

**НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ**  
**РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ**  
**ДОЧЕРНЕЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ**  
**«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ**  
**ИМЕНИ С.Н. ВЫШЕЛЕССКОГО»**

**УДК: 619:616.5–002.828**

**ЗАЙЦЕВА**  
**ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА**

**СТИМУЛЯЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРИБА РОДА**  
**TRICHOPHYTON ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ**  
**ТРИХОФИТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

**АВТОРЕФЕРАТ ДИССЕРТАЦИИ**  
**на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук**

по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**МИНСК, 2017**

Работа выполнена в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

<b>Научный руководитель:</b>	<b>Красочко Ирина Александровна</b> , доктор ветеринарных наук, профессор, ученый секретарь РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Карпук Василий Васильевич</b> , доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры ботаники биологического факультета Белорусского государственного университета <b>Лазовский Виктор Анатольевич</b> , кандидат ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
<b>Оппонирующая организация:</b>	Учреждение образования «Гродненский государственный аграрный университет»

Защита диссертации состоится «28» декабря 2017 г. в «14<sup>00</sup>» часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.51.01 при РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» по адресу: 220003, г. Минск, ул. Брикета, 28. Тел./факс (+ 375-17) 50-88-131, E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

Автореферат разослан «27» ноября 2017 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
кандидат ветеринарных наук

Н.Ю. Щемелёва

## ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь животноводство является ведущей отраслью сельскохозяйственного производства, на его долю приходится около 70% валовой и 80% товарной продукции. Актуальной проблемой промышленного животноводства на современном этапе является разработка способов повышения сохранности молодняка.

Опыт передовых хозяйств демонстрирует, что для увеличения поголовья и производства продуктов животноводства необходимо, наряду с созданием прочной кормовой базы, строго соблюдать правила ухода, содержания, кормления и должный санитарный режим в животноводческих помещениях и на прифермерских территориях (П.А. Красочко и др., 2000; E. Thiry et al., 2005).

Трихофития (стригущий лишай) – инфекционная грибковая болезнь кожи и ее придатков, вызываемая зоофильными, антропофильными и геофильными трихофитонами, поражающая животных и человека. Это одна из наиболее распространенных грибковых болезней, зарегистрированных в более чем 120 странах мира. Трихофития наносит большой экономический ущерб, превышающий потери от многих болезней.

В Республике Беларусь впервые в 1995 г. было организовано производство вакцины живой сухой против трихофитии на УП «Витебская биофабрика» (с 2011 г. ОАО «БелВитунифарм»). Вместе с тем, технология ее изготовления трудоемка, имеет ряд недостатков. Кроме этого, из-за приобретенных иммунодефицитов у вакцинированных животных снижается профилактическая и лечебная эффективность вакцины.

В связи с вышеизложенным, актуальным остается отбор и поддержание культур гриба трихофитона под контролем безвредности, оптимизация состава сред для культивирования и сублимации, разработка способа регидратации, что позволит раскрыть пути конструирования стабильного, иммуногенного и высокоэффективного препарата против трихофитии крупного рогатого скота.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### **Связь работы с крупными научными программами и темами**

Тема работы является составной частью научно-исследовательской работы отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в рамках Государственной программы развития производства ветеринарных препаратов и инструментов, используемых в ветеринарии, на 2010–2015 гг. по заданию «Разработать, провести апробацию и освоить производство новых средств специфической профилактики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных».

Диссертационная работа также связана с государственной программой «Инновационные биотехнологии» на 2010–2012 гг. и на период до 2015 года подпрограммы «Малотоннажные биотехнологии» по заданию 9.2 «Разработка технологии и организация производства субстанции и готовой формы адьюванта для конструирования вакцин крупного рогатого скота» (№ госрегистрации 20131776) и по заданию 9.5 «Разработка технологии и организация производства вакцины нового поколения против дерматомикоза крупного рогатого скота» (№ госрегистрации 20141789).

Отдельные этапы работы выполнялись в рамках научно-исследовательской работы по заданию № Б13ВТ-025 («БРФФИ-Витебск 2013») Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Химический состав, биологическая активность, токсичность и безвредность культур и экстрактов гриба *Trichophyton*, выращенного глубинным способом» (2013–2014 гг., № госрегистрации 20132432).

Работа соответствует приоритетному направлению научных исследований Республики Беларусь на 2010–2014 гг. «Повышение эффективности агропромышленного комплекса и уровня продовольственной безопасности, разработка интенсивных и ресурсосберегающих технологий ведения сельского хозяйства» по разделу «Создание нового поколения действенных и экологически безопасных средств защиты растений и животных» (прикладные исследования).

### **Цель и задачи исследования**

**Цель работы** – разработать способы стимуляции биологической активности гриба рода *Trichophyton* и поствакцинального иммунитета при конструировании и применении отечественной вакцины против трихофитии крупного рогатого скота.

Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить влияние состава питательных сред, растворителя посевного материала и дозы инокулята на биологические свойства гриба рода *Trichophyton* при его культивировании.

2. Провести отбор аттенуированных штаммов гриба *Trichophyton* по их биологическим и производственно-ценным свойствам (продуктивность микроконидий, жизнеспособность).

3. Разработать состав защитной среды и оптимизировать режим сублимации гриба рода *Trichophyton*.

4. Разработать параметры промышленного производства и контроля вакцины сухой живой против трихофитии крупного рогатого скота.

5. Оптимизировать схему профилактики трихофитии крупного рогатого скота.

**Объект исследований** – гриб рода *Trichophyton* и средства защиты крупного рогатого скота от трихофитии.

**Предмет исследований** – 1099 телят 45–90-суточного возраста, 275 белых мышей массой 18–20 г, питательные среды, в том числе разработанные нами в ходе исследований, 3 штамма трихофитона: *Trichophyton verrucosum* № 130, *Trichophyton verrucosum* № 11183 и *Trichophyton mentagrophytes* № 135, защитные среды, растворитель посевного материала, образцы вакцины, разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота.

Всего в процессе проведения исследований выполнено более 480 серологических, 1200 микологических, 495 иммунологических и биохимических исследований.

### **Научная новизна**

Впервые разработаны оптимизированные составы питательных сред, защитной среды для сублимационного высушивания гриба, оптимизирован режим его сублимации, разработан растворитель посевного материала и растворитель для живой сухой вакцины против трихофитии.

Предложен метод отбора монокультур штаммов гриба трихофитона, позволяющий при использовании разработанного состава растворителя посевного материала гриба и оптимизированной питательной среды получить высокопродуктивные безвредные культуры гриба, исключить зависимость спорогенеза у отобранных монокультур штаммов гриба трихофитона от длительности пассажа и сезонности и в течение года обеспечить спорообразование до 244,0 млн микроконидий/см<sup>3</sup> при их жизнеспособности 88,0–95,0%, стабилизировать свойства монокультур штаммов по продуктивности микроконидий и их жизнеспособности на протяжении 15 пассажей, а также обеспечить высокую рентабельность производства вакцины, что дало возможность получать за счет интенсификации спорогенеза и повышения жизнеспособности микроконидий в 3,7 раза больше вакцины.

Разработан и внедрен в ветеринарную практику метод определения количества жизнеспособных микроконидий в вакцинах против трихофитии крупного ро-

гатого скота, позволяющий контролировать ее качество, эффективность, выход и стабильность за счет полного восстановления жизнеспособности микроконидий.

Впервые в практике ветеринарной микологии при разработке живой вакцины против трихофитии показана возможность контакта живой клетки с бычьим рекомбинантным гамма-интерфероном, позволяющим повысить профилактическую эффективность живой грибной вакцины и ограничиться ее однократным введением.

Предложенная вакцина сухая живая против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» с разработанным разбавителем-адьювантом специального состава широкого спектра биологического действия позволяют снизить кратность введения и расход вакцины на профилактическую обработку при трихофитии крупного рогатого скота в 2 раза.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработка рецептур питательных сред, растворителя посевного материала, установка корреляции между дозой инокулята и продуктивностью гриба на плотных средах, усовершенствование метода отбора штаммов для стимуляции биологической активности гриба рода *Trichophyton* обеспечили увеличение выхода целевого продукта в 3,7 раза, по сравнению с традиционными технологиями.

2. Оптимизация состава защитной среды и режима сублимации штаммов гриба *Trichophyton* обеспечили сохранение жизнеспособности микроконидий в составе вакцины до 90,2–95,2% в течение 24 месяцев хранения.

3. Конструирование состава разбавителя-адьюванта на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона для вакцин против трихофитии крупного рогатого скота, изучение его физико-химических и биологических свойств, токсичности и безвредности позволило, в сравнении с базовым растворителем (изотоническим раствором натрия хлорида), снизить реактогенность, повысить иммуногенность, снизить кратность введения и расход вакцин на профилактическую обработку при трихофитии крупного рогатого скота в 2 раза.

4. Иммунизирующая доза предлагаемой вакцины, ресуспендированная в разработанном разбавителе-адьюванте, после однократного введения обеспечивает выраженную иммунологическую перестройку в организме телят за счет биохимических и морфологических изменений в крови, достоверное повышение титра специфических антител (1:320–1:640) и высокую профилактическую защиту (до 100%), исключая поствакцинальные осложнения.

5. Экономическая эффективность предлагаемой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота после применения в производственных условиях составляет 16,2 рубля на 1 рубль затрат.

### **Личный вклад соискателя**

Данная диссертационная работа является законченным научно-исследовательским трудом. Все разделы диссертации написаны соискателем самостоятельно. Диссертантом дано аргументированное обоснование научно-практического направления исследований, определены цель и задачи, разработаны методические подходы к их решению, а также обобщен экспериментальный материал, полученный в ходе лабораторных и клинических исследований.

Все научно-производственные опыты, микробиологические, серологические, гематологические, иммунологические и др. исследования, а также разработка технологии получения предлагаемой вакцины, растворителя посевного материала и разбавителя-адьюванта для применения вакцины были проведены лично автором диссертации при научно-консультативной и методической помощи научного руководителя – доктора ветеринарных наук, профессора И.А. Красочко.

Техническое содействие в проведении исследований по изготовлению бычьего рекомбинантного гамма-интерферона и консультативную помощь по его производственному испытанию оказал заведующий кафедрой микробиологии Белорусского государственного университета (БГУ), доктор биологических наук, профессор В.А. Прокулевич.

Разработка сухой живой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» и разбавителя-адьюванта для сухих живых вакцин проводилась в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в филиале РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в ООО «НПЦ ПроБиоТех», БГУ и УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» совместно с научным руководителем И.А. Красочко, заведующим кафедрой микробиологии БГУ В.А. Прокулевичем, заведующим ЦИЛ биотехнологии кафедры микробиологии БГУ М.И. Потаповичем и начальником научного отдела УО ВГАВМ, кандидатом ветеринарных наук, доцентом Г.Э. Дремачем, где личное участие соискателя составило 70%.

При подготовке ТНПА и проведении производственных испытаний вакцины «Трихофит Плюс» и разбавителя-адьюванта авторское участие соискателя составило 65%.

В статьях, опубликованных в соавторстве, диссертант участвовал в изучении биохимического состава препарата ПулСал, изготовленного в промышленных условиях [2], а также изучил влияние состава питательных сред на рост мицелия гриба и активно участвовал в разработке состава растворителя посевного материала гриба трихофитона [4].

В статьях [8, 14], написанных в соавторстве, соискатель определил влияние препарата «Стимулонг» и сложного солевого состава на рост штаммов гриба трихофитона, их продуктивность, а также мицелле- и спорообразование при одновре-

менном их содержании в опытной среде и по отдельности, а также изучил влияние солода, полученного разными способами, на рост и спорогенез трихофитонов.

Статьи [1, 3, 5–7, 9–13, 15–20] написаны без соавторства.

По результатам проведенных исследований в соавторстве утверждены методические рекомендации [35], получено 4 технических условий [26–28, 32], в которых автором разработаны разделы 1, 2, 3, 5; разработано 4 промышленных регламента [25, 30, 32, 34], 2 инструкции по применению [29, 33], получено 4 патента Республики Беларусь [21–24] и Евразийский патент [36].

### **Апробация результатов диссертации**

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на заседаниях Ученого совета РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» (2012–2014 гг.); Белорусско-Латвийском форуме «Наука, инновации, инвестиции» (Минск, 25–27 сентября, 2013 г.); Международной научно-практической конференции «Инновации как фактор развития АПК и сельских территорий» (Смоленск, 27 ноября 2013 г.); Республиканской научно-практической конференции «Актуальные проблемы медицины» и 23-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета (Гомель, 13–14 ноября 2014 г.); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (Санкт-Петербург, 21–22 ноября 2014 г.); Международной научно-практической конференции в честь 85-летия факультета технологического менеджмента Горского государственного аграрного университета (Владикавказ, 13–15 ноября, 2015 г.).

### **Опубликованность результатов диссертации**

По материалам исследований опубликовано 20 научных работ, в том числе 13 в рецензируемых источниках, 5 публикаций в материалах конференций и 2 в научно-практическом журнале. Общий объем опубликованного материала по теме диссертации составил 7,13 авторского листа, из них 5,09 – в перечне научных изданий Республики Беларусь, рекомендованных для опубликования результатов исследований диссертационных работ.

По результатам проведенных исследований утверждены методические рекомендации по биотехнологическим основам получения и применения препаратов против трихофитии (1,6 авторского листа).

Также результаты исследований вошли в 4 технических условия (3,47 авторского листа), 4 промышленных регламента (6,75 авторского листа), 2 инструкции по применению и 5 патентов (4 Республики Беларусь и 1 Евразийский патент).



### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 239 страницах компьютерного текста и состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, включающей в себя 3 главы, заключения, библиографического списка и приложений. Библиографический список включает 384 источника, в том числе 109 публикаций зарубежных авторов и 20 публикаций автора. Работа иллюстрирована 58 таблицами.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

**Аналитический обзор литературы по теме, развернутое обоснование выбора направления исследований и изложение общей концепции работы.** В шести подразделах данной главы отражены распространение дерматофитозов в природе и проблемы микозов животных, биологические свойства дерматофитов, состояние иммунитета при дерматофитозах, специфическая профилактика и современные средства защиты от дерматофитозов.

Дается обоснование целесообразности разработки эффективной вакцины против трихофитии крупного рогатого скота, обеспечивающей формирование напряженного и длительного иммунитета в организме человека и животных, и совершенствование с этой целью метода отбора монокультур штаммов гриба трихофитона по технологическим параметрам (спорообразование, жизнеспособность микроконидий), их стабилизации в процессе пересева, оптимизации состава среды для культивирования и сублимации и разработки способа регидратации. Проведен анализ имеющихся научных исследований по данным вопросам. Показана их актуальность и степень изученности.

**Описание объектов исследования и использованных при проведении исследования методов, оборудования.** Экспериментальная часть работы выполнена в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», в филиале РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», на кафедре микробиологии БГУ, в ООО «НПЦ ПроБиоТех», на кафедре химии УО «Витебский государственный университет имени П.М. Машерова» и на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ. Научно-производственные испытания проведены в животноводческих хозяйствах: УКСП Совхоз «Доброволец» Кличевского района Могилевской области, ОАО «Возрождение» МТК «Александрина» и СПК «Ольговское» Витебского района Витебской области.

Основным предметом исследований были телята 45–90-суточного возраста, белые мыши, питательные среды, 3 штамма гриба трихофитона: *Trichophyton verrucosum* № 130, *Trichophyton verrucosum* № 11183 и *Trichophyton mentagrophytes* № 135, защитные среды, растворитель посевного материала, образцы вакцины,

разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота.

При проведении исследований было задействовано разнообразное лабораторное оборудование.

Для культивирования штаммов гриба *Tr. verrucosum* и *Tr. mentagrophytes* использованы агаризованные питательные среды, приготовленные на основе известных прописей и разработанных нами в ходе исследований.

Для стабилизации внешних условий использован метод получения высокоспорообразующих монокультур штаммов гриба, который состоит из этапов (ступеней), на каждом из которых отбираются наиболее продуктивные варианты гриба, что сопровождается увеличением общей продуктивности гриба (ПР ВУ 691457701.02–2014).

Определение количества жизнеспособных микроконидий в вакцинах против трихофитии проводили по разработанному нами и внедренному методу (ТУ ВУ 691457701.022–2015).

Реакцию агглютинации (РА) ставили с целью выявления антител к трихофитонам в исследуемых сыворотках крови с помощью приготовленных нами микозных антигенов.

Влияние разбавителя-адьюванта на иммуногенность предлагаемой и коммерческих вакцин против трихофитии крупного рогатого скота изучали с использованием следующих тестов: определение общего количества форменных элементов и гемоглобина определяли на автоматическом гематологическом анализаторе «МЕК-6450К» фирмы «Nihon Kohden» (Япония) и реактивов производства фирмы «Cormay» (Польша); выведение лейкограммы проводили в мазках крови, высушенных на воздухе и окрашенных по методу Паппенгейма; лизоцимную активность сыворотки крови определяли по методу В.Г. Дорофейчука; бактерицидную активность сыворотки крови определяли по Мюнселю-Трефенсу в модификации О.В. Смирновой и Т.А. Кузьминой; фагоцитоз оценивали путем расчета процента фагоцитоза и фагоцитарного индекса; содержание общего белка в сыворотке крови определяли биуретовым методом; белковые фракции (альбумины,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобулины) определяли методом электрофореза в агаровом геле с использованием наборов «CORMAY GEL PROTEIN 100» фирмы СП «Кормэй-ДиАна» в электрофоретической камере S-20 и последующим денситометрированием на денситометре «Cormay DS 2»; определение Т-лимфоцитов проводили в реакции спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана, В-лимфоцитов – в реакции розеткообразования с эритроцитами барана, нагруженными компонентом.

Биометрическая обработка цифрового материала, полученного в экспериментальных исследованиях, проводилась по Р.Б. Стрелкову с учетом рекомендаций П.Ф. Рокицкого.

Значение критерия достоверности (P) оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала. Вероятность различий считалась существенной при  $P \leq 0,05$ . Статистическая обработка полученных результатов проводилась также с использованием компьютерной программы Microsoft Excel.

Экономическую эффективность применения научных разработок рассчитывали согласно «Методике определения экономической эффективности ветеринарных мероприятий», утвержденной ГУВ МСХ и П РБ в 2000 г.

При расчетах были учтены конкретные хозяйственные показатели, сложившиеся ко времени проведения научно-производственных опытов, а также фактическая закупочная стоимость использованных препаратов и единицы продукции.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫПОЛНЕННЫХ ТЕОРЕТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**Оптимизация процесса солодоращения и приготовления сусла.** Установлено, что природные биостимуляторы – экстракт куколки дубового шелкопряда (ЭКДШ) и экстракт расплода пчел (ЭРП) – в оптимальном соотношении с водой (1:10 000) стимулируют процесс прорастания зерна ячменя, а длина ростков увеличивается соответственно на 15,9% и 18,3%, также сокращается длительность стадий проращивания соответственно на 6–8 и 9 час. На опытных средах, приготовленных из солода, замоченного в природных биостимуляторах, рост грибов проявлялся на 1–2 суток раньше, чем на контрольных. Максимальное накопление микроконидий у *Tr. verrucosum* № 130 установлено на 15-е сутки выращивания и у *Tr. mentagrophytes* № 135 – на 12–13-е сутки, что на 4–6 суток раньше, чем на контрольных.

Солод, полученный из зерна, обработанного биологически активными препаратами «Флоравит», «Самбуцин», «Бионорм В» и «Фузарин», характеризуется повышенной амилолитической (в 1,19–1,26 раза) и осаживающей (в 1,31–1,35 раза) активностями. Сусло-агар, полученный из солода, приготовленного с их использованием, повышал спорогенез у *Tr. verrucosum* № 130 на 16,6–25,5%.

**Оценка влияния посевного материала на рост гриба трихофитона.** Для изготовления противодермальных вакцин важным моментом является накопление спорообразующего мицелия.

В опыте использовали штаммы гриба *Tr. verrucosum* № 130, *Tr. verrucosum* № 11183 и *Tr. mentagrophytes* № 135 и препараты «Бионорм В», ПулСал и Левамизол 10%, разные концентрации которых включали в состав растворителя посевного материала гриба трихофитона. Так, «Бионорм В» в объеме 5,0% обеспечил повышение мицелиеобразования по отношению к контролю у исследуемых

штаммов соответственно на 49,0; 52,0 и 50,0%, а спорообразования – на 75,0; 88,3 и 71,7%, содержание микроконидий – на 17,2; 24,0 и 14,5%, а их жизнеспособность – на 4,5; 4,9 и 5,3%.

Высокую продуктивность штаммов гриба трихофитона установили при содержании в составе растворителя 10,0% препарата ПулСал – спорообразование повышалось у них на 70,6; 78,1 и 62,6%, мицелиеобразование – на 43,1; 43,1 и 46,0%, содержание микроконидий в мицелии штаммов повышалось на 19,5; 24,6 и 15,6%, жизнеспособность – на 3,4; 2,5 и 2,8%.

При включении в растворитель 20,0 мг/дм<sup>3</sup> препарата Левамизол 10% также отмечалась высокая продуктивность у исследуемых штаммов. Мицелиеобразование повышалось у них на 46,0; 48,0 и 44,0%, а спорообразование – на 60,9; 62,6 и 53,5%, содержание микроконидий в мицелии повышалось на 10,3; 9,7 и 6,9%.

Аналогичное влияние на продуктивность исследуемых штаммов гриба оказывали компоненты из дрожжей в составе растворителя посевного материала. Нами установлено, что наиболее высокая продуктивность у штаммов гриба отмечалась при включении в состав растворителя посевного материала до 50,0% автолизата пивных дрожжей. Так, мицелиеобразование повышалось соответственно на 48,0; 46,0 и 46,0%, а продукция микроконидий – на 65,4; 68,5 и 60,0%. При этом жизнеспособность микроконидий у штаммов повышалась соответственно на 9,1–12,4%, а уровень их содержания в единице мицелия – на 9,1–15,2%.

Опытным путем также было установлено, что использование 75,0% автолизата пекарских дрожжей и 0,5% сухого экстракта дрожжей в растворителе посевного материала обеспечивает высокую продуктивность штаммов гриба и экономически наиболее предпочтительнее.

Так, при оптимальном содержании автолизата пекарских дрожжей мицелиеобразование повышалось у штаммов соответственно на 44,0; 48,0 и 44,0%, а спорообразование – на 47,8; 50,1 и 44,0%. Уровень содержания микроконидий в единице мицелия повышался на 2,2% у *Tr. verrucosum* № 130 и № 11183. При включении 0,5% сухого экстракта дрожжей у всех исследуемых штаммов мицелиеобразование повышалось соответственно на 44,0; 42,0 и 46,0%, а спорообразование – на 52,2; 53,3 и 52,5%. При этом содержание микроконидий в мицелии штаммов повышалось соответственно на 5,6; 7,8 и 4,0%.

Применение в качестве растворителя посевного материала разработанной комбинации компонентов, включающей 0,1% натрия хлорида, 0,3–0,8% экстракта дрожжей и 3,0–6,0% сыворотки крови крупного рогатого скота, позволяет без дополнительных затрат питательных сред и энергоносителей существенно снизить производственные затраты на изготовление вакцины и увеличить выход микроконидий на 81,0–86,9%.

**Оптимизация питательной среды с использованием биологически активных компонентов для культивирования гриба рода *Trichophyton*.** Известно, что для изготовления противогрибковых вакцин необходимо использовать культуры гриба рода *Trichophyton* с высоким спорогенезом, так как микроконидии являются носителем иммуногенности препаратов. Это достигается путем постоянного отбора производственных штаммов гриба рода *Trichophyton*, подбора питательных сред и растворителя посевного материала, обеспечивающих образование на них большого количества микроконидий и с высокой жизнеспособностью.

В ходе исследований изучили влияние разных объемов препаратов ПулСал, «Флоравит», а также сухого экстракта дрожжей (СЭД) и автолизата пивных дрожжей (АПД) на продуктивность штаммов гриба *Trichophyton*.

Нами установлено, что наиболее высокая продуктивность штаммов гриба проявлялась при содержании в среде 5,0% ПулСала – мицелле- и спорообразование у производственных штаммов повышались соответственно на 88,2–98,1% и 117,3–126,0%, жизнеспособность микроконидий – на 2,5–3,1%.

Использование препарата «Флоравит» показало, что наиболее выраженное влияние он оказывает в объеме 2,0% – мицелле- и спорообразование повышались соответственно на 12,0–22,4% и 49,3–50,3%, а жизнеспособность микроконидий – на 2,1–4,2%.

Анализ результатов по изучению СЭД показал, что наиболее высокие показатели отмечались при использовании его в объеме 0,2%. Так, мицеллеобразование у исследуемых штаммов повышалось на 46,0–54,0%, а спорообразование – на 63,5–67,1%, содержание микроконидий повышалось только в присутствии 0,2 и 0,4% СЭД – их количество повышалось на 5,7–18,3%.

АПД, внесенный в состав сусло-агара в объеме 2,0%, обеспечивал наиболее высокое повышение мицеллеобразования у штаммов гриба – на 54,0–56,0% и спорообразования – на 77,7–86,4%, содержание микроконидий на сусло-агаре с 2,0 и 4,0% автолизата повышалось на 16,9–28,1%.

Использование природных компонентов влияет на продуктивность штаммов гриба *Trichophyton*. Нами изучено влияние гомогената содержимого куриного яйца (ГСКЯ), препаратов «Бионорм Б», «Бионорм В» и сухого молока на мицелле- и спорообразование штаммов гриба.

Установлено, что при оптимальном содержании в среде ( $25 \text{ см}^3/\text{дм}^3$ ) ГСКЯ у штаммов гриба повышался рост мицелия соответственно на 58,0–60,0%, а спорообразование – на 83,8–86,1%, содержание микроконидий в мицелии, полученном в среде с 25 и  $50 \text{ см}^3/\text{дм}^3$  ГСКЯ, составило  $20,0 \pm 1,1$  и  $20,7 \pm 1,26$  млн/мг.

Более высокая продуктивность по мицелле- и спорообразованию исследуемые штаммы гриба проявляли при внесении в среду «Бионорма Б» в объеме 5,0 и 8,0%: их значения повышались соответственно на 70,6–92,0% и 88,2–112,4%.

Экономически предпочтительнее вносить в среду 5,0% препарата. Схожие результаты получены при включении в среду 5,0% «Бионорма В».

При включении 1,0% сухого молока мицеллеобразование повышалось на 48,0–60,0%, а спорообразование – на 69,1–70,6%, жизнеспособность микроконидий составила 81,1–81,3%.

Нами изучено влияние разных объемов сыворотки крови и гидролизатов белков сыворотки крови крупного рогатого скота (сывороточный компонент) на мицелле- и спорообразование, уровень содержания микроконидий в мицелии и их жизнеспособность у штаммов гриба *Trichophyton*.

При содержании в среде 5,0% сывороточного компонента у гриба *Trichophyton* повышался рост мицелия на 21,8–28,6%, спорообразование – на 54,4–58,8%, уровень содержания микроконидий составил 21,4–27,8 млн микроконидий/мг. Схожие данные получены на сусло-агаре, содержащем 5,0% сыворотки крови. Так, для активации роста мицелия и спорообразования у штаммов гриба в сусло-агар предпочтительно включать 5,0% сыворотки или сывороточного компонента крови крупного рогатого скота.

Также были проведены исследования по определению влияния препарата «Стимулонг» и сложного солевого состава (ССС) на рост штаммов трихофитона. При определении влияния на мицелле- и спорообразование гриба одновременного содержания в опытной среде 2,0% СССР и 0,03% препарата «Стимулонг» установлено, что у штаммов гриба *Trichophyton* спорообразование повышалось на 74,3–75,5, а мицеллеобразование – на 56,0–63,3%.

Для повышения продуктивности штаммов гриба в сусло-агар рекомендуется включать витамин В<sub>1</sub> в концентрации 10 мг/дм<sup>3</sup> – спорообразование повышалось на 36,4–37,9%, а мицеллеобразование – на 28,6–32,7% и только у штамма *Tr. verrucosum* № 130 мицеллеобразование повышалось на 88,4%.

Как повышение, так и понижение содержания витамина В<sub>1</sub> приводило к снижению мицелле- и спорообразования у всех изученных штаммов гриба.

**Оценка эффективности использования углеводов трихофитомом на средах разного состава.** Важным показателем, обеспечивающим информацией об эффективности использования компонентов среды, является экономический коэффициент по утилизации (ЭКУ) углеводов, т.е. количество образовавшейся биомассы гриба на единицу утилизированного углевода.

Для оценки эффективности использования углеводов трихофитомом на средах разного состава в сусло-агар вносили в оптимальных объемах: ГСКЯ, СЭД, АПД, сухое молоко и препараты «Бионорм Б», «Бионорм В», ПулСал, «Флоравит».

При изучении динамики накопления биомассы гриба рода *Trichophyton* на средах разного состава и содержания углеводов нами установлено, что наиболее

высокая продуктивность по мицелию ( $9,6 \pm 0,38 - 9,86 \pm 0,42$  г/дм<sup>3</sup>) и спорогенезу ( $194,8 \pm 8,4 - 200,7 \pm 8,8$  млн/см<sup>3</sup>) при высоком ЭКУ углеводов ( $0,19 - 0,20$ ) установлена на средах, содержащих 2,5% ГСКЯ, 5,0% препарата «Бионорм Б», 5,0% препарата «Бионорм В» и  $60,0 \pm 1,3 - 62,0 \pm 1,0$  г/дм<sup>3</sup> углеводов.

**Оценка влияния состава защитной среды на жизнеспособность микроконидий гриба трихофитона.** Разработано 7 вариантов защитной среды для сублимационного высушивания трихофитона (Патент № 13795). Установлено, что предложенные составы защитной среды обеспечивали сохранение жизнеспособности у  $90,2 \pm 1,3 - 95,2 \pm 1,7\%$  микроконидий, сублимированных штаммов гриба трихофитона в течение 24 месяцев хранения, а на контрольной среде данный показатель составил  $67,2 \pm 1,7\%$ .

Наилучшие технологические показатели отмечены при использовании защитной среды, содержащей, в %: сухое молоко – 8,0, желатин – 1,0, защитная композиция – остальное. Защитную композицию готовили путем смешивания, в %: трилона Б – 1,4; сахарозы – 33,0 и воды – остальное.

При этом наиболее предпочтительно смешивать данную защитную среду с грибной суспензией в соотношении 1:4, что обеспечивает жизнеспособность у 93,0% микроконидий.

**Оптимизация процесса сублимации гриба трихофитона.** На первом этапе было установлено, что продолжительность оптимальных схем сублимации культур гриба длится в течение 70–85 часов. Данная сушка культур гриба позволяет сохранить жизнеспособность у  $82,4 \pm 1,4 - 96,6 \pm 2,1\%$  микроконидий. Для окончательного выбора схемы сушки мы заложили препараты для хранения при температуре  $+4 + 8^\circ\text{C}$  на 12 месяцев. Нами установлено, что наиболее высокая жизнеспособность микроконидий  $93,0 \pm 1,7 - 93,9 \pm 1,9\%$  обеспечена у культур, высушенных по схеме № 4, длительность которой составила 75 часов: замороженную грибную суспензию первые 13 часов сублимировали при  $-40^\circ\text{C}$ , с 13-го по 45-й час продукт подогревали до  $-35^\circ\text{C}$ , а затем – до  $0^\circ\text{C}$ , с 45-го до 68-го часа – с  $0^\circ\text{C}$  до  $+25^\circ\text{C}$ , с 68-го по 75-й час процесс досушивания вели при  $+25 + 28^\circ\text{C}$ .

**Регидратация сухих культур трихофитона.** В настоящее время в Республике Беларусь для регидратации сухих вакцин против дерматомикозов используется стерильный физиологический раствор.

Для растворения сухих вакцин нами было разработано 7 вариантов растворителя для сухих вакцин против трихофитии на основе 1%-ного раствора липополисахаридной фракции (ЛПС-Ф) О-антигена бактерий *Salmonella dublin* (Патент № 11671).

В ходе проведенных исследований нами установлено, что растворители, состоящие из, в %: 1%-ного раствора ЛПС-Ф О-антигена бактерий *S. dublin* – 20,0; NaCl – 0,5; экстракта дрожжей – 0,1 и воды – до 100% и 1%-ного раствора ЛПС-Ф О-антигена бактерий *S. dublin* – 16,0; NaCl – 0,6; экстракта дрожжей – 0,5 и воды – остальное, обеспечивали наилучшее восстановление жизнеспособности у  $95,0 \pm 1,7$ – $95,4 \pm 2,8$ % микроконидий и их сохранность даже через 12 месяцев хранения. Физиологический раствор восстанавливает жизнеспособность только у  $67,2 \pm 1,4$  микроконидий через 12 месяцев хранения.

**Разработка растворителя для сухих живых вакцин против трихофитии на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона.** В ходе исследований установили, что разработанные нами 9 вариантов растворителя по параметрам безвредности и токсичности относятся к безвредным препаратам и к IV группе опасности (вещества малотоксичные) по ГОСТ 12.1.007–76.

На основе проведенных исследований выяснили, что наиболее высокую жизнеспособность микроконидий обеспечили опытные образцы растворителя № 2 и № 3, приготовленные путем ресуспендирования субстанции бычьего рекомбинантного гамма-интерферона в количестве, обеспечивающем антивирусную активность не менее  $1 \times 10^4$  ТЦД<sub>50</sub> на 100 см<sup>3</sup> водной суспензии. При этом водная суспензия опытного образца № 2 содержит, в %: сумму аминокислот – 0,043, тиамин гидрохлорид – 0,001, натрия хлорид – 0,5, калия хлорид – 0,02, кальция хлорид – 0,01, магния хлорид – 0,01, натрий фосфорнокислый однозамещенный – 0,01, соду питьевую – 0,1, гуматы (соли гуминовой кислоты) – 0,015 и глюкозу – 3,0, а опытного образца № 3 – сумму аминокислот – 0,087, тиамин гидрохлорид – 0,002, натрия хлорид – 0,8, калия хлорид – 0,04, кальция хлорид – 0,02, магния хлорид – 0,02, натрий фосфорнокислый однозамещенный – 0,013, соду питьевую – 0,22.

Из полученных данных установили, что они обеспечивали наиболее высокую жизнеспособность микроконидий гриба: при изготовлении –  $96,2 \pm 4,7$ – $96,3 \pm 3,9$ %, через 12 месяцев хранения –  $94,2 \pm 2,7$ – $94,4 \pm 3,3$ %, тогда как вакцина, ресуспендированная в физиологическом растворе, восстанавливала жизнеспособность при изготовлении у  $50,0 \pm 1,9$ % микроконидий, а через 12 месяцев хранения – у  $44,6 \pm 4,3$ %.

В наших последующих исследованиях и в ТНПА мы использовали растворитель, приготовленный на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона, который далее обозначался как «разбавитель-адьювант».

**Влияние опытного образца разбавителя-адьюванта на биологические свойства коммерческих вакцин против трихофитии.** С этой целью мы использовали вакцины живые сухие против трихофитии крупного рогатого скота произ-



водства ОАО «БелВитунифарм» (серия № 56) и ОАО «Ставропольская биофабрика» (серия № 43).

Титр специфических антител к грибу трихофитону в сыворотке крови животных определяли в РА. Для постановки РА антиген изготавливали из штамма культуры *Tr. verrucosum* № 130.

В ходе проведенных исследований с вакциной производства ОАО «БелВитунифарм» нами установлено, что уровень общего белка и гамма-глобулинов в сыворотке крови телят, иммунизированных вакциной, ресуспендированной в разбавителе-адьюванте, выше, чем у телят, иммунизированных вакциной, ресуспендированной в физиологическом растворе. У телят, которым вводили вакцину с разбавителем-адьювантом, через 14 суток после однократной вакцинации увеличивалась бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК) соответственно на 18,6%, а после двукратной – на 23,4%.

Лизоцимная активность сыворотки крови (ЛАСК) достоверно повышалась у животных всех групп. При этом показатели клеточных факторов неспецифической защиты организма телят (лимфоциты, Т- и В-лимфоциты, фагоцитарный индекс и процент фагоцитоза) повышались как после одно-, так и двукратной иммунизации.

Мы установили, что при иммунизации телят вакциной, ресуспендированной в физиологическом растворе, для обеспечения их иммунной защиты против трихофитии, требуется двукратная иммунизация. Вакцина против трихофитии, ресуспендированная в разбавителе-адьюванте, через 21 сут после однократного введения обеспечивает иммунную защиту против трихофитии (титр антител в РА 1:320–1:640).

Профилактическую эффективность вакцины производства ОАО «Ставропольская биофабрика», ресуспендированной в физиологическом растворе, оценивали через 30 суток после повторного ее введения, а вакцины, ресуспендированной разбавителем-адьювантом, – через 30 суток после однократного введения.

В ходе проведенных испытаний нами установлено, что испытываемая вакцина живая сухая против трихофитии крупного рогатого скота, ресуспендированная разбавителем-адьювантом, после однократного введения обеспечивает высокую профилактическую эффективность (до 100%). В контрольной группе, в которой животным вводили вакцину, ресуспендированную физиологическим раствором, профилактическая эффективность составила 97,5% после двукратного введения с интервалом в 14 суток, и у 5,0% телят выявлялся поствакцинальный синдром (повышение температуры, признаки лихорадки, отсутствие аппетита), который длился до 4 суток.

Таким образом, при применении разбавителя-адьюванта расход вакцины и трудовые затраты на профилактику трихофитии снижаются в 2 раза, по

сравнению с использованием физиологического раствора.

**Оценка влияния разбавителя-адьюванта на биологические свойства экспериментального образца вакцины против трихофитии.** В работе использовали экспериментальный образец вакцины концентрированной сухой против трихофитии крупного рогатого скота серии № 1, изготовленный на ООО «НПЦ ПроБиоТех», а для ресуспендирования вакцины использовали физиологический раствор и предлагаемый разбавитель-адьювант для сухой живой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота серии № 1, изготовленный на базе ООО «НПЦ ПроБиоТех» согласно ТУ ВУ 691457701.013–2014.

Было установлено, что уровень общего белка и гамма-глобулинов в сыворотке крови телят, иммунизированных экспериментальным образцом разработанной вакцины, ресуспендированным в разбавителе-адьюванте, выше, чем у телят, иммунизированных экспериментальным образцом, ресуспендированным в физиологическом растворе. В свою очередь, БАСК, ЛАСК и значения показателей клеточных факторов неспецифической защиты организма телят были схожи с показателями, полученными при ресуспендировании разбавителем-адьювантом вакцины производства ОАО «БелВитунифарм».

Кроме этого, экспериментальный образец вакцины, ресуспендированный физиологическим раствором, обеспечивает иммунную защиту телят после ее двукратного введения (по 1 дозе на введение), а предлагаемым разбавителем-адьювантом – через 21 сутки после однократной иммунизации (титр антител в РА 1:320–1:640).

Таким образом, разбавитель-адьювант является высокоэффективным иммуномодулятором, стимулирует презентацию антигена, благотворно воздействует на систему клеточного и гуморального иммунитета, стимулирует формирование иммунной памяти, проявляет адьювантные свойства, усиливает напряженность иммунитета, снимает посвакцинальный синдром, препятствует возникновению аллергических реакций на вводимую культуру *Trichophyton verrucosum*, препятствует возникновению других инфекционных болезней животных в поствакцинальный период, повышает и стабилизирует жизнеспособность микроконидий, стимулирует приживание микроконидий в организме иммунизированных животных.

**Сравнительная оценка лечебно-профилактической эффективности предлагаемой и коммерческой вакцин против трихофитии крупного рогатого скота.** На основании комплекса проведенных исследований нами разработана согласно ТНПА «Вакцина сухая живая против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс», которая комплектуется разбавителем-адьювантом на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона. Вакцина изготавливается из субстанции гриба *Trichophyton*, выращенного по разработанному способу с ис-

пользованием оптимизированной питательной среды и растворителя посевного материала гриба, которую лиофилизировали в защитной среде, приготовленной из субстанции среды защитной «ДерВак».

Для проведения производственных испытаний предлагаемой вакцины «Трихофит Плюс» серии № 1, изготовленной в феврале 2015 г. на ООО «НПЦ ПроБиоТех», и коммерческой вакцины живой сухой против трихофитии крупного рогатого скота серии № 125, изготовленной в январе 2015 г. на ОАО «БелВитунифарм», в условиях хозяйства были сформированы 2 группы телят (№ 1 и 2) 60–80-суточного возраста. Животным 1-й группы (n=50) согласно инструкции применяли коммерческую вакцину.

Телятам 2-й группы (n=88) назначали предлагаемую вакцину «Трихофит Плюс» однократно по 1 дозе в объеме 5,0 см<sup>3</sup>. Дозу вакцины растворяли в 5,0 см<sup>3</sup> разбавителя-адьюванта серии № 1, изготовленном в марте 2014 г.

Профилактическую эффективность коммерческой вакцины оценивали через 30 суток после повторного ее введения, а предлагаемой вакцины «Трихофит Плюс» – через 30 суток после однократного введения.

Для оценки лечебной эффективности телятам 3-й группы (n=12), больным трихофитией, согласно инструкции применяли коммерческую вакцину.

Телятам 4-й группы (n=14) больным трихофитией двукратно с интервалом 10 суток назначали дозу предлагаемой вакцины «Трихофит Плюс» в объеме 8,0 см<sup>3</sup>, которую предварительно ресуспендировали разбавителем-адьювантом из расчета 5,0 см<sup>3</sup> на 1 дозу препарата.

Лечебную эффективность испытуемых вакцин оценивали в течение 40 суток после повторного введения.

Было установлено, что предлагаемая вакцина сухая живая против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» после однократного введения обеспечивает высокую профилактическую эффективность (до 100%), а после двукратного введения (суммарно – 3,1 доз) обеспечивает выздоровление телят, больных трихофитией, через 28 суток после повторной ее инъекции.

В то же время лечебная эффективность коммерческой вакцины при двукратном введении (суммарно – 4 дозы) составила 91,7%. Длительность лечения при этом составила 37 суток, а одному теленку из группы № 3 потребовалась дополнительная третья инъекция – 2 дозы коммерческой вакцины.

**Экономическая эффективность предлагаемой вакцины против трихофитии.** Экономический эффект от производства вакцины «Трихофит Плюс» по предлагаемой технологии для удовлетворения потребности животноводства Республики Беларусь составляет 5,6 млрд руб. (расчет на 10 млн доз), а экономическая эффективность – 16,2 руб. на один рубль затрат.

Применение вакцины «Трихофит Плюс» снижает затраты на проведение

ветеринарных мероприятий для профилактической обработки 1 головы теленка на 261,6 тыс. руб.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Основные научные результаты диссертации

1. Оптимизирован и предложен технологичный способ получения ячменного солода с использованием биологических препаратов «Флоравит», «Самбуцин», «Бионорм В» и «Фузарин» в разведении 1:200–1:500, а среды, полученные из такого солода, повышают индекс жизнеспособности микроконидий на  $106,1 \pm 3,0$ – $111,7 \pm 8,4\%$ . Солод, полученный с использованием экстракта куколки дубового шелкопряда и экстракта расплодки пчел, характеризуется повышенной амилолитической (в 1,15–1,42 раза) и осаживающей (в 1,24–1,25 раза) активностью [10, 14].

2. Включение в состав сусло-агара в оптимальных концентрациях ПулСала (5,0%), «Флоравита» (2,0%), сухого экстракта дрожжей (0,2%), автолизата пивных дрожжей (2,0%), гомогената содержимого куриного яйца (2,5%), «Бионорма Б» (5,0%), «Бионорма В» (5,0%), сухого молока (1,0%), витамина В<sub>1</sub> (10 мг/дм<sup>3</sup>), хлорида цинка, хлорида марганца и хлорида железа (по 20,0 мкг/дм<sup>3</sup>), сыворотки (5,0%) или сывороточного компонента крови крупного рогатого скота (5,0%), «Стимулонга» (0,03%), сложного солевого состава (0,1%) позволяет повысить продуктивность разных штаммов гриба трихофитона по мицелле- и спорообразованию. Для интенсификации роста биомассы и спорогенеза у гриба трихофитона при производстве вакцин инокулят следует вносить в объеме 1,0 млн живых микроконидий на 1 см<sup>3</sup> оптимизированной среды [2, 3, 6, 11–13, 16, 18].

3. Для обеспечения максимального уровня мицелле- и спорообразования в состав растворителя посевного материала целесообразно включать соответственно: 50,0% автолизата пивных дрожжей или 75,0% автолизата пекарских дрожжей, или 0,5% сухого экстракта дрожжей, или 5,0% «Бионорма В», или 10,0% ПулСала, или 20 мг/дм<sup>3</sup> Левамизола 10%.

Применение в качестве растворителя посевного материала разработанной комбинации компонентов, включающей 0,1% натрия хлорида, 0,3–0,8% экстракта дрожжей и 3,0–6,0% сыворотки крови крупного рогатого скота, позволяет существенно снизить производственные затраты на изготовление вакцины и увеличить выход микроконидий в 1,81–1,86 раза [4, 5, 17].

4. На основе использования оптимизированных составов сусло-агара и растворителя посевного материала разработан метод направленного отбора штаммов гриба *Trichophyton* по продуктивности микроконидий, позволяющий повысить выход вакцины в 3,7 раза [8, 9].

5. Разработан состав защитной среды с рН 6,0–6,5, обеспечивающий сохранение жизнеспособности микроконидий в составе вакцины до  $90,2 \pm 1,3$ – $95,2 \pm 1,7\%$

в течение 24 месяцев хранения, и схема сублимации культур трихофитона, обеспечивающая им стабильность и иммуногенность, а также позволяющая сохранить высокую жизнеспособность микроконидий как непосредственно после окончания процесса ( $96,6 \pm 2,1\%$ ), так и через 12 месяцев хранения ( $93,0 \pm 1,7 - 93,9 \pm 1,7\%$ ) [1, 7].

6. Разработаны вакцина сухая живая против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» (ТУ ВУ 691457701.022–2015) и разбавитель-адьювант на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона (ТУ ВУ 691457701.013–2014 и Евразийский патент № 025263). Однократное введение 1 дозы разработанной вакцины обеспечивает высокую (до 100%) профилактическую эффективность при сохранении высокой иммуногенности (титр антител в РА 1:320–1:640) и снимает возможный поствакцинальный синдром. При применении разбавителя-адьюванта расход вакцины и трудовые затраты на профилактику трихофитии снижаются в 2 раза, по сравнению с использованием физиологического раствора.

Экономическая эффективность проводимых мероприятий с использованием предлагаемой вакцины «Трихофит Плюс» составляет 16,2 руб. на 1 рубль затрат [15, 19, 20].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

1. Разработан состав защитной среды для сублимационного высушивания гриба и оптимизирован режим его сублимации; разработан состав растворителя для живых сухих вакцин против трихофитии, питательной среды и растворителя посевного материала с использованием иммунобиологического препарата из соматических антигенов сальмонелл ПулСал [21–24].

2. Предложен способ выращивания гриба трихофитона и метод отбора высокоспорообразующих монокультур штаммов гриба, который состоит из этапов (ступеней), на каждом из которых отбираются наиболее продуктивные варианты гриба с использованием оптимизированного сусло-агара и растворителя посевного материала специального состава, что сопровождается увеличением продуктивности гриба по образованию микроконидий и их жизнеспособности в 1,81–1,86 раза и обеспечением поддержания полезных технологических свойств гриба в течение 15 пассажей [21, 30].

3. Предложены производству субстанция сухая гриба *Trichophyton* и субстанция среды защитной «ДерВак» для изготовления вакцины сухой живой против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» [27, 28, 31, 34].

4. Разработан и внедрен в ветеринарную практику метод определения количества жизнеспособных микроконидий в вакцинах против трихофитии крупного рогатого скота, позволяющий контролировать ее качество, эффективность, выход и стабильность за счет полного восстановления

жизнеспособности микроконидий [32].

5. Промышленное производство и контроль качества предлагаемой вакцины «Трихофит Плюс» рекомендуется осуществлять согласно разработанному регламенту и техническим условиям (ПР ВУ 691457701.02–2014 и ТУ ВУ 691457701.022–2015 на вакцину сухую живую против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс»), а применять – в соответствии с инструкцией, одобренной на заседании Ветбиофармсовета, протокол № 30 от 30 октября 2015 г. и методическими рекомендациями [30, 32, 33, 35].

6. Промышленное производство и контроль качества предлагаемого разбавителя-адьюванта рекомендуется осуществлять согласно разработанному промышленному регламенту, техническим условиям и Евразийскому патенту (ПР ВУ 691457701.01–2014, ТУ ВУ 691457701.013–2014 и № 025263 на разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота), а применять – в соответствии с инструкцией, одобренной на заседании Ветбиофармсовета, протокол № 73 от 11 июля 2014 г. [25, 26, 29, 36].

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

**Статьи, включенные в перечень научных изданий ВАК для опубликования результатов диссертации**

1. **Зайцева, В.В.** Влияние состава защитной среды на выживаемость спор дерматофитов / В.В. Зайцева // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2012. – Т. 48, вып. 1. – С. 31–34.

2. Биохимические свойства препарата ПулСал, изготовленного в промышленных условиях / А.В. Зайцева, Р.Б. Корочкин, В.В. Щерба, **В.В. Зайцева** // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2012. – Т. 48, вып. 1. – С. 90–94.

3. **Зайцева, В.В.** Регидратация сухих культур дерматофитов / В.В. Зайцева // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2012. – Т. 48, вып. 2. – Ч. 1. – С. 73–77.

4. **Зайцева, В.В.** Оптимизация выращивания дерматофитов на питательных средах разного состава / В.В. Зайцева, И.А. Красочко // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2012. – Т. 48, вып. 2 – Ч. 1. – С. 77–81.

5. **Зайцева, В.В.** Влияние способа приготовления посевного материала для культивирования гриба трихофитон / В.В. Зайцева // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2013. – Т. 49, вып. 2. – Ч. 2. – С. 49–53.

6. **Зайцева, В.В.** Влияние компонентов микроорганизмов на продуктивность дерматофитов на сусло-агаре / В.В. Зайцева // Веснік Віцебскага дзяржаўнага ўніверсітэта : навукова-практычны часопіс / УО «ВГУ имени П.М. Машерова». – Витебск, 2014. – № 3(81). – С. 42–48.

7. **Зайцева, В.В.** Оптимизация процесса сублимации гриба трихофитон / В.В. Зайцева // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сборник научных трудов / УО «Гродненский государственный аграрный университет» ; под. ред. В.К. Пестиса. – Гродно, 2014. – Т. 25. – С. 84–91.

8. **Зайцева, В.В.** Влияние состава плотной питательной среды на продуктивность дерматофитов / В.В. Зайцева, И.А. Красочко // Экология и животный мир : международный научно-практический журнал / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2015. – № 1. – С. 53–59.

9. **Зайцева, В.В.** Влияние продуктов животного происхождения и природных компонентов на продуктивность дерматофитов на сусло-агаре / В.В. Зайцева // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария : международный научно-практический журнал / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2015. – № 2. – С. 20–27.

10. **Зайцева, В.В.** Влияние биологических природных компонентов на процесс солодоращения ячменя и биологические свойства дерматофитов / В.В. Зайцева // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария : международный научно-практический журнал / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2015. – № 3. – С. 15–21.

11. **Зайцева, В.В.** Динамика роста гриба трихофитона на плотных средах разного состава / В.В. Зайцева // Экология и животный мир : международный научно-практический журнал / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2015. – № 2. – С. 26–31.

12. **Зайцева, В.В.** Влияние дозы инокулята на динамику развития грибов рода *Trichophyton* на плотных питательных средах / В.В. Зайцева // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал / УО ВГАВМ ; под ред. А.И. Ятусевича. – Витебск, 2015. – Т. 51, вып. 2. – С. 39–43.

13. **Зайцева, В.В.** Оценка эффективности использования углеводов трихофитом на средах разного состава / В.В. Зайцева // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария : международный научно-практический журнал /

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». – Минск, 2016. – № 1. – С. 16–23.

### **Материалы конференций**

14. **Зайцева, В.В.** Интенсификация процесса получения ячменного солода и сусла в биотехнологии / В.В. Зайцева, А.В. Зайцева // Наука, инновации, инвестиции : материалы Белорусско-Латвийского форума / БНТУ. – Минск, 2013. – С. 94–96.

15. **Зайцева, В.В.** Испытание влияния бычьего рекомбинантного интерферона на биологическую активность вакцины против трихофитии / В.В. Зайцева // Инновации как фактор развития АПК и сельских территорий : сборник материалов международной научно-практической конференции / ФГБОУ ВПО «Смоленская государственная сельскохозяйственная академия». – Смоленск, 2013. – Ч. II. – С. 215–219.

16. **Зайцева, В.В.** Оптимизация состава плотной среды для культивирования гриба трихофитон / В.В. Зайцева // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – СПб, Изд-во ФГБОУ ВПО «СПбГАВМ», 2014. – С. 36–38.

17. **Зайцева, В.В.** Влияние компонентов дрожжей в составе разбавителя посева материала на продуктивность дерматофитов / В.В. Зайцева // Актуальные проблемы медицины : сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции и 23-й итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, 13–14 ноября 2014 года / УО «Гомельский государственный медицинский университет. – Гомель, 2014. – Т. 2. – С. 32–35.

18. **Зайцева, В.В.** Исследования состава полисахаридов водорослей как компонентов питательной среды для выращивания дерматофитов / В.В. Зайцева // Инновационные технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции : материалы Международной научно-практической конференции в честь 85-летия факультета технологического менеджмента 13-15 ноября, 2015 года / ФГБОУ ВПО «Горский государственный аграрный университет». – Владикавказ, 2015. – С. 134–137.

### **Статьи в научных журналах**

19. **Зайцева, В.В.** Отечественный разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии / В.В. Зайцева // Наше сельское хозяйство : научно-практический журнал / Частное предприятие «Наша идея». – Минск, 2016. – № 16 (144). – С. 26–30.



20. **Зайцева, В.В.** Влияние разбавителя-адьюванта на иммуногенность коммерческих вакцин против трихофитии / В.В. Зайцева // Наше сельское хозяйство : научно-практический журнал / Частное предприятие «Наша идея». – Минск, 2016. – № 20 (148). – С. 18–22.

#### **Работы, подтверждающие практическую значимость результатов**

21. Способ выращивания гриба дерматофита : пат. 11353 Респ. Беларусь, МПК<sup>6</sup> С 12N 1/14 / **В.В. Зайцева**, Г.Э. Дремач, Л.П. Зайцева ; заявители : В.В. Зайцева, Г.Э. Дремач, Л.П. Зайцева. – № а 20060101 ; заявл. 08.02.06 ; опубл. 30.12.08 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2008. – № 6. – С. 115–116.

22. Способ получения препарата для иммунокоррекции из сальмонеллезных бактерий : пат. 11671 Респ. Беларусь, МПК<sup>6</sup> А 61К 35/66 / А.В. Зайцева, Г.Э. Дремач, А.А. Вербицкий, **В.В. Зайцева** ; заявитель УО ВГАВМ – № а 20070348 ; заявл. 04.04.07 ; опубл. 28.02.09 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2009. – № 1. – С. 56.

23. Среда для сублимации грибов рода трихофитон или микроспорум и способ сублимации : пат. 13795 Респ. Беларусь, МПК<sup>9</sup> С 12N 1/04 / **В.В. Зайцева**, Г.Э. Дремач ; заявители : В.В. Зайцева, Г.Э. Дремач. – № а 20071409 ; заявл. 21.11.07 ; опубл. 30.12.10 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2010. – № 6. – С. 90–91.

24. Способ получения препарата для иммунокоррекции : пат. 14028 Респ. Беларусь, МПК<sup>9</sup> А 61К 39/108, 39/112 / А.В. Зайцева, **В.В. Зайцева**, Г.Э. Дремач, Л.П. Зайцева ; заявители : А.В. Зайцева, В.В. Зайцева, Г.Э. Дремач, Л.П. Зайцева. – № а 20090306 ; заявл. 04.03.09 ; опубл. 28.02.11 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2011. – № 1. – С. 81.

25. Промышленный регламент на разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота : ПР ВУ 691457701.01 – 2014 : утв. 18.03.2014 г. / ООО «НПЦ ПроБиоТех» ; авт. В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**. – Минск, 2014. – 31 с.

26. Технические условия на разбавитель-адьювант для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота : ТУ ВУ 691457701.013–2014 : утв. ООО «НПЦ ПроБиоТех» 10.04.2014 г. / сост. В.А. Прокулевич, М.И. Потапович, **В.В. Зайцева**, И.А. Красочко, Г.Э. Дремач. – Минск, 2014. – 13 с.

27. Технические условия на субстанцию гриба Trichophyton : ТУ ВУ 691457701.014–2014 : утв. ООО «НПЦ ПроБиоТех» 05.05.2014 г. / сост. **В.В. Зайцева**, В.А. Прокулевич, М.И. Потапович. – Минск, 2014. – 12 с.

28. Технические условия на субстанцию среды защитной «ДерВак» : ТУ ВУ 691457701.015–2014 : утв. ООО «НПЦ ПроБиоТех» 05.05.2014 г. / сост. **В.В. Зайцева**, В.А. Прокулевич. – Минск, 2014. – 12 с.

29. Инструкция по применению разбавителя-адьюванта для сухих живых вакцин против трихофитии крупного рогатого скота : рассмотрена и одобрена на Ветбиофармсовете 11.07.2014 г. / В.А. Прокулевич, М.И. Потапович, Г.Э. Дремач, И.А. Красочко, **В.В. Зайцева**. – Минск, 2014. – 1 с.

30. Промышленный регламент на вакцину сухую живую против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» : ПР ВУ 691457701.02 – 2014 : утв. 12.08.2014 г. / ООО «НПЦ ПроБиоТех» ; авт. В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**. – Минск, 2014. – 31 с.

31. Промышленный регламент на субстанцию гриба Trichophyton : ПР ВУ 691457701.04 – 2015 : утв. 14.01.2015 г. / ООО «НПЦ ПроБиоТех» ; авт. В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**. – Минск, 2015. – 25 с.

32. Технические условия на вакцину сухую живую против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» : ТУ ВУ 691457701.022–2015 : утв. ООО «НПЦ ПроБиоТех» 01.10.2015 г. / сост. В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**, М.И. Потапович, И.А. Красочко, Г.Э. Дремач. – Минск, 2015. – 15 с.

33. Инструкция по применению вакцины сухой живой против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» : рассмотрена и одобрена на Ветбиофармсовете 30.10.2015 г. / И.А. Красочко, **В.В. Зайцева**, Г.Э. Дремач, А.В. Зайцева. – Минск, 2015. – 2 с.

34. Промышленный регламент на субстанцию среды защитной «ДерВак» : ПР ВУ 691457701.05 – 2015 : утв. 18.02.2015 г. / ООО «НПЦ ПроБиоТех» ; авт. В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**. – Минск, 2015. – 30 с.

35. Биотехнологические основы получения и применения препаратов против трихофитии : утв. 15.04.2016 г. № 2728 / Г.Э. Дремач, **В.В. Зайцева**, А.В. Зайцева.

36. Разбавитель-адьювант для сухой живой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота : пат. 025263 ЕА, Int. Cl. А61К 31/195, 38/21, 39/39, А61Р 31/10 / В.А. Прокулевич, **В.В. Зайцева**, Г.Э. Дремач, М.И. Потапович ; заявитель : ООО «НПЦ ПроБиоТех». – № 201400910 ; заявл. 23.06.14 ; опубл. 30.12.2016.

**РЭЗІЮМЭ****Зайцава Вікторыя Уладзіміраўна****Стымуляцыя біялагічнай актыўнасці грыба роду *Trichophyton* пры канструяванні вакцыны супраць трыхафітыі буйной рагатай жывёлы**

**Ключавыя словы:** трыхафітон, пажыўнае асяроддзе, культываванне, сублімацыя, рэактывацыя, ахоўнае асяроддзе, разбавіцель-ад'ювант.

**Мэта працы:** распрацаваць спосабы стымуляцыі біялагічнай актыўнасці грыба роду *Trichophyton* і поствакцынальнага імунітэту пры канструяванні і прымяненні айчыннай вакцыны супраць трыхафітыі буйной рагатай жывёлы.

**Метады даследавання:** мікалагічныя, сералагічныя, імуналагічныя, біяхімічныя і гематалагічныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна:** вывучаны біялагічныя ўласцівасці грыба роду *Trichophyton*, упершыню распрацаваны разбавіцель-ад'ювант на аснове гама-інтэрферону бычынага рэкамбінантнага для вакцын супраць трыхафітыі, дадзена імуналагічнае абгрунтаванне сумеснага прымянення вакцыны супраць трыхафітыі з разбавіцелем-ад'ювантам адмысловага складу.

Дэталёва ахарактарызаваны асаблівасці змены рэзістэнтнасці арганізму цялят пры ўвядзенні прапанаванай вакцыны, рэсуспендзіраванай разбавіцелем-ад'ювантам, і абгрунтавана яе ўключэнне ў комплекс лячэбна-прафілактычных мерапрыемстваў пры трыхафітыі.

**Рэкамендацыі вытворчасці:** ТНПА на вытворчасць і прымяненне вакцыны сухой жывой супраць трыхафітыі буйной рагатай жывёлы «Трыхафіт Плюс» і разбавіцелю-ад'юванта. Еўразійскі патэнт № 025263 «Разбавіцель-ад'ювант для сухой жывой вакцыны супраць трыхафітыі буйной рагатай жывёлы», патэнт № 14028 «Спосаб атрымання прэпарата для імунакарэкцыі», патэнт № 13795 «Асяроддзе для сублімацыі грыбоў роду трыхафітон і мікраспорум і спосаб сублімацыі», патэнт № 11671 «Спосаб атрымання прэпарата для імунакарэкцыі з сальманелёзных бактэрыяў», патэнт № 11353 «Спосаб вырошчвання грыба дэрматафіта».

Тэхнічныя ўмовы і прамысловыя рэгламенты на вытворчасць субстанцыі грыба *Trichophyton* і субстанцыі ахоўнага асяроддзя «ДэрВак».

**Галіна прымянення:** матэрыялы патэнтаў, ТНПА, тэхнічных ўмоў і прамысловых рэгламентаў выкарыстоўваюцца ва ўмовах ТАА «НПЦ ПраБіяТэх» пры вырабе біяпрэпаратаў.

**РЕЗЮМЕ****Зайцева Виктория Владимировна****Стимуляция биологической активности гриба рода *Trichophyton* при конструировании вакцины против трихофитии крупного рогатого скота**

**Ключевые слова:** трихофитон, питательная среда, культивирование, сублимация, реактивация, разбавитель-адъювант.

**Цель работы:** разработать способы стимуляции биологической активности гриба рода *Trichophyton* и поствакцинального иммунитета при конструировании и применении отечественной вакцины против трихофитии крупного рогатого скота.

**Методы исследования:** микологические, серологические, иммунологические, биохимические и гематологические.

**Полученные результаты и их новизна:** изучены биологические свойства гриба рода *Trichophyton*, впервые разработан разбавитель-адъювант на основе бычьего рекомбинантного гамма-интерферона для вакцин против трихофитии и дано иммунологическое обоснование его совместного применения с вакцинами против трихофитии.

Детально охарактеризованы особенности изменения резистентности организма телят при введении предлагаемой вакцины, ресуспендированной разбавителем-адъювантом, и обосновано ее включение в комплекс лечебно-профилактических мероприятий при трихофитии.

**Рекомендации производству:** ТНПА на производство и применение вакцины сухой живой против трихофитии крупного рогатого скота «Трихофит Плюс» и разбавителя-адъюванта. Евразийский патент № 025263 «Разбавитель-адъювант для сухой живой вакцины против трихофитии крупного рогатого скота», патент № 14028 «Способ получения препарата для иммунокоррекции», патент № 13795 «Среда для сублимации грибов рода трихофитон и микроспорум и способ сублимации», патент № 11671 «Способ получения препарата для иммунокоррекции из сальмонеллезных бактерий», патент № 11353 «Способ выращивания гриба дерматофита». Технические условия и промышленные регламенты на производство субстанции гриба *Trichophyton* и субстанции среды защитной «Дер-Вак».

**Область применения:** материалы патентов, ТНПА, технических условий и промышленных регламентов используются в условиях ООО «НПЦ ПроБиоТех» при изготовлении биопрепаратов.

**SUMMARY****Zaitseva Viktoriya Vladimirovna****Stimulation of the biological activity of the genus *Trichophyton* fungus in the construction of a vaccine against bovine trichophytosis**

**Key words:** trichophyton, nutrient medium, cultivation, sublimation, reactivation, protective medium, diluent-adjuvant.

**Objective of investigation:** to develop ways to stimulate the biological activity of the genus *Trichophyton* fungus and post-vaccination immunity in the design and application of the domestic vaccine against bovine trichophytosis.

**Methods of research:** mycological, serological, immunological, biochemical and hematological.

**The obtained results and their novelty:** the biological properties of the genus *Trichophyton* fungus have been studied, the diluent-adjuvant for the trichophytosis vaccine has been developed for the first time based on the gamma-interferon bovine recombinant, an immunological ground for the joint use of the trichophytosis vaccine with a special diluent-adjuvant is given.

The characteristics of natural resistance of calves are described in detail when introducing the proposed vaccine, resuspended with diluent-adjuvant, and its introduction in the complex of therapeutic and preventive measures with trichophytosis is justified.

**Recommendations for production:** protocols for the production and use of dry live vaccine against trichophytosis of cattle «*Trichophytonum Plus*» and diluent-adjuvant. Eurasian patent № 025263 «Diluent-adjuvant for dry live vaccine against bovine trichophytosis», patent № 14028 «Method for preparation for immunocorrection», patent № 13795 «Medium for sublimation of the genus *Trichophyton* and microsporium fungi and a method of sublimation», patent № 11671 «Method of preparation for immunocorrection from salmonella bacteria», patent № 11353 «Method of cultivation of dermatophytosis fungus». Technical conditions and industrial regulations for production of *Trichophyton* fungus substances and «DerVac» protective medium substances.

**The field of application:** materials of patents, protocols, technical conditions and industrial regulations are used in «SPC ProBioTech» LLC company in the manufacture of biologics.

**Автореферат**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**ЗАЙЦЕВОЙ Виктории Владимировны**  
Подписано в печать 27.11.17.  
Формат 60×84<sup>1/16</sup>. Бумага офсетная.  
Гарнитура Times New Roman.  
Усл. печ. л. 1,63. Тираж 60 экз. Заказ № 161

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28  
Тел./факс (+375 17) 50 88 131,  
E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

---

Отпечатано на полиграфической базе  
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелесского»