

На правах рукописи

КИЛЫП АННА СЕРГЕЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ ПАТОГЕНЕЗА КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск - 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Сибирском федеральном научном центре агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ)

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Афонюшкин Василий Николаевич

Официальные оппоненты: **Карпенко Лариса Ивановна**,
доктор биологических наук, доцент, ведущий
научный сотрудник отдела биоинженерии;
ФБУН «Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»;

Мурашкина Татьяна Александровна,
кандидат биологических наук, научный
сотрудник лаборатории молекулярной
эпидемиологии и биоразнообразия вирусов
ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр фундаментальной и трансляционной
медицины».

Ведущая организация: **ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский
государственный университет ветеринарной
медицины»**

Защита состоится « 10 » июня 2026 г. в «14-00 » часов на заседании диссертационного совета 24.1.211.02, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН) по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, р.п. Краснообск, ул. Центральная, 7, СФНЦА РАН, а/я 463, тел/факс (383) 348-44-62, E-mail: ds.ievsidv@bk.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Сибирской научной сельскохозяйственной библиотеке и на сайте СФНЦА РАН: <https://sfscs.ru>; автореферат размещен на сайте ВАК: <https://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д-р биол. наук

Екатерина Владимировна
Нефедова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В настоящее время промышленное птицеводство является передовой отраслью в сельском хозяйстве. За 2024 год было произведено 7,1 млн тонн птицы, что как раз подтверждает масштабность развития данной отрасли (А.В. Буяров и др., 2020; А.В. Буяров и др., 2022; М.А. Болохов и др., 2023; М.М. Назар, 2024). При большом поголовье и высоких объемах производства мясной продукции отрасль сталкивается с рядом проблем. В птицеводстве большое внимание уделяется профилактике болезней, распространение которых в масштабах птицеводческих предприятий может привести к огромным экономическим потерям. К одним из самых распространенных патологий сельскохозяйственной птицы относят болезни дыхательной системы (В. Ходорович, 2019; И.А. Красочко и др., 2022; В.М. Усевич и др., 2022).

Инфекционный бронхит кур (ИБК, IBV) – заболевание вирусного характера, вызывается РНК-содержащим вирусом *Avian coronavirus*, относящимся к роду *Gammacoronavirus*, семейству *Coronaviridae*.

Причинами вспышек многих вирусных заболеваний на птицефабриках могут быть нарушения схем вакцинации, высокая вирулентность и давление вариантных штаммов вирусов, недостаточная концентрация поствакцинальных и материнских антител (Е.Т. McKinley et al., 2008, 2011). Эффективность иммунизации зависит напрямую от используемого вакцинного штамма, кратности и способа введения вакцины, а также от однородности иммунного ответа (О.В. Хотмирова, 2019; Н. Медуницын и др., 2022), интерференции или иммуносупрессии на фоне некоторых кишечных вирусных инфекций (В.Н. Афонюшкин, 2021).

На птицефабриках России возникают вспышки инфекционного бронхита, в том числе на привитом поголовье. Это свидетельствует о потребности подробного изучения патогенеза болезни и определения наиболее эффективных методов борьбы с ней.

Проблема борьбы с коронавирусными инфекциями актуальна во всем мире. Инфекционный бронхит кур приводит к экономическим потерям из-за ухудшения усвоения корма, снижения прироста живой массы у бройлеров и уменьшения производства и качества яиц у кур-несушек, повышенной частоты вторичных бактериальных инфекций. Возбудитель ИБК характеризуется высокой инфекционностью и имеет множество серотипов, что значительно затрудняет и снижает эффективность специфической профилактики болезни (А.В. Борисов и др., 2014; Н.Ю. Серова и др., 2016; S. Y. Lin et al., 2017).

Опыт длительного изучения инфекции, вызываемой *Avian coronavirus* у сельскохозяйственных птиц, может быть актуальным для формирования гипотез о механизмах патогенеза и закономерностях эпидемиологии COVID19.

Болезнь поражает не только верхние, но и нижние дыхательные пути (D. Cavanagh, 2007; P. Britton et al., 2008; Н.Ю. Серова, 2016; M. Legnardi et al., 2020; A. Samad, 2021), где происходит репликация вируса (K. Kotfis et al., 2020; В.П. Новикова и др., 2021; Т.Е. Таранушенко, 2021). Аналогичным образом воспринимается довольно схожая по патогенезу и особенностям проявления

коронавирусная инфекция человека и животных – COVID 19. Благодаря тому, что концепция оси кишечник-легкие относительно недавно была сформулирована учеными, накопление коронавирусов (как IBV, так и SARS-CoV-2) в респираторной системе, в т.ч. посредством гематогенного транспорта недостаточно изучено (В.П. Новикова, 2021).

Попытки применения препаратов с вирулицидным действием, а также вакцинопрофилактики без учета современного понимания патогенеза коронавирусных инфекций могут быть недостаточно эффективны. Снижение вирусной нагрузки вирулицидными веществами может иметь существенное практическое значение, но требует дальнейшей теоретической проработки вопроса и изучения патогенетических особенностей развития коронавирусной инфекции.

Степень разработанности темы. Заболевания вирусной этиологии составляют значительную часть в структуре заболеваемости у сельскохозяйственных птиц (Б.А. Павлинович, 2014). Наиболее частой причиной возникновения вспышек болезни являются срывы вакцинации, в том числе против инфекционного бронхита кур при сопутствующих проблемах с кишечником, что не дает ветеринарным специалистам никаких гарантий успешной вакцинации (Е.Т. McKinley et al., 2008, 2011; В.Н. Афонюшкин и др., 2021). Ввиду появления COVID 19, изучение коронавирусных инфекций является наиболее актуальным с 2020 года и по настоящее время.

Основная масса коронавирусов у птиц, телят, поросят, собак, кошек локализуется в кишечнике и вызывает кишечные расстройства, но при этом вирус ИБК, а именно часть пневмотропных штаммов данного вируса, на первый взгляд, является исключением (В.Н. Афонюшкин и др., 2020, 2022).

В связи с тем, что инфекционный бронхит кур (ИБК) и COVID 19 обладают рядом сходных элементов патогенеза, изучение именно этих инфекций в сравнительном ключе представляет интерес.

Цель и задачи исследования. Целью исследований являлось изучение особенностей патогенеза инфекционного бронхита кур, определение возможного сходства с патогенезом COVID 19 и разработка ИФА-диагностикума для выявления антител к N белку SARS-CoV-2 у сельскохозяйственной птицы.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Изучить значение репликации, гематогенного транспорта и распределения вируса ИБК в тимусе;
2. Изучить распределение антигенов вируса ИБК в организме при аэрозольном и пероральном введении и экспериментально обосновать использование вирулицидных препаратов при разных путях введения вируса;
3. Изучить иммунологические и воспалительные изменения состояния респираторной системы, тимуса и желудочно-кишечного тракта цыплят, как модельного объекта коронавирусных инфекций при инаktivации вирусных частиц в сопоставлении с теоретическими данными о патогенезе COVID 19;
4. Разработать ИФА-диагностикум и методологию индикации антител у кур *Gallus gallus* и индейки *Meleagris gallopavo* к N белку SARS-CoV-2.

Научная новизна работы. На основе анализа соотношения геномной и субгеномной РНК впервые показано накопление вируса инфекционного бронхита кур в легких преимущественно гематогенным путем.

Методом иммунофлуоресцентного анализа изучено распределение антигенов вируса ИБК в тимусе. Сопоставление изученных элементов патогенеза инфекционного бронхита кур позволило выявить сходство с COVID 19 в части патогенеза, что позволяет использовать птицу, инфицированную вирусом ИБК в качестве потенциальной модели SARS-CoV-2.

Разработан новый способ иммобилизации антигенов с использованием наночастиц серебра на полистироловых микропланшетах для создания ИФА тест-систем.

Научная новизна исследований подтверждена патентом на способ иммобилизации вирусных антигенов на примере N антигена SARS-CoV-2 у кур и индеек в сравнении с существующими методами, показана сходимость обнаружения антител к SARS-CoV-2 у сельскохозяйственной птицы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований представляют теоретическую и практическую ценность, так как дают возможность верификации патогномичных для ИБК повреждений тимуса. Показатель «воспаление мозговой зоны тимуса» необходимо использовать в качестве критерия патологоанатомического мониторинга инфекционного бронхита кур. Настоящее исследование обеспечивает теоретическую основу для разработки вакцин и схем вакцинопрофилактики инфекционного бронхита кур с учетом возможных иммуносупрессивных состояний.

Теоретическое обоснование аэрозольной вакцинации и вакцинации живыми вакцинами может быть пересмотрено ввиду особенностей формирования иммунного ответа в кишечнике и последствий возможных иммуносупрессивных эффектов при повреждении мозговой зоны тимуса, что будет способствовать улучшению благополучия по инфекционным болезням птиц и повышению экономической эффективности птицеводческой отрасли.

Впервые предложено использование вакцинных штаммов вируса ИБК для создания организменных динамических моделей, отражающих особенности перераспределения вирусных частиц в организме, в т.ч. при использовании различных функциональных ингибиторов.

Разработана оригинальная система праймеров и комплекс функциональных методов для изучения гематогенного транспорта и местной репликации вируса ИБК в легкие.

Разработаны методические рекомендации «Коронавирусные инфекции животных как потенциальная проблема зооантропонозов» и «Оценка эффективности лекарственных препаратов и схем лечения при коронавирусных инфекциях», предназначенные для использования в работе научно-исследовательских и практических учреждений биологического и ветеринарного профиля при диагностике и лечении коронавирусных инфекций.

Методология и методы исследования. Методологической основой исследования явилось изучение отечественных и зарубежных источников литературы для анализа существующих разработок, близких к теме настоящего

исследования. Методология диссертационной работы спланирована в соответствии с ее структурой и задачами исследования. Объектами научного исследования являлись цыплята-бройлеры возрастов от 14 до 56 дней (на трех птицефабриках бройлерного направления РФ), молодняк несушки кросса Shaver, индейки возрастов 37, 306 дней, утки в возрасте 28 дней. В работе использованы клинический, патологоанатомический, серологический, молекулярно-биологический и статистический методы анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Повреждение мозговой зоны тимуса после перорального введения 10-кратной дозы вируса ИБК штамма H120;
2. Распределение антигенов вируса ИБК и воспалительные изменения в респираторной системе, тимусе и желудочно-кишечном тракте модельных животных при инаktivации вирусных частиц у цыплят, инфицированных 10-кратной дозой вакцинного штамма H120 вируса ИБК;
3. Теоретическое и экспериментальное обоснование отсутствия эффективности санации респираторной системы в отношении вируса ИБК штамма 4/91 при аэрозольном введении синтетических рибонуклеаз с вирулицидной активностью;
4. Особенности иммунологических реакций у сельскохозяйственной птицы при введении 10-кратной дозы вируса ИБК Ma5 в условиях локальных и системных иммуномодулирующих воздействий;
5. Разработка ИФА-диагностикума и метода иммобилизации антигена N белка SARS-CoV-2 с последующим скринингом поголовья кур и индеек на наличие инфицирования SARS-CoV-2.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. Достоверность результатов, полученных в ходе выполнения диссертационной работы, подтверждена комплексным подходом, включающим использование сертифицированного оборудования с применением современных методов анализа и статистической обработкой данных.

Основные результаты исследований были доложены на: Ежегодной научно-практической студенческой конференции ФВМ НГАУ (Новосибирск, 2020), 58-ой Международной научной студенческой конференции «МНСК-2020» (Новосибирск, 2020), на XIV Всероссийской конференции обучающихся «Национальное достояние России» (Москва, 2021), IV Международной конференции «Наука будущего» и VI Всероссийском молодежном научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Москва, 2021), XI Международной научно-практической конференции «Ветеринария в агропромышленном комплексе» (Новосибирск, 2022), семинаре «Современные подходы к профилактике, лечению и диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственной птицы» (Горно-Алтайск, 2022), XII Международной научно-практической конференции «Ветеринария в агропромышленном комплексе» (Новосибирск, 2023), Международной научной конференции «Актуальные вопросы ветеринарной науки и практики» (Новосибирск, 2023), Международной научно-практической конференции «Ветеринарная медицина в обеспечении биологической безопасности животноводства Сибири» (Новосибирск, 2024), XIV Международной научно-практической конференции

«Ветеринария в агропромышленном комплексе» (Новосибирск, 2025), XXVIII Международном научно-практическом форуме «Аграрная наука – сельскохозяйственному производству СНГ и BRICS» (Новосибирск, 2026).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ («Ветеринария и кормление», «Сибирский вестник сельскохозяйственной науки»), 1 статья – в журнале, индексируемом в Scopus (Veterinary Sciences MDPI), получен 1 патент на изобретение РФ.

Соответствие содержания диссертации паспорту специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 4.2.3 Инфекционные болезни и иммунология животных по п.п. 6 и 7.

Личный вклад автора. Автором лично проведен анализ научной литературы, сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна и практическая значимость работы. Экспериментальные исследования, обработка и интерпретация полученных результатов, а также подготовка и оформление диссертации выполнены лично автором.

Структура и объем работы. Работа изложена на 122 страницах компьютерного текста и состоит из обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения полученных результатов, заключения, списка литературы, который включает в себя 172 источника, в том числе 111 работ зарубежных авторов и 7 интернет-источников. Диссертационная работа содержит 6 таблиц, 31 рисунок, 3 приложения.

Благодарности. Автор выражает благодарность за консультирование и научно-методическую помощь канд. биол. наук Сигаревой Н.А. (ФГБОУ ВО Новосибирского ГАУ), канд. хим. наук Макарову Д.А. (ГНЦ ИБХ РАН), д-ру биол. наук Филипенко М.Л. (ИХБФМ СО РАН). Отдельная благодарность научным сотрудникам сектора молекулярной биологии ИЭВСиДВ Мироновой Т.Е., Черепушкиной В.С., Хоменко Ю.С. за помощь в выполнении некоторых разделов диссертации.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Исследования проводили в период с 2020 по 2024 гг. на базе сектора молекулярной биологии Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока Сибирского Федерального научного центра агrobiотехнологий Российской академии наук (ИЭВСиДВ СФНЦА РАН) и на кафедре анатомии и физиологии Института ветеринарной медицины и биотехнологии Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Новосибирский государственный аграрный университет» (ИВМиБ ФГБОУ ВО Новосибирский ГАУ). Отдельные исследования проводились в лаборатории фармакогеномики института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Распределение антигенов вируса ИБК и воспалительные изменения в тимусе, респираторной системе и желудочно-кишечном тракте модельных животных, инфицированных 10-кратной дозой вакцинного штамма H120 вируса ИБК. Цыплята кросса Shaver в возрасте 14 суток были инфицированы вакцинным штаммом вируса ИБК H120 (яйценокский кросс, масса петушков 198-210 г, водопотребление 57 мл на голову, потребление корма 22 г на голову в день, возраст 14 суток). Для моделирования инфекционного процесса, в каждом независимом опыте птицы получали штамм вируса ИБК H120 живая сухая в повышенной дозе: 10 доз на голову (5 lg ЭИД₅₀ на голову). Вакцинный штамм вводили перорально, индивидуально. Были сформированы опытные группы по 10 голов и контрольная группа, которой вводили вакцинный штамм в количестве 10 доз на голову.

Для опытных групп использовали следующие вещества с вирулицидной активностью: противовирусный препарат с широким спектром вирулицидного действия в отношении РНК вирусов на основе синтетических рибонуклеаз (в составе препарата Тривирон, ООО «Трионис Вет»). Препараты применялись в соответствии с инструкциями.

Курс выпаивания препаратов составил 5 суток. Птицу выводили из эксперимента на 6-ые сутки. Проводили патологоанатомическое вскрытие трупов. Материалом для лабораторных исследований служили образцы тимуса, легких и кишечника. Фрагменты органов отбирали в стерильные пробирки на 1,5 мл, а также отдельно отбирали в планшеты и фиксировали в забуференном 10%-ном формалине.

Изучение влияния инактивирующих веществ в верхних дыхательных путях на распределение антигенов вируса ИБК проводили у цыплят в возрасте 14-ти дней. Цыплят инфицировали вакцинным штаммом вируса ИБК IB 4-91 (в составе живой аттенуированной вакцины Nobilis IB4-91, производства Intervet). Вакцину вводили аэрозольно в расчете на 1 голову 10 доз, при этом экспозиция составила 30 мин. После инфицирования всех особей были сформированы одна контрольная (n=7) и 4 опытные группы (n=6). Через 3 часа после инокуляции вирусного штамма особи всех четырех опытных групп были подвергнуты аэрозольной обработке противовирусным препаратом с вирулицидным механизмом действия в отношении РНК вирусов «Тривирон», но с различной экспозицией - 10, 20, 40 и 60 мин. На протяжении курса лечения производили 3 обработки (3 суток подряд, 1 раз в сутки). Расход препарата составил 3 мл/м³.

Особенности иммунологических реакций, участвующих в воспалительном ответе при ИБК изучали молекулярно-биологическими методами (ОТ-ПЦР). Цыплята кросса Шейвер в возрасте 14 суток, были инокулированы вакцинным штаммом, входящим в состав живой вакцины сухой Ма5. Для моделирования коронавирусной пневмонии вакцину вводили перорально, индивидуально в дозе 10 доз на голову. Цыплятам опытной группы № 1 (n=10) в рацион вводили молочную кислоту и эфирные масла, как стимуляторы Т-reg клеток, обладающих резорбтивным действием в кишечнике (в составе препарата Люманце, ООО «Инновад»). Опытной группе № 2 (n=10) выпаивали никотинамид глицирризиновой кислоты, иммобилизованный на наночастицах хитозана, не обладаю-

щий резорбтивным действием в кишечнике (предоставлен НИИОХ им. Н.Н. Ворожцова), в расчете 200 мкг/0,3 мл на голову (разводили концентрат в 3 раза и выпаивали). Цыплята контрольной группы (n=11) не получали препараты. На 22-е сутки осуществляли убой птицы методом цервикально-церебральной дислокации. Эвтаназию выполняли с причинением минимальных физических и моральных страданий птице. Исследования проводили в виварии СФНЦА РАН, согласно всем рекомендациям по содержанию животных и птиц, касающихся темы исследования. Все эксперименты на птицах были организованы согласно руководству ARRIVE и выполнялись в соответствии с принципами, сформулированными в директиве Европейского сообщества 86/609 / ЕЕС (Страсбург, 1986).

Методология выявления антител к N белку SARS-CoV-2 у сельскохозяйственной птицы. Для повышения специфичности и аналитической чувствительности способа серологической диагностики использовали фрагмент гена белка N - аминокислотная последовательность mgsshhhhhssglvprgshmgkedllkfprgqgvintnsspddqigyrratrrirggdgkmdlsprwyfyylgtgpeaglp ygankdgiivvategalntpkdhigtrnpannaai vlqlpqgttlpkgfyaegsrggsqassrsrsrnssrnstpgssrgtsparmagng. Фрагмент гена белка N был предоставлен Институтом биоорганической химии РАН.

Для оценки степени заражения сельскохозяйственных птиц вирусом SARS-CoV-2 был проведен скрининг проб сыворотки крови кур (бройлеров в возрасте 35 дн, n=18; бройлеров родительского стада ремонтного направления в возрасте 56 дней, n=20), индеек (в возрасте 37 дней, n=23; в возрасте 306 дней, n=43) и уток (в возрасте 28 дней, n=23) на наличие антител к SARS-CoV-2. Сыворотки были предоставлены хозяйствами Сибирского федерального округа. Для выявления антител к вирусу SARS-CoV-2 подготавливали микропланшет по оригинальной методике. Для сравнения результатов использовали набор для выявления суммарных антител к SARS-CoV-2 у животных (АО “Вектор-бест”), реакции ставили в соответствии с инструкцией производителя.

Молекулярно-биологические исследования. РНК из проб патологического материала выделяли методом фенол-хлороформной экстракции.

Для проведения ПЦР в режиме реального времени методом обратной транскрипции одноцепочечная молекула РНК была переведена в комплементарную ДНК (кДНК). ОТ-ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем 67 мМ трис-НCl (pH 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров 5'-atgctcaacctgtgtccctagca-3', 5'tcaaaactgcggatcatcacgt-3', и зонда FAM-tggaagtagagtgcgcsaaac-BHQ, 1-2 ед. HotStart Taq-ДНК полимеразы.

ПЦР проводили на амплификаторе CFX (BioRad) по следующей программе: начальная денатурация – 95°C 10 мин., далее 40 циклов: денатурация – 95°C 12 сек., отжиг – 60°C 35 сек., элонгация – 72°C 0,05 сек.

Контроль выделяемости РНК из образцов проводили с использованием ПЦР в режиме real-time путём оценки экспрессии гена GAPDH (*Gallus gallus*) по протоколу с использованием следующих праймеров и зондов: 5'-

acttaccgccagccttctccat-3'; 5'-cgtgaccccgcaacatcaa-3'; FAM-5'-
tggagtcactggtgtcttcacc-3' ВНQ2.

Для определения субгеномной РНК вируса ИБК использовали растворы олигонуклеотидных праймеров 5'-ctattacactagccttgccgc-3' и 5'-ctttgaacagtcagttgagcttt-3' по программе - начальная денатурация – 95°C 15 мин., далее 4 цикла: денатурация – 95°C 15 сек., отжиг – 48°C 10 сек. и после 40 циклов: денатурация – 96°C 15 сек., отжиг – 55,9°C 30 сек.

Оценку уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов интерлейкина 6 (5'-aatccctcctcgccaatct-3', 5'-ccctcacggtcttctccataaa-3'), Caspasa – 3 (5'-ccaccgagataccggactgt-3', 5'-aactgcttcgcttgctgtga-3'), INF- γ (5'-sactgacaagtcaaagccgc-3', 5'-accttcttcacgccatcagg-3'), Fc-фрагмента (5'-sactgacaagtcaaagccgc-3', 5'-accttcttcacgccatcagg-3'), NFkB (5'-tcaacgcaggacctaaagacat-3', 5'-gcagatagccaagttcaggatg-3') проводили методом количественной ПЦР с использованием праймеров по программе начальная денатурация – 95°C 7 мин., далее 39 циклов: денатурация – 95°C 15 сек., отжиг – 64,5°C 30 сек., элонгация – 72°C 0,05 сек.

Для расчета относительной кратности экспрессии генов в образцах органов птиц, при выполнении полимеразной цепной реакции в реальном времени, использовали метод дельта-дельта Ct ($2^{\Delta\Delta Ct}$), количественную оценку экспрессии проводили относительно уровня экспрессии генов GAPDH (*Gallus gallus*).

Анализ воспалительных изменений в легких, кишечнике и тимусе. Фрагменты органов фиксировали в 10% забуференном формалине. Фиксированный материал разрезали бритвенным лезвием на тонкие пластинки толщиной 1-2 мм. Поверхность легкого рассекали бритвенным лезвием и в течение 10-20 мин. окрашивали красителями Hoechst 33258 и SYPRORuby (длительность окраски SYBR Green I составляла не более 20 мин.).

Выявление антигенов вируса ИБК методом иммунофлуоресцентного анализа. Антигены вируса инфекционного бронхита кур выявляли с использованием поликлональных мышинных антител против ИБК (СФНЦА РАН) флуоресцентно меченных сукцинимидным производным родамина (Lumiprobe). Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258. Реакции выполняли на гистопрепаратах после демаскировки антигенов на нативных кусочках органов.

Люминесцентную микроскопию органов и тканей проводили с использованием систем светофильтров FS 49, FS 10, FS 20, люминесцентного микроскопа Imager D1 (Zeiss, Германия) и программного обеспечения AxioVision.

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами вариационной и непараметрической статистики. Для соответствующих вычислений применяли компьютерную программу Microsoft Excel. Коэффициенты корреляции рассчитывали по Спирмену, уровень статистической значимости различий оценивали по методу Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

2.2 Результаты исследований

2.2.1 Сравнительный анализ накопления вируса ИБК в тимусе, легких и кишечнике, с участием гематогенного транспорта вирусных частиц, на модели коронавирусной инфекции кур

Цыплята кросса Shaver в возрасте 14 суток ($n=10$) были инокулированы вакцинным штаммом ИБК Ma5, серотип Массачусетс. Для моделирования коронавирусной пневмонии цыплятам вводили вакцину перорально, индивидуально в дозе 10 доз на голову. На 6 сутки птица выводилась из эксперимента.

Репликация вируса инфекционного бронхита кур в органах сельскохозяйственной птицы может быть охарактеризована скринингом геномной и субгеномной РНК. В сравнительном аспекте накопления субгеномной РНК в легких (1,02 Ct G/SG) и кишечнике (1,09 Ct G/SG) статистически значимое преобладание субгеномной РНК в кишечнике ($p \leq 0,05$) свидетельствовало об активной репликации коронавируса в кишечнике и преимущественном формировании пула вирусных частиц в легких гематогенным и лимфогенным путем. Наибольшая удельная доля субгеномной РНК наблюдалась в тимусе, что также свидетельствует о репликации вируса в данном органе (рисунок 1).

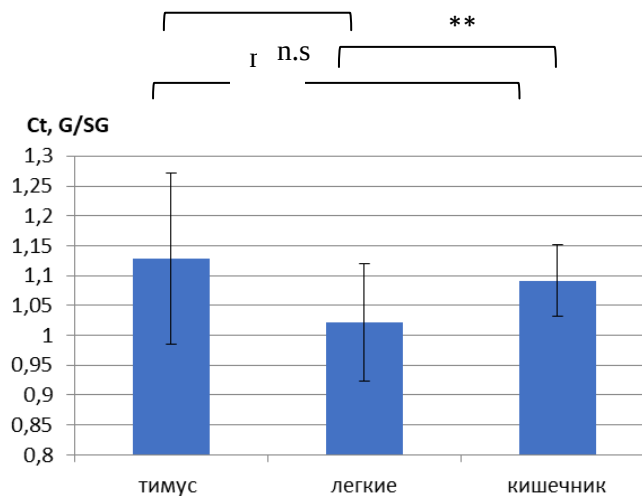


Рисунок 1 – Количественное отношение геномной РНК к субгеномной РНК ИБК у цыплят кросса Shaver (Ct, G/SG, M±SD)

Примечание: Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни (* $p < 0,01$, ** $p < 0,05$, n.s. — статистическая значимость отсутствует)

Геномная РНК вируса ИБК представляет собой упакованные вирусные частицы, которые гематогенным путем попадают в органы. Субгеномная РНК образуется там, где вирус активно реплицируется. Превышение субгеномной РНК над геномной свидетельствует об активном размножении вируса в исследуемом органе.

2.2.2 Изучение повреждения тимуса, как основного патогномоничного признака развития иммуносупрессии, при заражении инфекционным бронхитом у цыплят-бройлеров в условиях промышленных птицефабрик

Исследованы пробы, полученные с птицефабрики Сибирского федерального округа от цыплят-бройлеров кросса Росс 308 (возраст 22 суток) через 12 дней

после вакцинации против ИБК в суточном возрасте (комбинированно штаммы Ма5 и 4/91) методом спрей-вакцинации и ревакцинации в возрасте 10 суток (методом выпойки штамма Ма5 в 1 дозе). Пробы были отобраны от 20-ти цыплят с клиническими признаками инфекционного бронхита кур (после диагностического убоя).

Согласно результатам ПЦР-исследования, проведенного на образцах тимусов, селезенки и кишечника, наибольшее количество вирусных частиц ИБК было обнаружено в кишечнике (рисунок 2). Это подтверждает нашу гипотезу о том, что кишечник является основным местом репликации вируса на ранних стадиях инфекции.

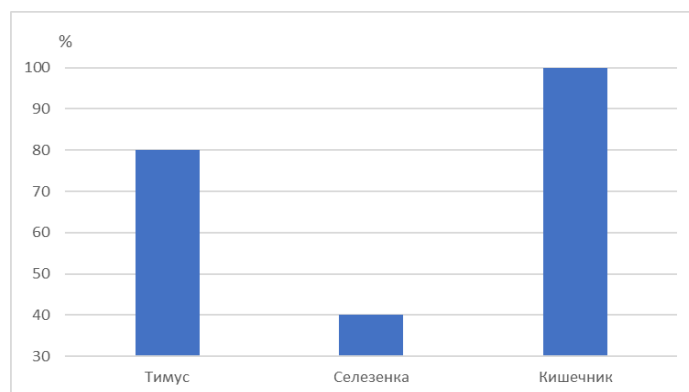


Рисунок 2 – Процент превалентности вируса ИБК в тимусе, селезенке и кишечнике цыплят-бройлеров кросса Росс 308, %

У особей вирус также был выявлен в тимусе, причем на более низких пороговых циклах, что указывает на его активное присутствие в этом органе. Важно отметить, что вирус детектируется как в кишечнике, так и в селезенке, что может свидетельствовать о его распространении по всему организму.

При гистологическом исследовании наблюдали разрушение мозгового слоя тимуса, что приводило к значительному уменьшению ее объема. В данной зоне наблюдалось разрушение клеток, что указывает на тяжелые дистрофические изменения. В результате этого процесса мозговая зона была замещена рубцовой тканью, что свидетельствует о восстановительных механизмах организма, однако они не способны восстановить утраченные функции. Наблюдались тимусы без дегенерации мозговой зоны.

При введении вакцинного штамма вируса ИБК вирус выявляли в тимусе в большем количестве, чем в селезенке (см. рисунок 2). По данным иммунофлуоресценции вирус перераспределяется именно в мозговой зоне тимуса (рисунок 3). Вакцинные штаммы ведут себя одинаково как в условиях птицефабрики, так и при моделировании инфекционного процесса в условиях лаборатории путем введения вируса ИБК в 10-кратной дозе.

Поражение тимуса является патогномоничным фактором, позволяющим оценивать распространенность ИБК в стадах на птицефабриках, а также оценивать риски повреждения иммунитета для птиц.

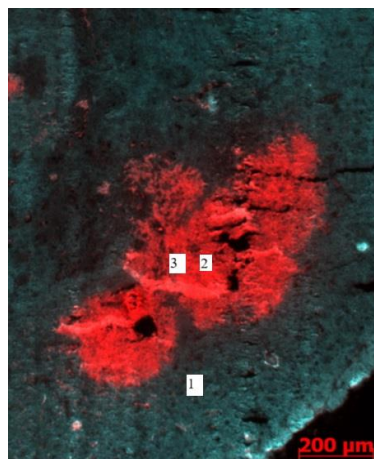


Рисунок 3 – Распределение антигенов вируса ИБК в тимусе здоровых цыплят, вакцинированных 10-кратной дозой вакцинного штамма Ма5, через 5 суток после вакцинации

Примечание: Реакция иммунофлуоресценции. Антитела к вирусу ИБК помечены родамином (красная флуоресценция), ядра клеток окрашены Hoechst 33258 (светло-синее свечение). 1 – корковая зона тимуса, 2 – мозговая зона тимуса, 3 – флуоресцентный сигнал локализации коронавируса.

2.2.3 Распределение антигенов вируса ИБК при естественном заражении и искусственном аэрозольном инфицировании вирусом ИБК штаммом 4/91 и влияние вирулицидных препаратов на патологический процесс

Цыплят инфицировали вакцинным штаммом вируса ИБК IB 4-91. Вакцину вводили аэрозольно в расчете 10 доз на голову с экспозицией 30 мин. После инфицирования всех особей были сформированы одна контрольная ($n=7$) и 4 опытные группы ($n=6$). Через 3 часа после инокуляции вирусного штамма особи всех четырех опытных групп были подвергнуты аэрозольной обработке противовирусным препаратом с вирулицидным механизмом действия в отношении РНК вирусов Тривирон, но с различной экспозицией – 10, 20, 40 и 60 мин. На протяжении курса лечения производили 3 обработки (3 суток подряд, 1 раз в сутки). Расход препарата составил 3 мл/м³.

При эпифлуоресцентной микроскопии поверхности слизистой крупных бронхов и трахеи (материал получен на птицефабрике, неблагополучной по ИБК, ИЛТ и МПВИ с целью дифференциальной диагностики и выявления первичной инфекции, вызвавшей повышение восприимчивости к остальным инфекциям) наблюдали дегенеративные изменения в клетках слизистых желез. Выявление локализации антигенов вируса ИБК в очагах поражения исключает другие вирусные агенты и позволяет объяснить причину последующего накопления других респираторных вирусов – разрушение слизистых желез вирусом ИБК у цыплят в возрасте 20 дней повысило восприимчивость к заражению вирусами МПВИ и ИЛТ на более позднем периоде выращивания (на одной из бройлерных птицефабрик неблагополучных по ИБК, ИЛТ и МПВИ одновременно).

У цыплят, инфицированных аэрогенно вирусом ИБК и подвергнутых лечению аэрозолями синтетической рибонуклеазы, результаты иммунофлуоресцент-

ного анализа демонстрируют локальный характер противовирусной активности синтетической рибонуклеазы в тканях легкого (рисунок 4), которая убывает по мере удаления от бронха.

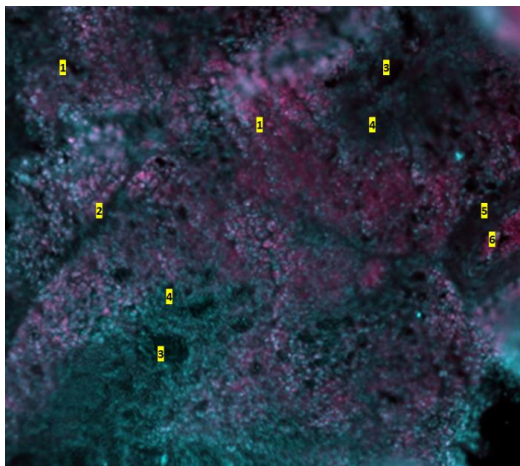


Рисунок 4 – Иммунофлуоресцентное окрашивание гистологического среза легких цыпленка, инокулированного вирусом ИБК после 40 минут аэрозолетерапии вирулицидным препаратом с рибонуклеазной активностью

Примечание: Красная флуоресценция (антитела к вирусу ИБК, меченные родамином), бирюзовая флуоресценция ядер клеток (окраска Hoechst 33258). Увеличение x50.

1 - паренхима легких содержащая антиген вируса, 2 - граница долики, 3 - парабронх, 4 - зона вокруг парабронха, свободная от вируса, 5- стенка кровеносного сосуда, 6- эритроциты в просвете кровеносного сосуда содержащие антиген вируса ИБК.

Полученные данные позволяют теоретически обосновать недостаточную эффективность аэрозолетерапии вирулицидными препаратами ИБК, т.к. вирус вызывает интерстициальную пневмонию, т.е. поражает те участки легких, куда аэрозоль проникает с уменьшенной эффективностью.

2.2.4 Распределение антигенов вируса ИБК и воспалительные изменения в респираторной системе, тимусе и желудочно-кишечном тракте у цыплят, инфицированных 10-кратной дозой вакцинного штамма Н120 вируса ИБК

Цыплята кросса Shaver в возрасте 14 суток (n=14) были инфицированы вакцинным штаммом вируса ИБК Н120. Для моделирования инфекционного процесса, в каждом независимом опыте птицы получали штамм вируса ИБК Н120, входящий в состав живой сухой вакцины в десятикратной дозе, равной 5 lg ЭИД₅₀ на голову. Инокуляцию вакцинным штаммом осуществляли перорально, индивидуально.

По результатам вскрытия цыплят, инокулированных вирусом инфекционного бронхита (без последующей фармакологической коррекции), наблюдали воспалительные реакции во внутренних органах, которые носили повсеместный характер. При вскрытии обращали особое внимание на изменения в тимусе, легких, сердце, кишечнике, печени и почках.

При инокуляции 10-кратной дозой вакцинного штамма Н120 вируса ИБК развивались выраженные патогномоничные морфологические изменения в моз-

говой зоне тимуса по сравнению с инфицированием одной дозой на голову. Обнаруженные изменения позволяли проследить успешное моделирование инфицирования вирусом ИБК птиц.

В случае не аэрогенного пути заражения вирус попадает из большого круга кровообращения в правое предсердие. В сердце наблюдался миокардит, сопровождающийся миогенной дилатацией правого предсердия. Наличие вируса ИБК в кишечнике проявляется расширением артериол и капилляров.

Признаки ИБК характеризуются наличием зон периваскулярного пропитывания гемоглобином и по периферии крупных кровеносных сосудов. Наблюдается пониженная фоновая флуоресценция, слизистые фибриновые и гнойно-фибриновые пробки в просвете бронхов, очаговая гиперемия паренхимы легких, наличие воспалительных инфильтратов, отек интерстиция и сужение просветов воздухоносных капилляров.

В легких антиген вируса ИБК диффузно распределялся по всей легочной ткани, включая воздухоносные капилляры и выстилку парабронхов. У птицы контрольной группы распределение вирусных антигенов в ткани характеризовалось менее выраженным поражением выстилки парабронхов, отмечали очаговые скопления в воздухоносных капиллярах и просвете кровеносных сосудов.

Иммунофлуоресцентной микроскопией кишечника (тощей кишки) продемонстрировано наличие антигена вируса ИБК преимущественно в основании кишечных ворсин (в цитоплазме энтероцитов) и в кровеносных сосудах. У цыплят контрольной группы интенсивность флуоресценции энтероцитов более выражена в сравнении с цыплятами опытной группы, у которых флуоресценция антигенов вируса в большей степени связана с кровеносными сосудами и единичными островками энтероцитов на поверхности слизистой.

2.2.5 Особенности иммунологических реакций у кур при моделировании отдельных элементов патогенеза коронавирусной инфекции

Цыплята кросса Шейвер в возрасте 14 суток были инокулированы вакцинным штаммом Ма5 против ИБК. Для моделирования коронавирусной пневмонии вакцину вводили перорально, индивидуально в количестве 10 доз на голову. Цыплятам опытной группы № 1 (n=10) в рацион вводили молочную кислоту и эфирные масла, как стимуляторы Т-reg клеток, обладающие резорбтивным действием в кишечнике (в составе препарата Люманце, ООО «Инновад»). Опытной группе № 2 (n=10) выпаивали никотинамид глицирризиновой кислоты иммобилизованный на наночастицах хитозана, не обладающий резорбтивным действием в кишечнике (предоставлен НИИОХ им. Н. Н. Ворожцова), в расчете 200 мкг/0,3 мл на голову (концентрат разводили в 3 раза и выпаивали). Цыплята контрольной группы (n=11) не получали препараты. На 22-е сутки осуществляли убой птицы методом цервикально-церебральной дислокации.

Снижение уровня экспрессии каспазы-3 при воздействии препаратов с комплексным иммуномодулирующим и вирулицидным действием опытных групп (Люманце и Глицевир) свидетельствует о снижении интенсивности апоптоза клеток в кишечнике. Снижение уровня экспрессии FcR (маркера мак-

рофагов) в обеих опытных группах, относительно контрольной группы коррелирует с подавлением каспазной активности, говорит об активности вышеперечисленных препаратов в части локального подавления инфекционного процесса. Активность экспрессии гена интерферона гамма (IFN- γ) свидетельствует о снижении представленности и /или функциональной активности Т хелперов и не противоречит наблюдаемому снижению активности антиген-презентирующих клеток (рисунок 5).

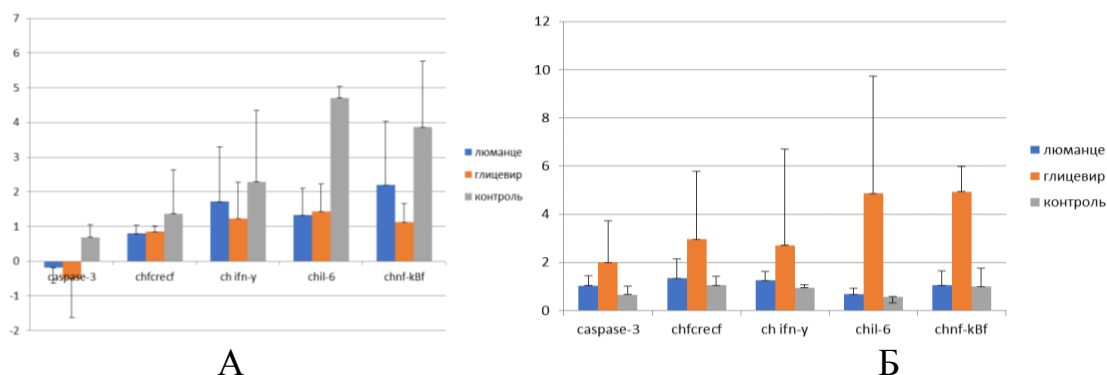


Рисунок 5 – Экспрессия генов Caspasa-3, FcR, INF- γ , IL-6, NFkB у птиц опытных и контрольной группы, $\Delta\Delta$ Ct (относительно GAPDH) (А – в кишечнике, Б – в легких)

Интерлейкин-6 является важным цитокином, влияющим на развитие цитокинового шторма, данный показатель снижен в опытных группах. Активация NFkB при встрече с вирусными антигенами вызывает воспалительные реакции и активирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет. Эта реакция может привести к нейтрофильному и лейкотриеновому шторму, что усугубляет воспаление при коронавирусных инфекциях.

Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни, на модели коронавирусной инфекции было обнаружено статистически значимое подавление экспрессии провоспалительного цитокина IL 6 в 3,5 раза ($p \leq 0,05$) в кишечнике опытной группы цыплят, получавших препарат Люманце, по отношению к контрольной группе, что подтверждает воспроизведение иммуномодулирующих эффектов масляной кислоты на нашей модели (рисунок 5А).

Препарат никотинамида глицирризиновой кислоты (Глицевир) в иммобилизированной на наночастицах форме (для предотвращения всасывания из кишечника и ограничения противовирусной активности за счет локального действия в кишечнике) закономерно вызвал более интенсивную экспрессию генов, участвующих в иммунном ответе и воспалении в легких, что характеризуется повышенным уровнем NFkB, IL-6, IFN- γ (в 4,95 раз, в 8,47 раз и в 2,84 раза соответственно) (большее количество Т-хелперов встречаются с вирусными частицами), в 2,8 раз Fc (большее количество макрофагов) и в 3,07 раз caspasa-3 (клетки в легких разрушаются интенсивнее) по сравнению с цыплятами контрольной группы (рисунок 5Б). Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни,

статистическая значимость отсутствует. Различия иммунологических реакций в легких между препаратами масляной и глицерризиновой кислот соответствуют их иммунологическим эффектам, описанным в научной литературе.

Полученные данные о экспрессии генов иммунной системы дают непротиворечивую картину подавления вирусного агента препаратами с вирулицидным действием и, соответственно, снижения интенсивности реакций врожденного (NFkB) и приобретенного иммунитета.

В качестве основной версии рассматривается модулирование активности иммунокомпетентных клеток в составе желудочно-кишечного тракта, в первую очередь – Treg лимфоцитов (активных продуцентов противовоспалительного цитокина IL10) (стимуляция масляной кислотой в составе «Люманце») и смещение соотношения про- и противовоспалительных цитокинов в связи с подавлением инфекционного процесса локально (т.е. в кишечнике), и более выраженной активацией иммунной системы легких, без вовлечения активности иммунной системы кишечника по типу пищевой иммунотолерантности.

2.2.6 Разработка ИФА-диагностикума и метода иммобилизации антигена N белка SARS-CoV-2 с последующим скринингом поголовья сельскохозяйственной птицы на наличие инфицирования SARS-CoV-2

Способ предназначен для разработки ИФА системы, позволяющей выявлять антитела к некоторым антигенам SARS-CoV-2 с целью мониторинга эффективности получения антител при гипериммунизации, а также мониторинговых и ассоциативных исследований на птицефабриках. Иммобилизацию рекомбинантного антигена N белка SARS-CoV-2 осуществляли следующим образом: в 96-луночный полистироловый микропланшет вносили 0,6%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина в карбонат-бикарбонатном буфере, инкубировали 12 часов при +5°C. Удаляли раствор, высушивали микропланшеты при +21°C. Вносили в каждую лунку 6 ng наночастиц серебра в объеме 60 мкл и инкубировали 30 мин. Дважды промывали деионизированной водой лунки микропланшета. Вносили 1-3 мкг антигена в объеме 70 мкл и инкубировали 30 мин. при +21°C. Вносили 140 мкл 3% раствора бычьего сывороточного альбумина и инкубировали 3 часа. Тщательно удаляли содержимое из лунок. Дважды промывали деионизированной водой и высушивали при +21°C.

Также для проверки качества иммобилизации антигенов подготавливали планшет по аналогичной методике, но вместо наночастиц серебра вносили 0,01%-ный раствор эпоксидной смолы в изопропанол, в объеме 60 мкл и высушивали. Наносили антиген в объеме 60 мкл и инкубировали 30 мин. Добавляли 120 мкл 3%-ного бычьего сывороточного альбумина и инкубировали 3 часа. Промывали дважды деионизированной водой и высушивали.

Использование наночастиц серебра позволяет добиться большей чувствительности реакции ИФА в сравнении с иммобилизацией антигенов на эпоксидные группы. Предварительные сравнительные испытания методов

иммобилизации показали эффективность использования наночастиц серебра в составе комплекса с альбумином в части иммобилизации антигенов и последующего выявления антител к ним в реакциях иммуноферментного анализа.

Для анализа специфичности разработанного способа и набора для выявления заражения животных SARS-CoV-2 взяли заведомо положительные и заведомо отрицательные сыворотки (к вирусам ИБК, ИББ, НБ, Реовирусу, вирусу ИЛТ, ВГП Н5, ВГП Н9) и сравнили специфичность разработанного способа и традиционного способа иммобилизации антигенов в карбонат-бикарбонатном буфере – оба способа обеспечивали 100% специфичность с исследуемыми препаратами антител. Соотношение сигнал/фон при использовании разработанного метода иммобилизации антигенов превышало в 2,68 раз вариант с иммобилизацией антигенов формальдегидом на альбуминовой подложке, в 1,49 раз связывание метод перийодатным окислением и в 2,8 раз с чистыми частицами наносеребра – без альбуминового спейсера. Благодаря достигнутым характеристикам ИФА метода отмечали более широкий динамический диапазон реакции (сохранение линейности до 4-х порядков). Неоднородность значений заведомо положительных и отрицательных образцов сыворотки к исследуемому антигену отмечалась в пределах 5% при иммобилизации антигена с использованием наночастиц серебра на альбуминовых спейсерах (рисунок 6).

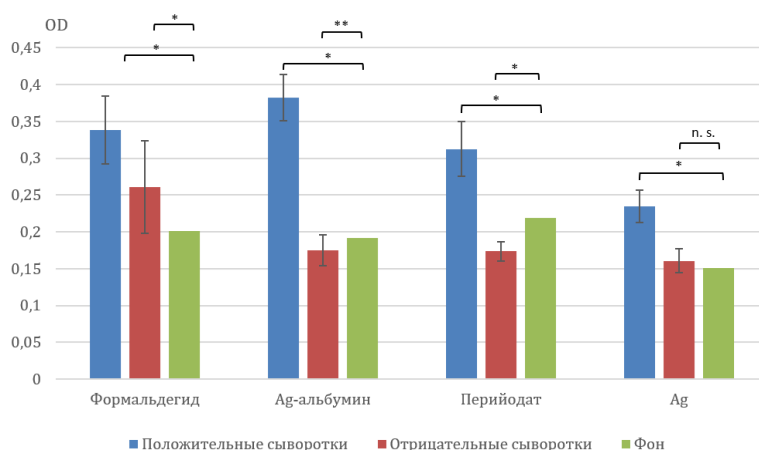


Рисунок 6 – Сопоставление эффективности связывания IgY сыворотки кур, содержащей антитела к SARS-CoV-2, с К- сывороткой и фоновыми значениями (без добавления сыворотки) в ИФА для выявления антител к фрагменту N белка при разных методах иммобилизации, OD 405 (M±SD)

Примечание: положительная сыворотка - сыворотка крови кур, иммунизированных вакциной для профилактики коронавирусной инфекции (COVID-19) у плотоядных животных, 1 доза на голову, двухкратно с интервалом 2 недели. Отрицательная сыворотка – сыворотка крови кур, полученная в доэпидемический период.

Значимость различий между группами рассчитывали с использованием непараметрического метода Манна–Уитни (* $p \leq 0,01$, ** $p \leq 0,05$, n.s. — статистическая значимость отсутствует).

В качестве антигена использовали специфичную для SARS-CoV-2 аминокислотную последовательность белка N. Метод сорбции антигена на поверхность полистиролового микропланшета заключается в связывании

антигена с наночастицами серебра, иммобилизованными на полистироловом микропланшете. Критерием выявления антител является факт прироста антител в динамике у с.-х. птицы, иммунизированной инактивированной вакциной, или в стадах птицы с положительной ПЦР превалентностью.

Проведен скрининг проб сывороток крови кур, индеек и уток на наличие антител к SARS-CoV-2 с помощью микропланшета, изготовленного по оригинальной методике, описанной выше.

В 60% случаев на обследованных птицефабриках бройлерного направления (5 птицефабрик, по 20 проб сыворотки) антител к SARS-CoV-2 обнаружено не было. Для комплексной оценки были отобраны 2 бройлерные птицефабрики с положительными результатами, а также исследованы птицеводческие предприятия по выращиванию индейки (2 фабрики) и уток (1 фабрика). На некоторых птицефабриках встречались как единичные пробы с наличием антител к SARS-CoV-2, так и до 27% серопревалентности (таблица 1).

Таблица 1 – Оценка серопревалентности относительно N белка SARS-CoV-2 у разных видов сельскохозяйственной птицы, %

Вид птицы, возраст	n	Серопревалентность, %	Наличие в стаде птицы, ПЦР положительной в отношении вируса SARS-CoV-2
Индейка, 306 дн	43	23,25	да
Индейка, 37 дн	23	8,69	да
Бройлеры, рем.молодняк, 56 дн	20	20	да
Утки, 28 дн	23	0	нет
Бройлеры, 35 дн.	18	27	да

Наличие до 60% IgM в приведенном примере свидетельствует о высоком уровне инфицированности цыплят-бройлеров, не успевших выработать антитела класса Y до момента отбора проб крови (таблица 2).

Таблица 2 – Наличие антител класса Y и M к N белку SARS-CoV-2 у ремонтного молодняка (родительского стада бройлерного направления, 20 проб), S/P

Показатель	IgY	IgM
S/P	0,889	1,148
Ошибка средней арифметической	0,202	0,16
Коэффициент корреляции	0,797	
Серопревалентность, %	20	60

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили изучить особенности патогенеза коронавирусной инфекции у сельскохозяйственной птицы и теоретически обосновать новые подходы к лечению.

Патогномоничные для инфекционного бронхита кур повреждения тимуса имеют общность в механизмах патогенеза с COVID 19 у человека и животных. Данную особенность патогенеза следует рассматривать в качестве одного из основных факторов, способных влиять на адаптивный противовирусный иммунитет.

В исследовании были доказаны механизмы распределения коронавирусов и их передача из кишечника, в котором происходит наибольшая репликация вируса, в легкие, где происходит накопление вирусных частиц, попавших гематогенным путем, в меньшем объеме относительно других органов-мишеней.

На основании проведенных исследований сделаны следующие **выводы:**

1. Выявление геномной и субгеномной РНК вируса ИБК в тимусе (1,13 Ct G/SG) обусловлено его преимущественной локализацией и репликацией в мозговой зоне тимуса, что создает риски вовлечения антигенов коронавируса в процесс негативной селекции Т-лимфоцитов.

2. Нарушение гистологических структур мозговой зоны тимуса является важным патогномоничным признаком при патологоанатомической диагностике и ключевым элементом патогенеза инфекции.

3. Активность репликации РНК вируса ИБК в легких (1,02 Ct G/SG) ниже, чем в кишечнике (1,09 Ct G/SG) ($p \leq 0,05$) и тимусе (1,13 Ct G/SG), что подтверждается анализом соотношения геномной и субгеномной РНК вируса и свидетельствует о большей роли гематогенного транспорта вируса при накоплении в легких, в сравнении с тканями кишечника и тимуса.

4. Наличие антигенов вируса инфекционного бронхита кур в энтероцитах кишечных ворсин в базальной их части, а также в кровеносных сосудах слизистой тощей кишки указывает на активный транспорт вируса ИБК в малый круг кровообращения из кишечника.

5. Установлено, что масляная кислота (в составе препарата Люманце) в 3,5 раза подавляет экспрессию IL-6 ($p \leq 0,05$) в кишечнике по отношению к контрольной группе при моделировании коронавирусной инфекции и снижает каспазную активность в легких и кишечнике, что подтверждает её иммуномодулирующий эффект.

6. Локальное снижение интенсивности воспалительных реакций в кишечнике на фоне использования невсасывающегося деривата глицирризиновой кислоты сопровождалось активацией маркеров апоптотического разрушения клеток легких и иммуно-опосредованного воспаления IL-6, NF-kB, INF- γ , каспазы-3, FcR (уровень экспрессии был превышен в 8,47 раз, в 4,95 раз, в 2,84 раза, в 3,07 раз, в 2,8 раз соответственно по сравнению с цыплятами контрольной группы).

7. Иммобилизация фрагмента N белка SARS-CoV-2 в полистироловых микропланшетах с использованием наночастиц серебра на альбуминовых спейсерах позволяет обеспечить оптимальное соотношение сигнал/фон при выявлении антител к данному антигену у сельскохозяйственных птиц в сравнении с

методами иммобилизации с применением карбонат-бикарбонатного буферного раствора и эпокси-группами (отношение сигнал/фон наночастиц серебра на альбуминовых спейсерах превышало в 2,68 раз вариант с иммобилизацией антигенов формальдегидом на альбуминовой подложке, в 1,49 раз метод с перийодатным окислением и в 2,8 раз с чистыми частицами наносеребра – без альбуминового спейсера).

Практические предложения

Разработаны методические рекомендации «Оценка эффективности лекарственных препаратов и схем лечения при коронавирусных инфекциях» (утвержденные ученым советом СФНЦА РАН протокол №3 от 22.02.2022) и «Коронавирусные инфекции животных как потенциальная проблема зооантропонозов» (утвержденные на кафедре ВСЭ и паразитологии ФВМ НГАУ протокол №7 от 15.12.2022), предназначенные для использования в работе научно-исследовательских и практических учреждений биологического и ветеринарного профиля при диагностике и лечении коронавирусных инфекций. Разработанный ИФА-диагностикум (патент «Способ выявления заражения людей и животных SARS-CoV-2 и диагностический набор для осуществления способа») рекомендуется использовать для мониторинговых и ассоциативных исследований циркуляции вируса SARS-CoV-2 на птицефабриках Российской Федерации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Миронова, Т.Е. Изучение защитных эффектов виروцидных препаратов на модели коронавирусной пневмонии / Т.Е. Миронова, В.Н. Афонюшкин, Ю.Н. Козлова, **А.С. Бобикова**, В.Ю. Коптев, В.С. Черепушкина, Н.А. Сигарева, Ф.А. Колпаков // Ветеринария и кормление. – 2020. – № 7. – С. 35-38.

2. **Бобикова, А.С.** Противовоспалительная терапия вирусных пневмоний на модели инфекционного бронхита кур / А.С. Бобикова, Т.Е. Миронова, В.С. Черепушкина, В.Ю. Коптев, Е.В. Нефедова, В.Н. Афонюшкин, Н.А. Донченко // Ветеринария и кормление. – 2021. – № 6. – С. 16-19.

3. **Бобикова, А.С.** Изучение экспрессии функционально значимых генов при терапии коронавирусной инфекции у цыплят / А.С. Бобикова, Т.Е. Миронова, В.С. Черепушкина, В.Ю. Коптев, Е.В. Нефедова, В.Н. Афонюшкин, Н.А. Донченко, Ян Фуди, В.В. Фоменко // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2021. – Т. 51, № 5. – С. 68-76.

4. Афонюшкин, В.Н. Изучение противовоспалительной эффективности препарата доксицилина гиклата (Доксатиб) компании Krka, d.d. в отношении инфекционного бронхита кур / В.Н. Афонюшкин, **А.С. Бобикова**, В.С. Черепушкина, В.Н. Штепа // Ветеринария и кормление. – 2022. – № 2. – С. 11-16.

5. **Кильп, А.С.** Распределение субгеномной РНК вируса инфекционного бронхита кур в организме цыплят / А.С. Кильп, В.Н. Афонюшкин, Н.А. Сигарева // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2025. – Т. 55, № 1 (314). – С. 84-89.

Публикации в изданиях, входящих в базу цитирования Scopus

6. Nefedova, E. The infectious bronchitis coronavirus pneumonia model presenting a novel insight for the SARS-CoV-2 dissemination route / E. Nefedova, V. Koptev, **A. S. Bobikova**, V. Cherepushkina, T. Mironova, V. Afonyushkin, N. Shkil, N. Donchenko, Y. Kozlova, N. Sigareva, N. Davidova, N. Bogdanchikova, A. Pestryakov, Y. Toledano-Magaña // *Veterinary Sciences*. – 2021. – Vol. 8, № 10. – P. 239.

Патент

7. Пат. 2776295 Российская Федерация, МПК G01N 33/535, C12N 15/62. Способ выявления заражения людей и животных SARS-CoV-2 и диагностический набор для осуществления способа / **А.С. Бобикова**, В.Н. Афонюшкин, М.Л. Филипенко, Т.Е. Миронова, Д.А. Макаров, Н.А. Сигарева: № 2021126185; заявл. 03.09.2021; опубл. 18.07.2022 заявитель Новосибирский ГАУ, СФНЦА РАН, ИХБФМ РАН. – 14 с.

Публикации в других изданиях

8. **Бобикова, А.С.** Исследование слизистой оболочки трахеи и бронхов цыплят-бройлеров, зараженных инфекционным бронхитом, с помощью реакции иммунофлуоресценции / А.С. Бобикова, В.Н. Афонюшкин, Н.А. Сигарева // Теория и практика современной аграрной науки: сб. материалов II Национальной (всерос.) науч. конф. – Новосибирск: ИЦ НГАУ «Золотой колос», 2020. – С. 674–676.

9. **Бобикова, А.С.** Скрининг веществ с виروцидной активностью на модели коронавирусной инфекции у петушков кросса Shaver / А.С. Бобикова // Морфологические науки – фундаментальная основа медицины: сб. материалов V Международной морфологической науч.-практ. конкурс-конф. студентов и молодых ученых. – Новосибирск: НГМУ, 2020. – С. 37-39.

10. **Бобикова, А.С.** Особенности иммунологических реакций у кур после терапии препаратами Люманце и Глицевир при моделировании коронавирусной инфекции / А.С. Бобикова, В.С. Черепушкина, В.Ю. Коптев // Молекулярно-генетические технологии анализа экспрессии генов продуктивности и устойчивости к заболеваниям животных: материалы 3-й Международной науч.-практ. конф. – Москва, 2021. – С. 195–205.

11. **Бобикова, А.С.** Экспериментальное моделирование коронавирусной инфекции у кур с последующей фармакологической коррекцией / А.С. Бобикова // Наука будущего – наука молодых: сб. тез. докл. IV Междунар. науч. конф. и VI Всерос. молодеж. науч. форума «Наука будущего». – Москва, 2021. – С. 6.

12. **Бобикова, А.С.** Исследование виروцидной активности препаратов Тривирон, Арговит и Экоцид С на модели инфекционного бронхита кур / А.С. Бобикова // Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых: сб. материалов VIII международной научно-практической конференции. – Краснообск: СФНЦА РАН, 2021. – С. 185-190.