of cattle contain either a native or recombinant variant of the subunit B. As a result of the work, we have created a new strain of *E. coli* 42eLTB – the producer of the recombinant subunit B of the thermolabile toxin *E. coli*. The producing capacity of the obtained strain is 480 mg with 1 culture liquid liter, which exceeds the already known strains 1.37 times.

Keywords: *Escherichia coli*, thermolabile toxin, colibacteriosis, genetic engineering, recombinant strain

For citation. Kazlouski I. S., Zinchenko A. I., Solovyova A. V., Novikova O. N., Lomako Y. V. Construction of the recombinant *Escherichia coli* strain producing a homologous thermolabile toxin subunit. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 2, pp. 185–190 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-2-185-190>

Введение. Основными факторами вирулентности энтеропатогенных штаммов *Escherichia coli* являются факторы адгезии, способствующие колонизации бактериями энтероцитов тонкого отдела кишечника, а также способность к продукции термолабильного [1–3] и термостабильного токсинов. Термолабильные (LT) и/или термостабильные токсины вызывают секрецию энтероцитами жидкости и электролитов, что сопровождается водянистой диареей, истощением и гибелью человека или животного.

Термолабильный токсин *E. coli* функционально аналогичен холерному токсину и состоит из пяти В-субъединиц и одной активной субъединицы А. Субъединица В токсина *E. coli* (далее «субъединица токсина») облегчает проникновение в клетку субъединицы А, которая активирует аденилатциклазу. Затем происходит увеличение концентрации цАМФ, что приводит к повышению секреции хлоридов и воды и уменьшению реабсорбции внутрь клетки ионов натрия. В просвете кишечника скапливается жидкость и развивается диарейный синдром. Термолабильный токсин имеет молекулярную массу 86 кДа, является антигеном и при попадании в организм стимулирует выработку нейтрализующих антител. Термостабильный токсин в связи с его низкой молекулярной массой (2–5 кДа) практически лишен иммуногенных свойств [4].

Из анализа литературных данных последних лет [4–6] следует вывод о том, что перспективным направлением инноваций в разработке вакцин для профилактики болезней, вызванных энтеропатогенными и энтеротоксигенными штаммами *E. coli*, является включение в их состав факторов вирулентности и, в первую очередь, токсидов термолабильного токсина. Экспериментально доказано, что включение термолабильных токсидов *E. coli* в состав вакцинных препаратов обеспечивает защиту не только против LT-продуцирующих штаммов *E. coli*, но также повышает неспецифический иммунитет против ряда бактериальных патогенов (представителей родов *Salmonella*, *Campylobacter* и др.) [5].

Таким образом, включение в состав поливалентных вакцин для профилактики желудочно-кишечных заболеваний телят термолабильного токсина *E. coli* может существенно повысить профилактический эффект вакцинации и экономический эффект от их применения.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящей работы служило создание штамма-продуцента рекомбинантной субъединицы токсина для последующего использования в специфической профилактике желудочно-кишечных бактериальных инфекций крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследования. Источником гена субъединицы токсина (*eLTB*) служила ДНК бактерий *E. coli* O157:H7, выделенная из бактериальной биомассы с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, США). Целевой фрагмент ДНК амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матрицы геномной ДНК и синтетических праймеров. Подбор олигонуклеотидов проводили с использованием программного обеспечения UGENE 1.22 (UniPro, Россия) на основе последовательностей гена субъединицы токсина. На 5'-окончания праймеров были добавлены последовательности, комплементарные плазмиде pET42a+ (Novagen, США). На втором этапе линеаризовали плазмиду pET42a+ методом ПЦР с использованием Diamant-ДНК-полимеразы (Институт микробиологии НАН Беларуси, Беларусь). На третьем этапе собирали линеаризованный вектор и целевые гены методом продолжительной перекрывающейся ПЦР (ПП-ПЦР) [7]. На этом этапе в качестве матрицы и затравки были использованы фрагменты, полученные на первых двух этапах, в эквимольных количествах.

Синтезированным в ходе ПП-ПЦР продуктом трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue (Novagen) с последующим высевом на плотную селективную питательную среду LB с добавлением канамицина (100 мкг/мл).

Рестрикционный и ПЦР-анализ полученных клонов осуществляли по стандартным методикам. Результаты визуализировали с помощью электрофореза и обрабатывали с использованием

системы гель-документирования и программного обеспечения BioRad. Секвенирование клонов проводили при помощи автоматизированной системы генетического анализа Beckman Coulter GenomeLab GeXP™ (BeckmanCoulter, США).

Из полученных трансформантов при помощи щелочного лизиса выделяли плазмиды, которые в дальнейшем использовали для трансформации электрокомпетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3). Клетки-трансформанты выращивали в среде LB с канамицином (80 мкг/мл) до оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) 0,6 ($\lambda = 600$ нм), затем индуцировали синтез белка 0,5 мМ изопропил- β -тиогактопиранозидом (ИПТГ). Анализ процентного содержания целевого белка осуществляли используя программу ImageLab (BioRad, США).

По окончании культивирования клетки осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 300 мМ NaCl и 20 мМ имидазола. Ультразвуковую дезинтеграцию клеток проводили в приборе Sonifier-450 (Branson, США) при следующих режимах: мощность – 0,05 кВт; температура – 4 °С; продолжительность – 600 импульсов по 0,5 с. Клеточный лизат осветляли центрифугированием при 60 000 g в течение 30 мин. Осадок, содержащий «тела включения», отмывали 8 М раствором мочевины в течение 2 ч и подвергали центрифугированию. Супернатант наносили на хроматографическую колонку со смолой Ni-NTA (Qiagen, США). Белок элюировали 50 мМ Na-фосфатным буфером (рН 8,0), содержащим 300 мМ NaCl и 500 мМ имидазола. Полученные в результате аффинной хроматографии образцы анализировали с помощью ДСН-полиакриламидного гель-электрофореза. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и диализовали против 100-кратного объема 50 мМ Трис-HCl-буфера (рН 8,0), содержащего 100 мМ NaCl.

Результаты и их обсуждение. Последовательность гена *eLTB* длиной 372 п. о. выделили из геномной ДНК *E. coli* O157:H7 при помощи ПЦР. Затем провели линейризацию вектора pET42a(+) длиной 4976 п. о. Полученные амплификаты проанализировали при помощи 1,5 %-ного агарозного гель-электрофореза (рис. 1).

При постановке ПП–ПЦР в реакционную смесь вносили эквимольное количество линейризованного вектора pET42a и очищенного гена *eLTB*. Полученной ПЦР смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1Blue (ThermoFisher, США).

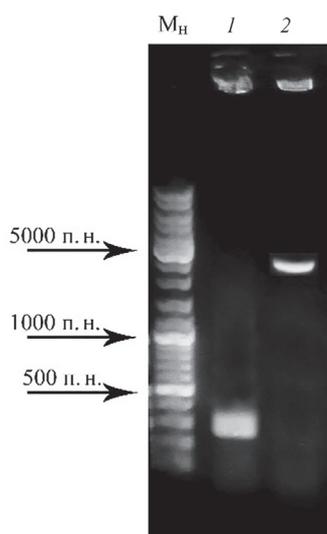


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР-амплификации гена *eLTB* (1) и вектора pET42a(+) (2). M_n (здесь и далее) – маркер молекулярных масс фрагментов ДНК

Fig. 1. Electrophoregram of PCR amplification products of *eLTB* gene (1) and pET42a(+) (2). M_n – molecular weight marker of DNA fragments (hereinafter)

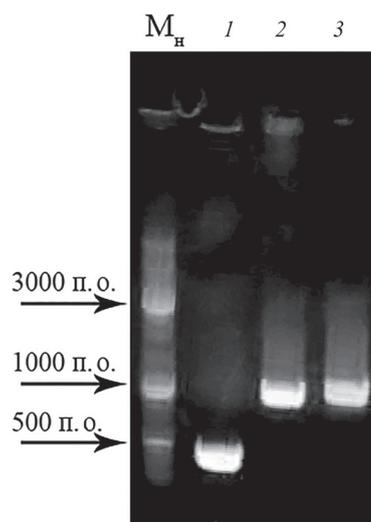


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР-анализа ДНК, изолированной из трех колоний, образованных клетками-трансформантами

Fig. 2. Electrophoregram of PCR analysis products of DNA isolated from three colonies, formed by transformed cells

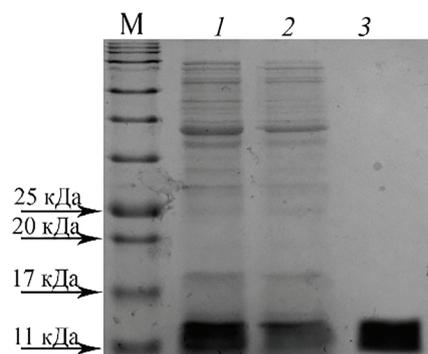


Рис. 3. Электрофореграмма белкового состава клеток *E. coli* 42eLTB: общий клеточный белок (1), тела включения (2) и очищенная субъединица токсина (3). М – положение и молекулярные массы (кДа) стандартных белков

Fig. 3. Electrophoregram of the protein composition of *E. coli* 42eLTB cells: total cell protein (1), inclusion bodies (2) and purified subunit of endotoxin (3). M – protein molecular weight markers

Сконструированной ранее плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3). В результате был создан штамм *E. coli* 42eLTB – продуцент рекомбинантной субъединицы токсина *E. coli*, молекула которого содержит дополнительный октагистидиновый олигопептид на С-конце.

При экспрессии белка в указанном выше штамме с применением 0,5 мМ ИПТГ доля целевого белка с молекулярной массой около 15 кДа (что соответствует теоретически рассчитанной молекулярной массе субъединицы токсина) составляет 81,2 % от общего клеточного белка (рис. 3).

Продуцирующая способность штамма *E. coli* 42eLTB составила 480 мг субъединицы токсина с 1 л КЖ, что превышает аналогичный показатель лучшего из известных в 1,37 раз [8–10].

Следует подчеркнуть, что введение в рамку считывания гена дополнительного олигонуклеотида, кодирующего октагистидиновый олигопептид на С-конце белковой молекулы, позволило в одну стадию получить высокоочищенный препарат белка с выходом 97 %. В результате, после очистки с помощью хроматографии и последующего концентрирования белка путем постановки диализа из 200 мл КЖ было получено 25 мг белка с выходом 26 %.

Закключение. Впервые создана генетическая конструкция, включающая в себя ген субъединицы В термолabile токсина *E. coli*, выделенный методом ПЦР и встроенный в вектор рЕТ42a(+). Этой конструкцией были трансформированы клетки *E. coli* BL21 (DE3), что привело к созданию нового рекомбинантного штамма *E. coli* 42eLTB – продуцента рекомбинантной субъединицы В термолabile токсина *E. coli*, содержащей октагистидиновый олигопептид на С-конце молекулы. Такая первичная структура антигена позволяет выделять его из клеточного лизата в одну стадию с использованием металлоаффинной хроматографии на смоле Ni-NTA. Продуцирующая способность полученного нового штамма *E. coli* 42eLTB составила 480 мг белка с 1 л КЖ, что превышает аналогичный показатель лучшего из известных штаммов-продуцентов в 1,37 раза.

ДНК, полученная из колоний бактериальных клеток, в дальнейшем подвергли ПЦР-анализу для подтверждения наличия в ее составе целевого гена в правильной ориентации. Для этого использовали праймеры к последовательности Т7-терминатора и к последовательности, кодирующей целевой белок. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены на рис. 2.

Из данной электрофореграммы следует, что только в одной из трех колоний присутствует ген *eLTB* в правильной ориентации. Такая колония была выбрана для дальнейшей работы.

Из выбранного штамма-трансформанта изолировали плазмиду при помощи щелочного лизиса. Выделенную кольцевую молекулу проверили рестрикционным анализом по сайту узнавания рестриктазы *HindIII* и секвенированием, для подтверждения факта отсутствия нежелательных спонтанных мутаций, появившихся в гене субъединицы токсина. По результатам этих анализов был сделан вывод о том, что полученная линейная молекула ДНК соответствует теоретически рассчитанной массе – 5386 п. о. и полинуклеотидная последовательность, кодирующая субъединицу токсина, совпадает с первоначальной последовательностью гена *eLTB*.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Characterization of heat-labile toxin-subunit B from *Escherichia coli* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry / I. Sospedra [et al.] // *Food Chem. Toxicol.* – 2012. – Vol. 50, N 11. – P. 3886–3891. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.014>
2. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* / Q. Duan [et al.] // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – Art. 292. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00292>
3. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in Centella (*Centella Asiatica* (L.) Urban) via biolistic transformation / N. H. Loc [et al.] // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2020. – Vol. 21, N 10. – P. 973–979. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200226094150>
4. Hur, J. Ontology-based literature mining of *E. coli* vaccine-associated gene interaction networks / J. Hur, A. Özgür, Y. He // *J. Biomed. Semantics.* – 2017. – Vol. 8, N 1. – Art. 12. <https://doi.org/10.1186/s13326-017-0122-4>
5. Th1-biased immunoadjuvant effect of the recombinant B subunit of an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen via intranasal immunization in mice / F. Su [et al.] // *J. Vet. Med. Sci.* – 2019. – Vol. 81, N 10. – P. 1475–1484. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0057>
6. Hur, J. A 2018 workshop: vaccine and drug ontology studies (VDOS 2018) / J. Hur, C. Tao, Y. He // *BMC Bioinformatics.* – 2019. – Vol. 20, N 21. – Art. 705. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3191-9>
7. Quan, J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways / J. Quan, J. Tian // *PLoS ONE.* – 2009. – Vol. 4, N 7. – Art. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
8. Immunization with recombinant fusion of LTB and linear epitope (40–62) of epsilon toxin elicits protective immune response against the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D / H. Kaushik [et al.] // *AMB Expr.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 105–116. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0824-3>
9. Secretory Expression and Purification of Recombinant *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit and its Applications on Intranasal Vaccination of Hantavirus / S. Cao [et al.] // *Mol. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 41, N 2. – P. 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9101-4>
10. Efficient extracellular production of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit by using the expression/secretion system of *Bacillus brevis* and its mucosal immunoadjuvanticity / S. Kozuka [et al.] // *Vaccine.* – 2000. – Vol. 18, N 17. – P. 1730–1737. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00547-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00547-2)

References

1. Sospedra I., Simone C., Soriano J. M., Mañes J., Ferranti P., Ritieni A. Characterization of heat-labile toxin-subunit B from *Escherichia coli* by liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, vol. 50, no. 11, pp. 3886–3891. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.014>
2. Duan Q., Xia P., Nandre R., Zhang W., Zhu G. Review of newly identified functions associated with the heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, vol. 9, art. 292. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00292>
3. Loc N. H., Tung N. V., Kim P. T. A., Yang M. S. Expression of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit in Centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) via biolistic transformation. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2020, vol. 21, no. 10, pp. 973–979. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200226094150>
4. Hur J., Özgür A., He Y. Ontology-based literature mining of *E. coli* vaccine-associated gene interaction networks. *Journal of Biomedical Semantics*, 2017, vol. 8, no. 1, art. 12. <https://doi.org/10.1186/s13326-017-0122-4>
5. Su F., Xu L., Xue Y., Li J., Fu Y., Yu B., Wang S., Yuan X. Th1-biased immunoadjuvant effect of the recombinant B subunit of an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on an inactivated porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen via intranasal immunization in mice. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2019, vol. 81, no. 10, pp. 1475–1484. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0057>
6. Hur J., Tao C., He Y. A 2018 workshop: vaccine and drug ontology studies (VDOS 2018). *BMC Bioinformatics*, 2019, vol. 20, no. 21, art. 705. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3191-9>
7. Quan J., Tian J. Circular polymerase extension cloning of complex gene libraries and pathways. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 7, art. e6441. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006441>
8. Kaushik H., Deshmukh S. K., Solanki A. K., Bhatia B., Tiwari A., Garg L. C. Immunization with recombinant fusion of LTB and linear epitope (40–62) of epsilon toxin elicits protective immune response against the epsilon toxin of *Clostridium perfringens* type D. *AMB Express*, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 105–116. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0824-3>
9. Cao S., Zhang Y., Liu F., Wang Q., Zhang Q., Liu Q., Li C., Liang M., Li D. Secretory Expression and Purification of Recombinant *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin B Subunit and its Applications on Intranasal Vaccination of Hantavirus. *Molecular Biotechnology*, 2009, vol. 41, no. 2, pp. 91–98. <https://doi.org/10.1007/s12033-008-9101-4>
10. Kozuka S., Yasuda Y., Isaka M., Masaki N., Taniguchi T., Matano K., Moriyama A., Ohkuma K., Goto N., Udaka S., Tochikudo K. Efficient extracellular production of recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit by using the expression/secretion system of *Bacillus brevis* and its mucosal immunoadjuvanticity. *Vaccine*, 2000, vol. 18, no. 17, pp. 1730–1737. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00547-2](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00547-2)

Информация об авторах

Казловский Илья Сергеевич – науч. сотрудник. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

Зинченко Анатолий Иванович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, заведующий лабораторией. Институт микробиологии НАН Беларуси (ул. Купревича, 2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.

Соловьева Анастасия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sol_nastasya@mail.ru.

Новикова Оксана Николаевна – канд. вет. наук, вед. науч. сотрудник. Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: oksana68on@mail.ru.

Ломако Юрий Васильевич – канд. вет. наук, директор. Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220063, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lamakajuri@mail.ru.

Information about the authors

Kazlouski Illia S. – Researcher. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kazlouski.illia@gmail.com.

Zinchenko Anatoliy I. – Corresponding Member, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus (2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zinch@mbio.bas-net.by.

Solovyeva Anastasiya V. – Junior researcher. S. N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28, Briket Str., 220063, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sol_nastasya@mail.ru.

Novikova Oksana N. – Ph. D. (Veterinary Medicine), Leading researcher. S. N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28, Briket Str., 220063, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: oksana68on@mail.ru.

Lomako Yuri V. – Ph. D. (Veterinary Medicine), Director. S. N. Vyshellessky Institute of Experimental Veterinary Medicine (28, Briket Str., 220063, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lamakajuri@mail.ru.