УДК619.[575.117.2:615.371:616.22-002]:636.57
DOI 10.30975/2073-4999-2024-26-3-18-22

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКА «БАЦЕЛЛ-М®» НА УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ У БРОЙЛЕРОВ КРОССА «КОББ 500» НА ФОНЕ ВАКЦИНАЦИИ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА

Илья Олегович Крутов[1], Андрей Васильевич Голубцов[2], Николай Алексеевич Стрельников[3], Оксана Михайловна Мармурова[4], Татьяна Анатольевна Ерина[5], Евгений Владимирович Михайлов[6], Надежда Валерьевна Пасько[7]

[1, 2, 3, 6] ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии» (ФГБНУ ВНИВИПФиТ), г. Воронеж, Россия

[2, 4, 6] ФГБОУ ВО «Воронежский государственный аграрный университет имени императора Петра I» (ФГБОУ ВО «ВГАУ имени императора Петра I»), г. Воронеж, Россия

[5] ООО «Кормовые Технологии» г. Воронеж, Россия

[1] voronezh81@rambler.ru

Аннотация. В статье представлены результаты изучения экспрессии генов птицы. Исследование выявило максимальное повышение уровня экспрессии генов IL-2, IL-8 и TNF-α у бройлеров, в рацион которых добавляли пробиотик «Бацелл-М®» в дозе 50 г на 10 кг корма в течение 30 дней и на 14-е и 28-е сут. жизни привили против инфекционного бронхита кур живой вакциной (штамм «Н-120»), в сравнении с птицей, не получавшей препарат. Это свидетельствует об активизации иммунной системы и увеличении количества продуцируемых в организме генов. По мнению авторов, исследование уровня экспрессии генов может служить методом контроля изменений иммунной системы у сельскохозяйственной птицы.

Ключевые слова: бройлеры, пробиотик «Бацелл-М®», вакцинация, экспрессия генов, иммунитет

Для цитирования: Крутов И.О. Влияние пробиотика «Бацелл-М®» на уровень экспрессии генов у бройлеров кросса «Кобб 500» на фоне вакцинации против инфекционного бронхита / И.О. Крутов, А.В. Голубцов, Н.А. Стрельников [и др.] // Птица и птицепродукты. 2024. № 3. С. 18–22. Https://doi.org/10.30975/2073-4999-2024-26-3-18-22.

Bacell-M® probiotic effect on genes expression level in Cobb 500 broiler cross at the phone of vaccination against infectious bronchitis

Ilya O. Krutov[1], Andrey V. Golubtsov[2], Nikolai A. Strelnikov[3], Oksana M. Marmurova[4], Tatyana A. Yerina[5], Yevgeny V. Mikhailov[6], Nadezhda V. Pasko[7]

[1, 2, 3, 6] FSBI "All-Russian Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy" (FSBI ARRVIPP&T), Voronezh, Russia

[2, 4, 6] FSBEI HE "Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I" (FSBEI HE "VSAU named after Emperor Peter I"), Voronezh, Russia

[5] LLC "Feed Technologies", Voronezh, Russia

[1] voronezh81@rambler.ru

Abstract. The results of poultry gene expression study have been given in the paper. The study has detected maximum IL-2, IL-8 and TNF-α genes expression level increasing in broilers with Bacell-M® ration addition 50 g per 10 kg of feed during 30 days and being vaccinated against chicken infectious bronchitis at 14th and 28th days of life with live vaccine H-120 strain in comparison with broilers without the probiotic. The fact shows immune system activation and gene quantities being produced in organism. The authors think the genes expression level study may be the method of immune system control in poultry.

Keywords: broilers, Bacell-M® probiotic, vaccination, gene expression, immunity

For citation: Krutov I.O. Bacell-M® probiotic effect on genes expression level in Cobb 500 broiler cross at the phone of vaccination against infectious bronchitis / I.O. Krutov, A.V. Golubtsov, N.A. Strelnikov et al. // Poultry & Chicken Products. 2024. No. 3. P. 18–22. Https://doi.org/10.30975/2073-4999-2024-26-3-18-22.

Введение

Изучение иммунного статуса птицы в условиях современного высокоинтенсивного производства является актуальной задачей. Выращивание поголовья сопровождается воздействием различных стресс-факторов, что приводит к снижению резистентности птицы и возрастанию риска возникновения у нее заболеваний различной этиологии.

Инфекционный бронхит кур (ИБК) — быстропротекающее высококонтагиозное вирусное заболевание, поражающее кур всех возрастов. Возбудитель болезни — вирус семейства коронавирусов

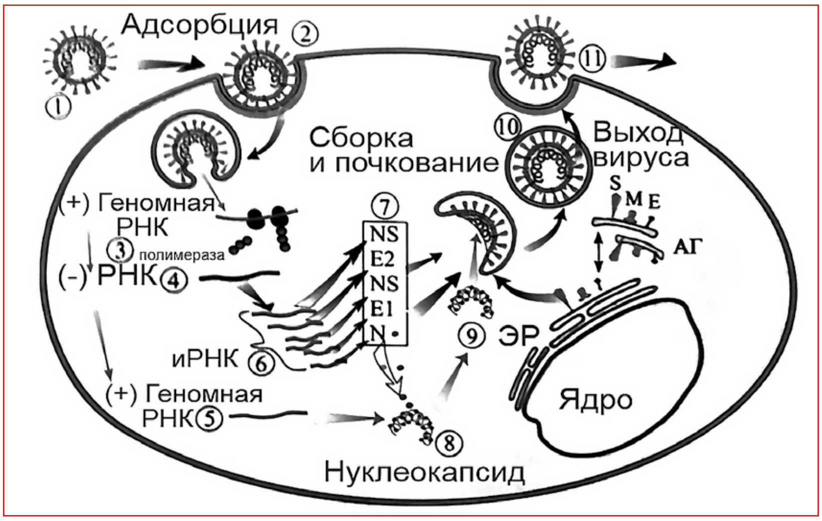


Рис. 1. Репродукция коронавирусов

(Coronaviridae) с геномом в виде одноцепочечной линейной молекулы РНК. Инфекционную составляющую обеспечивает вирионная РНК, состоящая из нуклеокапсида спиральной симметрии, липопротеидной оболочки и 4 структурных белков. В ходе виропексиса вирус проникает в клетку путем сплавления оболочки вириона с плазматической мембраной клетки. Полный цикл размножения происходит в цитоплазме инфицированных клеток. Дочерние вирионы появляются через 4–6 ч после заражения. Максимально накапливаются вирусы в клетке через 12–36 ч. Вирионная РНК может функционировать как и РНК и обеспечивать синтез вирусоспецифических белков. Вирионы созревают внутри клеток на эндоплазматической мембране и освобождаются почкованием через эндоплазматический ретикулум. Развитие инфекционного процесса сопровождается виремией (проникновением вируса в кровь) с локализацией вирусного антигена в лейкоцитах и эритроцитах до 16 дней после заражения. Вирус находится в почках, селезенке, яичниках, слизистой клоаки и даже в фекалиях [1, 2].

Одним из элементов противодействия распространению вируса являются *Toll*-подобные рецепторы (*TLR*). Они относятся к системе врожденного иммунного ответа и обеспечивают распознавание «своих» и «чужих». Различают 11 типов *TLR*, которые способны распознавать определенные паттерны молекул антигенов бактерий и связывать их. Например, *TLR-4* является главным сигнальным рецептором для липополисахаридов грамотрицательных бактерий, термических шоковых протеинов и фибронектина; *TLR-1, 2, 6* — для липопротеинов и пептидогликанов грамположительных бактерий, липотейхоевых кислот; *TLR-3, 7, 9* — для вирусной РНК, а *TLR-5* распознает флагеллины энтероинвазивных бактерий, которые уже проникли внутрь эпителия. Активация этих рецепторов вызывает протеолиз ингибитора IkB — фактора транскрипции NFkB, который перемещается в ядро и запускает гены-мишени, кодирующие синтез провоспалительных цитокинов [3].

В бурсе развиваются компетентные В-клетки, в тимусе — Т-клетки; их количество увеличивается при воспалительных процессах и при иммунной реакции на антигены [4, 5]. Происходящие при этом изменения могут сопровождаться усилением или ослаблением экспрессии ряда генов, запускающих процесс синтеза провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [6].

Пищеварительная система также служит защитным барьером от воздействия пестицидов и патогенов. Лимфоидные ткани в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) птиц хорошо развиты и участвуют в активации иммунных реакций. При этом микрофлора, продуцируемая кишечником, непосредственно влияет на экспрессию генов животных и птицы [7].

В настоящее время в птицеводстве большое значение придают использованию в рационах птицы биологически активных кормовых добавок и препаратов, таких как «Бацелл-М®», в состав которого входит «коктейль» из полезной микрофлоры: *Bacillus subtilis, Lactobacillus paracasei*, *Enterococcus faecium* и их метаболитов. Такой пробиотический комплекс положительно влияет на ЖКТ, обмен веществ и продуктивность птицы, а также регулирует экспрессию генов, обеспечивая устойчивость иммунитета [8].

Изучение уровней экспрессии генов позволяет установить иммунный ответ при инфицировании птицы бактериями и вирусами, оценить иммуногенность и реактогенность вакцинных препаратов, отследить формирование специфического клеточно опосредованного ответа [9].

Интерлейкин-2 (IL-2) представляет собой разновидность фактора роста Т-клеток. Он стимулирует реактивность многих видов клеток, таких как Т-лимфоциты, а также способствует пролиферации, дифференцировке и секреции В-клетками иммуноглобулина (Ig) [10]. Кроме того, IL-2 может стимулировать экспрессию антигена типа MHC II, рецептора трансферрина и инсулина и генерировать множество цитокинов, включая интерферон-γ (IFN-γ), интерлейкины 4, 5 и 6, TNF-α, TNF-β, CSF и т.д. [11, 12].

Провоспалительный хемокин IL-8 является хемоаттрактантом, привлекающим гетерофилы к месту инфекции и вызывающим быструю местную воспалительную реакцию. Он известен своей активностью в отношении гетерофилов и макрофагов у кур. А активация макрофагов стимулирует секрецию важнейшего противовоспалительного цитокина IL-10, который поддерживает баланс иммунной

Таблица 1

Схема опыта (n = 40)

Группа	Особенности рациона	Вакцинация
1	ОР + с 10-го дня жизни пробиотик «Бацелл-М®» в дозе 50 г на 10 кг корма в течение 30 дней	На 14-е и 28-е сут. жизни привиты против ИБК живой вакциной (штамм «Н-120»)
2	ОР	На 14-е и 28-е сут. жизни привиты против ИБК живой вакциной (штамм «Н-120»)
3	ОР + с 10-го дня жизни пробиотик «Бацелл-М®» в дозе 50 г на 10 кг корма в течение 30 дней	–
4 (к)	ОР	–

системы путем подавления чрезмерного производства провоспалительных цитокинов [13].

TNF-α представляет собой плейотропный цитокин, необходимый для контроля внутриклеточных бактерий, таких как Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis и Salmonella typhimurium. Известно, что он является важным эндогенным медиатором острых и хронических воспалительных реакций [14].

Исходя из изложенного можно утверждать, что изучение экспрессии генов у птицы является актуальной задачей.

Цель исследований заключалась в определении влияния пробиотика «Бацелл-М®» на уровень экспрессии генов у цыплят-бройлеров кросса «Кобб 500» на фоне вакцинации против инфекционного бронхита кур.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили на базе лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики отдела экспериментальной фармакологии и моделирования живых систем ФГБНУ ВНИВИПФиТ. Полевые исследования и отбор материала осуществляли на базе ИП «Крутова М.В.» в Липецкой области на бройлерах кросса «Кобб 500». Для эксперимента отобрали 40 цыплят в возрасте 10 дней и по принципу аналогов разделили их на 4 группы, по 10 гол. в каждой.

Все бройлеры получали принятый в хозяйстве основной рацион (ОР), в состав которого входил комбикорм *BEST*. Птицы в группах 1 и 3 дополнительно к ОР в течение 30 дней получали пробиотик «Бацелл-М®» в дозе 50 г на 10 кг корма (*табл. 1*).

Таблица 2

Список праймеров для ПЦР в реальном времени

Исследуемый ген	Последовательность праймеров
IL-2	F: GATCTTTGGCTGTATTTCGG R: TCCTGGGTCTCAGTTGGTGTGT
IL-8	F: ATGAACGGCAAGCTTGGAGCT R: GCAGCTCATTCCCCATCTT
TNF-α	F: AATTTGCAGGCTGTTTCTGC R: TATGAAGGTGGTGCAGATGG

Цыплят в группах 1 и 2 на 14-е и 28-е сут. жизни привили против ИБК живой вакциной (штамм «Н-120») ФГБУ ВНИИЗЖ согласно наставлению. Птицу в группах 3 и 4 не вакцинировали. Бройлеры в группе 4 служили контролем.

В возрасте 42 дней у цыплят осуществили забор крови из подкрыльцовой вены. С целью изучения проб использовали панель специфичных праймеров для оценки экспрессии генов, ответственных за иммунитет (IL-2, IL-8, TNF). Исследование проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе *DTlite 4S1* (ДНК-технология, Россия) с готовой смесью для *PCR 5X qPCRmix-HS LowROX* («Евроген», Россия). Выделение РНК осуществляли, применяя набор «РНК-Экстран» («Синтол», Россия), по утвержденной инструкции. Качество выделенной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле. Исследование проводили посредством ПЦР-анализа с добавлением красителя *SYBR Green*. Для определения экспрессии изучаемых генов использовали панель специфичных праймеров генов иммунного статуса (*табл. 2*) [15].

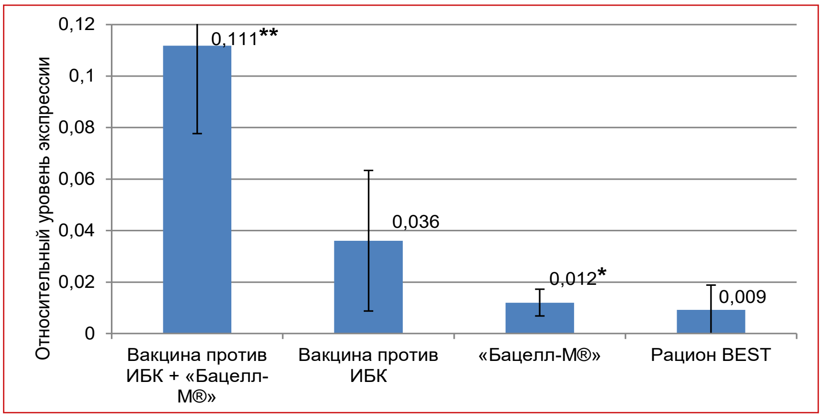
Статистическую обработку осуществляли в *Microsoft Excel*. Достоверность различий устанавливали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

На *рисунке 2* представлена диаграмма, отражающая уровень экспрессии гена IL-2, регулирующего пролиферацию и дифференцировку эффекторных Т-клеток, макрофагов и естественных клеток-киллеров. Наибольшей экспрессией генов отличалась группа 1, где применяли вакцину против ИБК совместно с пробиотиком «Бацелл-М®». Она была в 3,1 раза ($p \leq 0,001$) выше, чем в группе 2 с вакциной против ИБК, в 9,3 раза больше, чем в группе 3 с пробиотиком «Бацелл-М®», и в 12,2 раза выше, чем в контрольной группе 4.

Применение пробиотика на фоне вакцинации способствует распознаванию вирусных и бактериальных структур *TLR/RLRs* рецепторами на поверхности мембраны клеток, которые, в свою очередь, активируют внутриклеточный «каскад событий» для дифференцировки Th1- или Th2-клеток, инициирующих гуморальные иммунные реакции [16].

На *рисунке 3* представлена диаграмма, отражающая уровень экспрессии гена IL-8. Наибольший



Примечание. Здесь и далее: при p≤0,5;** при p≤0,05; *** при p≤0,001 относительно группы 4 (к).*

Рис. 2. Экспрессия гена цитокина IL-2 у птиц

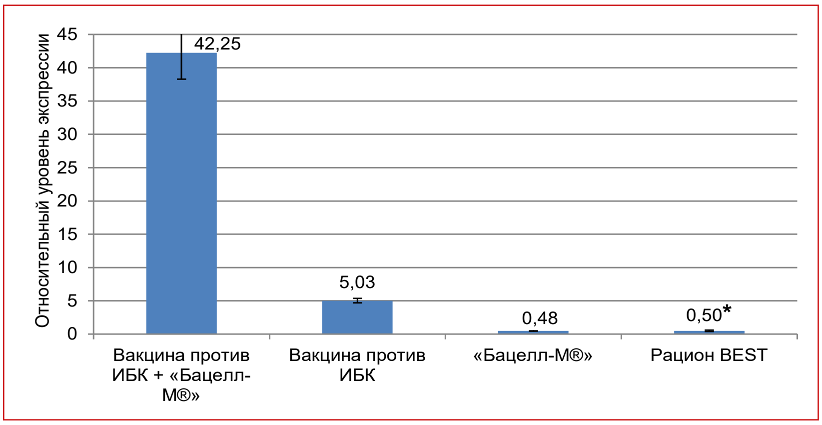


Рис. 3. Экспрессия гена цитокина IL-8 у птиц

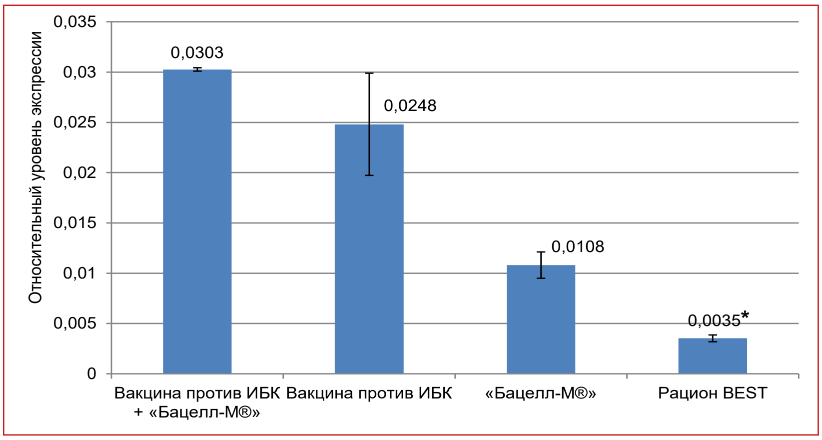


Рис. 4. Экспрессия гена цитокина TNF-α у птиц

показатель отмечен в группе 1, и он в 8,4 раза выше, чем в группе 2. При этом в группах 3 и 4 экспрессия почти не наблюдалась.

Хемотаксический цитокин IL-8 стимулирует резистентность иммунных клеток и способен эффективно рекрутировать Т-хелперы CD4+ клетки, макрофаги и моноциты, индуцировать выработку интерферона-γ. Применение пробиотика на фоне вакцинации повысило естественную резистентность птиц, что подтвердил высокий уровень экспрессии IL-8 в группе 1 по сравнению с остальными группами [17].

На *рисунке 4* представлена диаграмма экспрессии гена — фактора некроза опухоли: TNF-α. Максимальным показателем характеризовалась группа 1, где применяли вакцину против ИБК вместе с пробиотиком «Бацелл-М®». Он был на 22% выше, чем у птиц в группе 2, в 2,8 раза больше, чем в группе 3, и в 8,6 раза выше, чем в группе 4 (к).

Фактор некроза опухоли представляет собой плейотропный цитокин, необходимый для контроля внутриклеточных бактерий и участвующий в начальных стадиях воспалительных процессов. Его источником являются макрофаги, стимулируемые лигандами *Toll-like* рецепторов (*TLR*). На фоне вакцинации и применения пробиотика «Бацелл-М®» (группа 1) происходит активация макрофагов, что приводит к стимуляции неспецифического клеточного иммунитета [18].

В исследованиях Д.Г. Тюриной с соавторами показано, что использование антибиотиков на фоне присутствия в кормах остаточных количеств пестицидов снижает эффект от применения антибактериальных препаратов в промышленном птицеводстве [7]. Происходящие при этом изменения могут сопровождаться модификацией экспрессии ряда генов. По нашему мнению, повышение уровня IL-2, IL-8 и TNF-α у бройлеров при использовании живой вакцины может также способствовать модификации экспрессии генов. Все три исследуемых гена являются провоспалительными цитокинами, участвующими в единой системе иммунного ответа.

Слизистая оболочка ЖКТ обладает собственной лимфоидной тканью (*gut-associated lymphoid tissue; GALT*), функционально связанной с локализованными в ней антигенпрезентующими клетками, преимущественно дендритными, макрофагами и эпителиальными клетками кишечника [19]. В слизистых оболочках находятся Т- и В-лимфоциты, а также клетки врожденного иммунитета: эозинофилы, базофилы, эпителиальные клетки. Преобладают Т-лимфоциты, среди которых численно доминируют γδТ-лимфоциты, способствующие активации

и дифференцировке αβТ-лимфоцитов и развитию адаптивного иммунного ответа.

Очевидно, что разные штаммы пробиотиков по-разному воспринимаются *GALT*-системой. Тем не менее большинство проведенных исследований свидетельствуют о том, что пробиотические штаммы лактобактерий распознаются *TLR* и усиливают образование хелперов Тх1, которые синтезируют цитокины, стимулирующие индукцию адаптивного иммунного ответа. Пробиотики, в состав которых входят симбионтные штаммы бактерий, аэробы и анаэробы, вероятно, могут оказывать более многоплановое и мощное иммуномодулирующее влияние, чем монокомпонентные препараты. Такое действие пробиотиков открывает широкие перспективы для их использования в разных направлениях.

Заключение

Проведенные на бройлерах кросса «Кобб 500» исследования выявили повышенный уровень экспрессии генов IL-2, IL-8 и TNF-α в группе 1 в сравнении с другими группами. Это позволяет сделать вывод о том, что использование в рационе птицы пробиотика «Бацелл-М®» на фоне иммунизации живой вакциной (штамм «Н-120») способствует активизации макрофагов и Т-клеток и стимуляции как гуморального иммунитета, так и клеточного.

По нашему мнению, определение уровня экспрессии генов может служить методом контроля состояния иммунной системы у сельскохозяйственной птицы.

Список источников

1. Bande F. Pathogenesis and diagnostic approaches of avian infectious bronchitis / F. Bande, S.S. Arshad, A.R. Omar [et al.] // Adv. Virol. 2016. Feb 3. Vol. 2016. Art. num. 4621659.

2. Болезни домашних и сельскохозяйственных птиц: в 3 ч. / под ред. Б.У. Кэлнека, Х.Дж. Барнса, Ч.У. Биэрдаи и др.; пер. с англ. И. Григорьевой, С. Дорош, Н. Хрущевой, И. Суровцева. Ч. 2. М.: Аквариум-Принт, 2011. 424 с.

3. Shi N. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system / N. Shi, N. Li, X. Duan, H. Niu // Mil. Med. Res. 2017. Apr. 27. Vol. 4. Art. num. 14. Https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9.

4. Xu Y. Effects of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis on growth performance, immunity, short chain fatty acid production, antioxidant capacity, and cecal microflora in broilers / Y. Xu, Y. Yu, Y. Shen et al. // Poult. Sci. 2021. Sept. Vol. 100, iss. 9. Art. num. 101358.

5. Neveling D.P. Probiotics: an antibiotic replacement strategy for healthy broilers and productive rearing / D.P. Neveling, L.M.T. Dicks // Probiotics Antimicrob. Proteins. 2021. Feb. Vol. 13, iss. 1. P. 1–11.

6. Тарлавин Н.В. Влияние вакцинации иммунокомплексной вакциной из штамма «ВНИВИП» на экспрессию гена IL-6 и представленность условно-патогенных микроорганизмов в кишечнике кур-несушек / Н.В. Тарлавин, В.В. Веретенников, Э.Д. Джавадов [и др.] // Междунар. вестн. ветеринарии. 2022. № 2. С. 22–28.

7. Тюрина Д.Г. Продуктивность и экспрессия генов у цыплят-бройлеров (Gallus Gallus L.) кросса Ross 308 под влиянием антибиотиков, глифосата и штамма Bacillus sp. / Д.Г. Тюрина, Г.Ю. Лаптев, Е.А. Йылдырым [и др.] // С.-х. биол. 2022. Т. 57, № 6. С. 1147–1165. Https://doi.org/10.15389/agrobiology.2022.6.1147rus.

8. Михайлов Е.В. Использование пробиотической кормовой добавки Бацелл-М для профилактики гепатозов в птицеводстве / Е.В. Михайлов, С.Н. Семенов, А.В. Голубцов [и др.] // Вестн. Курган. ГСХА. 2023. № 4 (48). С. 37–42.

9. Rohde F. Characterization of chicken tumor necrosis factor-α, a long missed cytokine in birds / F. Rohde, B. Schusser, T. Hron et al. // Front. Immunol. 2018. Apr. 17. Vol. 9. Art. num. 605. Https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00605.

10. Wang X.-H. Study of the relationship between polymorphisms in the il-8 gene promoter region and coccidiosis resistance index in Jinghai yellow chickens / X.-H. Wang, H.-L. Yu, W.-B. Zou et al. // Genes. 2020. Apr. 27. Vol. 11, iss. 5. Art. num. 476. Https://doi.org/10.3390/genes11050476.

11. Li G. Interleukin-2 production in SC and TK chickens infected with Eimeria tenella / G. Li, E.P. Lillehoj, H.S. Lillehoj // Avian Dis. 2002. Jan. — Mar. Vol. 46, iss. 1. P. 2–9. Https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0002:IPISAT]2.0.CO;2.

12. Withanage G.S.K. Rapid expression of chemokines and proinflammatory cytokines in newly hatched chickens infected with Salmonella enterica serovar Typhimurium / G.S.K. Withanage, P. Kaiser, P. Wigley et al. // Infect. Immun. 2004. Apr. Vol. 72, iss. 4. P. 2152–2159.

13. Poh T.Y. Re-evaluation of chicken CXCR1 determines the true gene structure: CXCLi1 (K60) and CXCLi2 (CAF/interleukin-8) are ligands for this receptor / T.Y. Poh, J. Pease, J.R. Young et al. // J. Biol. Chem. 2008. Jun. 13. Vol. 283, iss. 24. P. 16408–16415.

14. Wang D. Immunologic synergism with IL-2 and effects of cCHMIs on mRNA expression of IL-2 and IFN-γ in chicken peripheral T lymphocyte / D. Wang, X. Li, L. Xu et al. // Vaccine. 2006. Nov. 30. Vol. 24, iss. 49–50. P. 7109–7114.

15. Kawai T. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and Immunity / T. Kawai, Sh. Abira // Immunity. 2011. May 27. Vol. 34, iss. 5. P. 637–650.

16. Paul W.E. Bridging innate and adaptive immunity // Cell. 2011. Dec. 9. Vol. 147, iss. 6. P. 1212–1215.

17. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes // Immunity. 2010. Nov. Vol. 33, iss. 5. P. 565–671.

18. Lu P. Effects of antibiotic growth promoter and dietary protease on growth performance, apparent ileal digestibility, intestinal morphology, meat quality, and intestinal gene expression in broiler chickens: a comparison / P. Lu, J. Choi, C. Yangetal et al. // J. Anim. Sci. 2020. Sept. 1. Vol. 98, iss. 9. Art. num. skaa254. Https://doi.org/10.1093/jas/skaa254.

19. Tallentire C.W. Breeding for efficiency in the broiler chicken: a review / C.W. Tallentire, I. Leinonen, I. Kyriazakis // Agron. Sustain. Dev. 2016. Nov. Vol. 36, iss. 4. P. 66. Https://doi.org/10.1007/s13593-016-0398-2.

20. Chrząstek K. The influence of enrofloxacin, florfenicol, ceftiofur and E. coli LPS interaction on T and B cells subset in chicks / K. Chrząstek, A. Wieliczko // Veterinary Res. Commun. 2015. Vol. 39, iss. 1. P. 53–60. Https://doi.org/10.1007/s11259-015-9632-7. EDN: MIIQHQ.

Информация об авторах
А.В. Голубцов — канд. вет. наук;
О.М. Мармурова — канд. с.-х. наук;
Т.А. Ерина — канд. вет. наук;
Е.В. Михайлов — канд. вет. наук;
Н.В. Пасько — канд. биол. наук.

Information about the authors
A.V. Golubtsov — PhD in Veterinary Medicine;
O.M. Marmurova — PhD in Agriculture;
T.A. Yerina — PhD in Veterinary Medicine;
Ye.V. Mikhailov — PhD in Veterinary Medicine;
N.V. Pasko — PhD in Biology.