

Научная статья/Research Article

УДК 619:615.37:619:616.24-002.5:636.91

DOI: 10.36718/1819-4036-2023-9-104-110

Иван Николаевич Кошкин<sup>1✉</sup>, Василий Сергеевич Власенко<sup>2</sup>, Валентина Ивановна Плешакова<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия

<sup>2</sup>Омский аграрный научный центр, Омск, Россия

<sup>1</sup>in.koshkin@omgau.org

<sup>2</sup>vvs-76@list.ru

<sup>3</sup>vi.pleshakova@omgau.org

## ВЛИЯНИЕ КОНЬЮГАТОВ АНТИГЕНОВ БЦЖ С БЕТУЛИНОМ И БЕТУЛИНОВОЙ КИСЛОТОЙ НА ЦИТОГИСТОАРХИТЕКТонику ПЕЧЕНИ МОРСКИХ СВИНОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

Цель исследования – изучение динамики гистологических изменений в печени морских свинок при введении конъюгатов антигенов БЦЖ с бетулином и его производным бетулиновой кислотой на фоне заражения вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14). Для проведения опыта были сформированы 3 группы из 15 морских свинок: особям группы № 1 ( $n = 5$ ) осуществляли подкожные инъекции 0,5 мл водного раствора натрия хлорида; животным группы № 2 ( $n = 5$ ) тем же способом вводили антигенный комплекс БЦЖ с бетулиновой кислотой в дозе 1000 мкг/мл в объеме 0,5 мл; группы № 3 ( $n = 5$ ) – антигенный комплекс БЦЖ с бетулином в дозе 500 мкг/мл в объеме 0,5 мл. Через 30 сут животных всех групп инфицировали вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14), а затем спустя еще 45 сут подвергли этаназии ингаляционным наркозом парами эфира с последующим отбором биоптатов печени для проведения гистологических исследований. Анализ полученных результатов гистологических исследований печени морских свинок свидетельствует о том, что применение конъюгатов антигенов БЦЖ с бетулином и бетулиновой кислотой способствует дифференцировке как холангиоцитов желчных протоков, так и размножению стволовых гепатоцитов с дальнейшим их превращением в дифференцированные гепатоциты. Принимая во внимание полученные данные, можно сделать предположение, что бетулиновая кислота и бетулин активизируют регенеративные процессы и в дальнейшем способствуют восстановлению паренхимы органа. Считаем, что для обоснованных выводов о генеративных возможностях препаратов на основе бетулина и бетулиновой кислоты необходимо проводить дальнейшие клинические, лабораторные, гистологические и гистохимические исследования.

**Ключевые слова:** туберкулез, морские свинки, антигены БЦЖ, конъюгаты, бетулин, печень, гистосрезы

**Для цитирования:** Кошкин И.Н., Власенко В.С., Плешакова В.И. Влияние конъюгатов антигенов БЦЖ с бетулином и бетулиновой кислотой на цитогистоархитектонику печени морских свинок при экспериментальном туберкулезе // Вестник КрасГАУ. 2023. № 9. С. 104–110. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-9-104-110.

Ivan Nikolaevich Koshkin<sup>1✉</sup>, Vasily Sergeevich Vlasenko<sup>2</sup>, Valentina Ivanovna Pleshakova<sup>3</sup>

<sup>1,3</sup>Omsk State Agrarian University named after. P.A. Stolypin, Omsk, Russia

<sup>2</sup>Omsk Agricultural Research Center, Omsk, Russia

<sup>1</sup>in.koshkin@omgau.org

<sup>2</sup>vvs-76@list.ru

<sup>3</sup>vi.pleshakova@omgau.org

© Кошкин И.Н., Власенко В.С., Плешакова В.И., 2023

Вестник КрасГАУ. 2023. № 9. С. 104–110.

Bulliten KrasSAU. 2023;(9):104–110.

## THE INFLUENCE OF BCG ANTIGENS CONJUGATES WITH BETULIN AND BETULINIC ACID ON LIVER CYTOHISTOARCHITECTONICS OF GUINEA PIGS IN EXPERIMENTAL TUBERCULOSIS

The purpose of research is to study the dynamics of histological changes in the liver of guinea pigs upon administration of conjugates of BCG antigens with betulin and its derivative betulinic acid against the background of infection with a virulent culture of *M. bovis* (item 14). To conduct the experiment, 3 groups of 15 guinea pigs were formed: individuals of group № 1 ( $n = 5$ ) received subcutaneous injections of 0.5 ml of an aqueous solution of sodium chloride; animals of group № 2 ( $n = 5$ ) were administered the antigenic complex of BCG with betulinic acid in the same way at a dose of 1000  $\mu\text{g/ml}$  in a volume of 0.5 ml; group № 3 ( $n = 5$ ) – antigenic complex of BCG with betulin at a dose of 500  $\mu\text{g/ml}$  in a volume of 0.5 ml. After 30 days, animals of all groups were infected with a virulent culture of *M. bovis* (pcs. 14), and then after another 45 days they were euthanized by inhalation anesthesia with ether vapor, followed by the selection of liver biopsies for histological studies. Analysis of the results of histological studies of the liver of guinea pigs indicates that the use of conjugates of BCG antigens with betulin and betulinic acid promotes the differentiation of both cholangiocytes of the bile ducts and the proliferation of stem hepatocytes with their further transformation into differentiated hepatocytes. Taking into account the data obtained, it can be assumed that betulinic acid and betulin activate regenerative processes and further contribute to the restoration of organ parenchyma. We believe that in order to make informed conclusions about the generative capabilities of drugs based on betulin and betulinic acid, it is necessary to conduct further clinical, laboratory, histological and histochemical studies.

**Keywords:** tuberculosis, guinea pigs, BCG antigens, conjugates, betulin, liver, histosections

**For citation:** Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Pleshakova V.I. The influence of BCG antigens conjugates with betulin and betulinic acid on liver cytohistoarchitectonics of guinea pigs in experimental tuberculosis // Bulliten KrasSAU. 2023;(9): 104–110. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-9-104-110.

**Введение.** В настоящее время, несмотря на ряд положительных тенденций, достигнутых в профилактике и борьбе с туберкулезом сельскохозяйственных животных, он все еще является значимой эпизоотической проблемой глобального масштаба [1–3]. В Российской Федерации на текущий момент обстановка по данной инфекционной патологии остается напряженной [3, 4]. По данным ряда исследователей это может быть связано с малоэффективностью противотуберкулезных программ, а также высокой потенциальной возможностью персистенции возбудителя туберкулеза во внешней среде и организме животных-бактерионосителей [3–6].

Помочь в борьбе с туберкулезом в таких случаях может вакцинация БЦЖ, однако, по мнению ряда исследователей, ее эффективность не во всех случаях позволяет достичь желаемого результата. Поэтому особую актуальность приобретает разработка бустерных вакцин, позволяющих усилить или пролонгировать защитный эффект БЦЖ и улучшить ее протективные характеристики [2, 5–7]. В частности в ряде исследований было показано, что конъюгаты антигенов БЦЖ и производных бетулина положительно

влияли на повышение сопротивляемости организма к бактериям *M. bovis* и стимулировали репаративно-регенеративные процессы в некоторых органах, в частности в печени [5, 6].

Печень является многофункциональным органом и взаимодействует с другими органами и системами организма, при развитии патологического процесса в печени нарушаются ее основные функции (барьерная, метаболическая и экскреторная), что проявляется разными клиническими признаками и изменениями в организме [8–10].

Известно, что печень обладает очень высокой способностью к регенерации, современные данные свидетельствуют о том, что различные типы клеток и механизмы ответственны за восстановление печени в зависимости от характера ее повреждения. Ряд исследователей полагают, что процесс регенерации осуществляется с участием различных гистогенетических механизмов и клеточных популяций бластного пула [10–12]. Некоторые авторы отмечают, что восстановление паренхиматозного компонента печени осуществляется с помощью локальных стволовых прогениторных клеток. Указанные бластные популяции клеток признаны активными структурами ци-

тогенеза гепатоцитов и синусоидальных клеток в связи с тем, что они могут усиливать гены гепатоцитарных протеинов, осуществлять некоторые функции гепатоцитов, и, кроме того, активно участвовать в восстановлении (увеличении) функциональных резервов гепатоцитов [10, 11, 13, 14].

Необходимо указать, что в патогенетические механизмы развития туберкулеза животных наряду с другими органами активно вовлечена и печень, что делает изучение гистологических показателей органа одним из важных аспектов при определении гепатопротекторного действия конъюгатов антигенов БЦЖ и производных бетулина на фоне применения специфической иммунизации.

**Цель исследования** – изучение динамики гистологических изменений в печени морских свинок при введении конъюгатов антигенов БЦЖ с бетулином и его производным бетулиновой кислотой на фоне заражения вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14).

**Материалы и методы.** Для получения антигенных комплексов производили посев вакцинного штамма БЦЖ на жидкую синтетическую питательную среду Сотона, выращенную бактериальную массу подвергали разрушению с помощью ультразвука на гомогенизаторе УЗДН-1, затем гомогенную массу центрифугировали и в надосадочной жидкости определяли с помощью реакции с бромфеноловым синим количество белка, концентрацию которого доводили до 1 мг/мл. Далее к 1 мл антигенов вакцинного штамма добавляли 1000 мкг в случае использования в качестве адъюванта бетулиновой кислоты и 500 мкг – при комплексировании с бетулином, добиваясь полного растворения.

Эксперимент проводили на 15 морских свинках с отрицательной кожной аллергической реакцией на введение ППД-туберкулина для млекопитающих, из которых сформировали 3 группы по 5 особей в каждой: 1-й группе был введен подкожно водный раствор натрия хлорида в объеме 0,5 мл; 2-й группе – подкожно конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой в дозе 1000 мкг/мл белка в объеме 0,5 мл; 3-й группе – подкожно препарат, содержащий

комплекс антигенов БЦЖ с бетулином в дозе 500 мкг/мл белка в объеме 0,5 мл. Через 30 сут животные всех групп были подвергнуты подкожному инфицированию вирулентной культурой *M. bovis* (шт. 14) в дозе 0,001 мг/мл и еще через 45 сут – диагностическому убою.

В дальнейшем от морских свинок всех групп отбирали биоптаты печени для гистологического исследования. Обработку и изготовление из них гистологических препаратов проводили в соответствии с общепринятыми методиками.

**Результаты и их обсуждение.** Проведенные гистологические исследования показали, что в печени морских свинок 1-й группы каких-либо существенных изменений не обнаружено.

Так, гистоархитектоника балочного строения печени сохранена, размер гепатоцитов соответствует норме для данного вида животных, цитоплазма клеток печени гомогенно окрашена в розовый цвет. Вместе с тем в некоторых участках печеночной паренхимы наблюдается небольшое количество гепатоцитов, находящихся на различных стадиях дистрофии. Кроме того, в периваскулярных пространствах печени регистрировали слабовыраженную пролиферацию мононуклеаров.

Необходимо отметить, что у экспериментальных животных 2-й группы, которым за 30 дней до инфицирования культурой *M. bovis* был введен конъюгат антигенов БЦЖ с бетулиновой кислотой, патоморфологических изменений, специфических для течения туберкулезного процесса, не выявлено. В то же время определено, что в некоторых случаях довольно значительная часть паренхиматозного компонента органа находилась на различных стадиях дистрофии. В части печеночных клеток отмечали гидролитическое перерождение и липидную дистрофию. Также в паренхиматозном гистоконпоненте органа наблюдали находящиеся на разных стадиях развития очаги некроза, которые сопровождалась кардио- и цитопикнозом печеночных клеток.

В некоторых участках печеночной паренхимы регистрируются малочисленные зоны, в которых наблюдаются процессы пролиферации недифференцированных клеток (рис. 1).

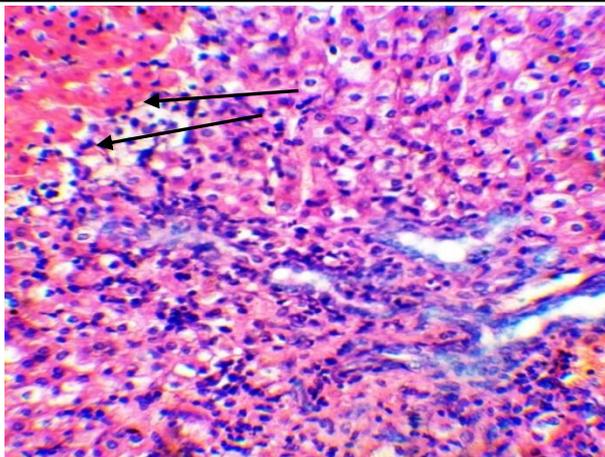


Рис. 1. Печень морской свинки группы № 2 (рядом с участком некроза находится участок с пролиферацией недифференцированных клеток).  
Окраска гематоксилином и эозином, ув. × 100

Можно предположить, что указанный феномен связан с активно происходящими процессами регенерации печеночной паренхимы в целом за счет «камбиальных» гепатоцитов. Вместе с тем в отдельных участках печени отмечается разрастание рыхлой волокнистой ткани с последующей заменой наркотизированных печеночных клеток.

Было отмечено, что в печени морских свинок группы № 3, зараженных культурой *M. Bovis*, через 30 сут после введения антигенного комплекса БЦЖ с бетулином гепатоциты большей части печеночных долек без признаков дистрофии. Гепатоциты имеют однородно окрашенную эозинофильную цитоплазму и округлые светлые ядра. Клетки мелких желчных протоков неболь-

шого размера, низкие призматические. Ядра интенсивно окрашены гематоксилином. Скопления мононуклеаров вокруг кровеносных сосудов и желчных протоков в большинстве триад печени не установлены.

В некоторых участках наблюдается разрастание атипичных клеток, которые по внешним признакам напоминают недифференцированные клетки желчных протоков печени эмбрионов. Клетки имеют преимущественно округлую форму, базофильную цитоплазму и круглое светлое ядро. Эти разрастания занимают значительные участки в некоторых дольках (рис. 2). Проллиферирующие атипичные клетки образуют трубчатые структуры, или клеточные тяжи.

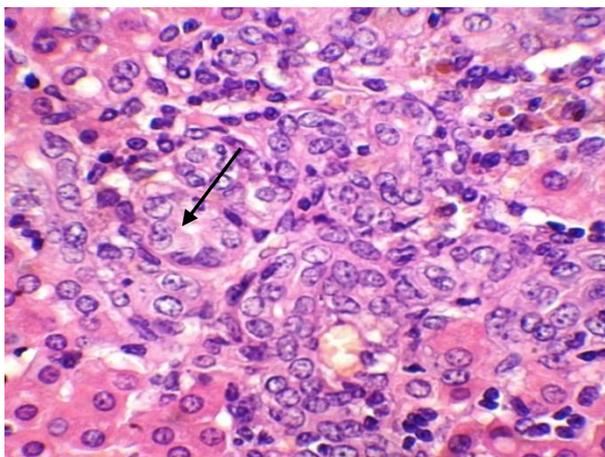


Рис. 2. Печень морской свинки группы № 3 (клетки разросшейся атипичной ткани не имеют признаков специфической дифференцировки).  
Окраска гематоксилином и эозином, ув. × 200

Прослеживается морфологическая взаимосвязь атипичных разрастаний с кровеносными сосудами. Гиперемированные кровеносные сосуды, как правило, располагаются внутри этих атипичных участков.

В одних участках атипичные разрастания находятся рядом с участками печени, где отмечаются дистрофические и некротические изменения. В других участках отмечается гидропическая дистрофия. Цитоплазма измененных гепатоцитов не окрашивается, клетки становятся округлыми, ядра находятся в центре. Среди них

обнаруживаются гепатоциты без ядер в состоянии некроза.

Кроме того, в участках печени, прилегающих к атипичным разрастаниям ткани печени, отмечены некробиотические изменения. В гепатоцитах отмечается цито- и кариопикноз. Гепатоциты уменьшаются в размере, утрачивают связь друг с другом. Ядра становятся мелкими, гиперхромными, цитоплазма гомогенная и интенсивно окрашена эозином. Некоторые гепатоциты утрачивают ядра, т. е. некротизируются. В некоторых участках гидродистрофия наблюдается одновременно с цито- и кариопикнозом (рис. 3).

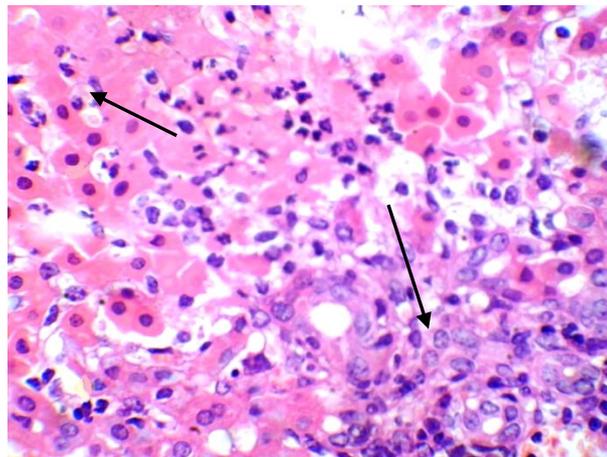


Рис. 3. Цито- и кариопикноз с последующим некрозом гепатоцитов рядом с участком пролиферации атипичной ткани (гепатоциты уменьшены в размере, цитоплазма интенсивно окрашена эозином, ядра уменьшены и гиперхромны).  
Окраска гематоксилином и эозином, ув. × 200

Дистрофия и некроз гепатоцитов обнаруживаются в паренхиме органа не только около атипичных участков, но и под капсулой печени, и в толще органа. Во многих из них наблюдается скопление мононуклеаров. Скопление мононуклеаров (лимфоцитов) отмечается также вокруг кровеносных сосудов в составе атипичных участков печени.

Необходимо отметить, что анализ гистологических показателей печени экспериментальных животных, зараженных культурой *Mycobacterium bovis* (штамм 14) через 30 сут после инокуляции бетулина и убитых через 45 дней после заражения, позволяет констатировать, что типичных для туберкулезной инфекции поражений в виде очагов продуктивно-экссудативного воспаления не обнаружено.

Обнаруженные участки пролиферации недифференцированных клеток желчных протоков, вероятно, отнести к действию возбудителя туберкулеза нельзя, так как данных о возможности возбудителя туберкулеза вызывать дифференцировку и пролиферацию клеток желчных протоков печени нами не обнаружено.

**Заключение.** Полученные в ходе гистологических исследований данные позволяют предполагать, что дифференцировка холангиоцитов желчных протоков связана с биологически активным действием бетулина и бетулиновой кислоты. Также установлено, что дифференциации и активная пролиферация указанных клеток происходит в переваскулярных пространствах сосудов, где располагаются генерации гепатоцитов. Также отмечается, что при дегенеративных процессах в паренхиме органа часть вышеу-

казанных клеток начинает активно размножаться и дифференцироваться в гепатоциты. Исходя из этого можно предположить, что бетулин и бетулиновая кислота могут активно стимулировать восстановительные процессы в печени.

Считаем, что для обоснованных выводов о генеративных возможностях препаратов на основе бетулина и бетулиновой кислоты необходимо проводить дальнейшие клинические, лабораторные, гистологические и гистохимические исследования.

#### Список источников

1. *Околелов В.И., Золотова Н.С.* Идентификация возбудителей туберкулеза лабораторных животных с помощью спектрофотометрии // Вестник Омского государственного аграрного университета. 2022. № 4 (48). С. 147–155. DOI: 10.48136/2222-0364\_2022\_4\_147.
2. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests and Host Biomarker Discovery / *H.M. Vordermeier* [et al.] // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2016. V. 4. P. 87–109.
3. *Баратов М.О., Сакидибилов О.П.* Туберкулез крупного рогатого скота в Республике Дагестан: проблемы и перспективы // Ветеринария. 2021. № 1. С. 24–28. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.1.24-28.
4. Профилактика туберкулеза крупного рогатого скота, завозимого из-за рубежа / *А.С. Донченко* [и др.] // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2019. Т. 49, № 6. С. 53–61.
5. Development and Challenges in Animal Tuberculosis Vaccination / *A. Balseiro* [et al.] // *Pathogens.* 2020. V. 9. P. 472.
6. *Кошкин И.Н., Власенко В.С., Дудолодова Т.С.* Морфологические изменения ткани печени под действием конъюгатов антигенов БЦЖ и производных бетулина при экспериментальном туберкулезе // Пермский аграрный вестник. 2021. № 3 (35). С. 100–109. DOI: 10.47737/2307-2873\_2021\_35\_100.
7. *Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Kulakov I.V.* The Effect of Experimental BCG Antigen–Betulin-Derived Conjugates on the Guinea Pig Immunological Response // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2021. Vol. 47, № 4. P. 837–844. DOI: 10.1134/S1068162021040142.
8. *Глейберман А.С., Трояновский С.М., Банников Г.А.* Перестройка цитоскелета в гепатоцитах регенерирующей печени мышей // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. 1984. № 12: С. 741–743.
9. *Ярыгин К.Н.* Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации печени // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2008. № 1. С. 2–7.
10. Стволовые/продениторные клетки печени и костного мозга как регуляторы восстановительной регенерации поврежденной печени / *А.В. Люндуп* [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2010. № 12 (2). С. 100–107. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-2-100-107.
11. Ptpn1 deletion protects oval cells against lipoapoptosis by favoring lipid droplet formation and dynamics / *I. Barahona* [et al.] // *Cell Death Differ.* 2022;29(12):2362-2380. DOI: 10.1038/s41418-022-01023-x.
12. Markus Grompe, Chapter 23 – Adult Liver Stem Cells, Editor(s): Robert Lanza, Anthony Atala, *Essentials of Stem Cell Biology* (Third Edition), Academic Press, 2014;309-327. DOI: 10.1016/B978-0-12-409503-8.00023-8.
13. *Wu H.H., Lee O.K.* Exosomes from mesenchymal stem cells induce the conversion of hepatocytes into progenitor oval cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8:117. DOI: 10.1186/s13287-017-0560-z.

#### References

1. *Okolelov V.I., Zolotova N.S.* Identifikaciya vozбудitelej tuberkuleza laboratornyh zhivotnyh s pomosch'yu spektrofotometrii // Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2022. № 4 (48). S. 147–155. DOI: 10.48136/2222-0364\_2022\_4\_147.
2. Bovine Tuberculosis in Cattle: Vaccines, DIVA Tests and Host Biomarker Discovery / *H.M. Vordermeier* [et al.] // *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2016. V. 4. P. 87–109.
3. *Baratov M.O., Sakidibirov O.P.* Tuberkulez krupnogo rogatogo skota v Respublike Dagestan: problemy i perspektivy // Veterinariya.

2021. № 1. S. 24–28. DOI: 10.30896/0042-4846.2021.24.1.24-28.
4. Profilaktika tuberkuleza krupnogo rogatogo skota, zavozimogo iz-za rubezha / A.S. *Donchenko* [i dr.] // Sibirskij vestnik sel'skohozyajstvennoj nauki. 2019. T. 49, № 6. S. 53–61.
  5. Development and Challenges in Animal Tuberculosis Vaccination / A. *Balseiro* [et al.] // Pathogens. 2020. V. 9. P. 472.
  6. *Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Dudoladova T.S.* Morfologicheskie izmeneniya tkani pecheni pod dejstviem kon'yugatov antigenov BCZh i proizvodnyh betulina pri `eksperimental'nom tuberkuleze // Permskij agrarnyj vestnik. 2021. № 3 (35). S. 100–109. DOI: 10.47737/2307-2873\_2021\_35\_100.
  7. *Koshkin I.N., Vlasenko V.S., Kulakov I.V.* The Effect of Experimental BCG Antigen-Betulin-Derived Conjugates on the Guinea Pig Immunological Response // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2021. Vol. 47, № 4. P. 837–844. DOI: 10.1134/S1068162021040142.
  8. *Glejberman A.C., Troyanovskij C.M., Bannikov G.A.* Perestrojka citoskeleta v gepatocitah regeneriruyushej pecheni myshej // Byul. `eksperimental'noj biologii i mediciny. 1984. № 12: S. 741–743.
  9. *Yarygin K.N.* Rol' rezidentnyh i cirkuliruyuschih stvolovyh kletok v fiziologicheskoj i reparativnoj regeneracii pecheni // Patologicheskaya fiziologiya i `eksperimental'naya terapiya. 2008. № 1. S. 2–7.
  10. Stvolovye/prodenitornye kletki pecheni i kostnogo mozga kak regulatory vosstanovitel'noj regeneracii povrezhdennoj pecheni / A.V. *Ljundup* [i dr.] // Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov. 2010. № 12 (2). S. 100–107. DOI: 10.15825/1995-1191-2010-2-100-107.
  11. Ptpn1 deletion protects oval cells against lipoapoptosis by favoring lipid droplet formation and dynamics / I. *Barahona* [et al.] // Cell Death Differ. 2022;29(12):2362-2380. DOI: 10.1038/s41418-022-01023-x.
  12. Markus Grompe, Chapter 23 – Adult Liver Stem Cells, Editor(s): Robert Lanza, Anthony Atala, Essentials of Stem Cell Biology (Third Edition), Academic Press, 2014;309-327. DOI: 10.1016/B978-0-12-409503-8.00023-8.
  13. *Wu H.H., Lee O.K.* Exosomes from mesenchymal stem cells induce the conversion of hepatocytes into progenitor oval cells. Stem Cell Res Ther. 2017; 8:117. DOI: 10.1186/s13287-017-0560-z.

Статья принята к публикации 21.06.2023 / The article accepted for publication 21.06.2023.

Информация об авторах:

**Иван Николаевич Кошкин**<sup>1</sup>, ассистент кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, кандидат ветеринарных наук

**Василий Сергеевич Власенко**<sup>2</sup>, главный научный сотрудник лаборатории эпизоотологии и мер борьбы с туберкулезом, доктор биологических наук, доцент,

**Валентина Ивановна Плешакова**<sup>3</sup>, ассистент кафедры ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, доктор ветеринарных наук

Information about the authors:

**Ivan Nikolaevich Koshkin**<sup>1</sup>, Assistant at the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases, Candidate of Veterinary Sciences

**Vasily Sergeevich Vlasenko**<sup>2</sup>, Chief Researcher of the Laboratory of Epizootology and Tuberculosis Control Measures. Doctor of Biological Sciences, Associate Professor

**Valentina Ivanovna Pleshakova**<sup>3</sup>, Assistant at the Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Invasive Diseases, Doctor of Veterinary Sciences

