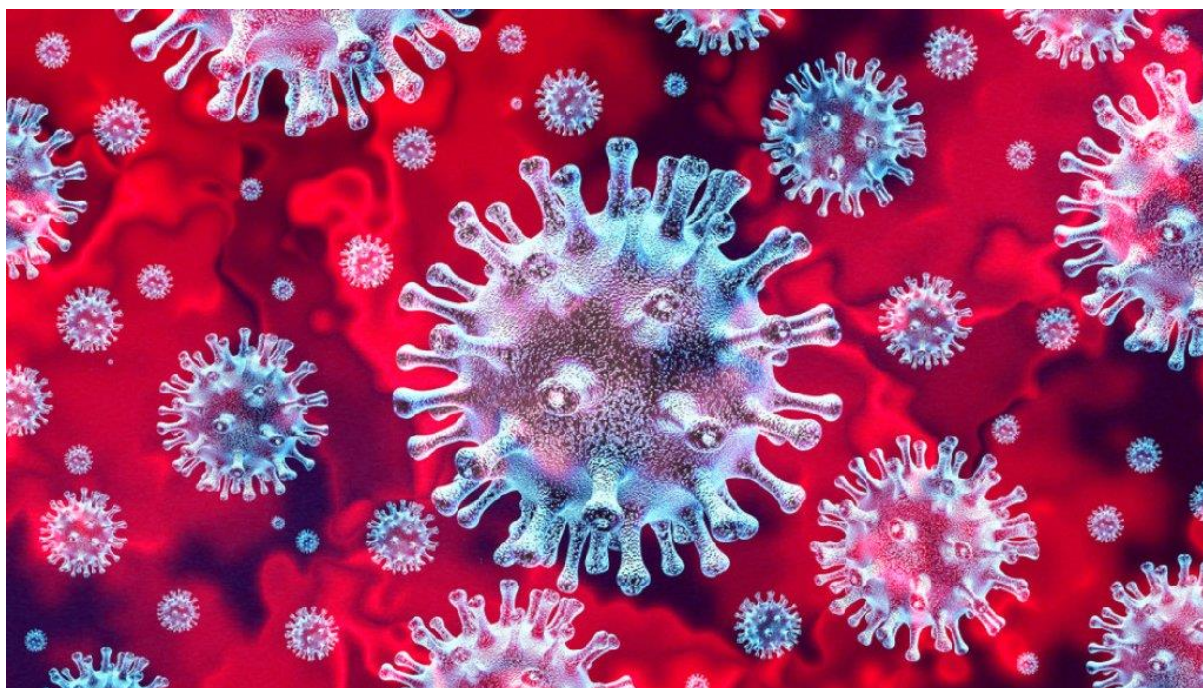


Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР  
АГРОБИОТЕХНОЛОГИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И  
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СО РАН  
УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И  
СХЕМ ЛЕЧЕНИЯ ПРИ КОРОНАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ



Новосибирск 2021

**УДК: 615.03:615.076.9:578.76: 578.83:578.423**

Оценка эффективности лекарственных препаратов и схем лечения при коронавирусных инфекциях / ИЭВСиДВ СФНЦА РАН, ИХБФМ Сибирское отделение - Новосибирск, 20.05.2022. - 44 с., 21 илл.

В данных методических рекомендациях описаны методики контроля эффективности вирулицидных и противовоспалительных препаратов *in vitro* и *in vivo* с использованием ПЦР, ИФА и иных методов молекулярной диагностики, электронной микроскопии, гистологических техник. Предложены различные подходы по использованию вирулицидных препаратов, кормовых добавок и дез.средств для лечения и профилактики вирусных инфекций кур а также для поиска новых средств терапии коронавирусных инфекций, включая COVID-19 у человека.

Данные рекомендации рассчитаны на сотрудников НИУ, корпоративных научных исследователей.

Методические рекомендации подготовили: А.С. Бобикова, канд. биол. наук В.Н. Афонюшкин, В.С. Черепушкина, Т.Е. Миронова, Н.Ю. Балыбина, Е.В. Нефедова, (СФНЦА РАН) доктор биол. наук Е.И. Рябчикова, канд. биол. наук М.Л. Филипенко, Ю.Н. Козлова, Ю.Е. Полетаева (ИХБФМ СО РАН) доктор ветеринар. наук И.Н. Громов, В.А. Левкина (УО ВГАВМ),

Рецензенты: д.в.н. Нефедченко А.В., к.в.н., доцент Вольф В.Т.

Методические рекомендации «Оценка эффективности лекарственных препаратов и схем лечения при коронавирусных инфекциях» рассмотрены и утверждены на Ученом Совете ИЭВСиДВ СФНЦА РАН (протокол № от . .2021); одобрены и рекомендованы к печати экспертной комиссией СФНЦА РАН (протокол № \_ от \_\_.\_\_.2021).

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ИБК (IBV) – инфекционный бронхит кур

ПЦР – полимеразная цепная реакции

ОТ ПЦР – обратная транскрипция полимеразной цепной реакции

ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром

ИФА – иммуноферментный анализ

ЭИД – эмбриональная инфекционная доза

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

Ct – пороговый цикл

r – коэффициент корреляции

Cv – коэффициент вариации

## СОДЕРЖАНИЕ

стр.

<b>Введение</b>	5
1.Скрининг препаратов с вирулицидной активностью <i>in vitro</i>	9
1.1 Использование бактериофагов в качестве модельного объекта для скрининга веществ и препаратов с вирулицидной активностью	9
1.1.1 Описание методики тестирования вирулицидной активности ветеринарных и медицинских препаратов <i>in vitro</i>	10
1.1.2 Примеры тестирования <i>in vitro</i> различных вирулицидных препаратов	11
1.2 Электронно-микроскопический анализ повреждения вирусных частиц вирулицидными веществами на примере органического производного серебра	12
2. Экспериментальные модели для оценки влияния противовирусных препаратов на вирусную нагрузку, на модели инфекционного бронхита кур	16
2.1. Патологоанатомические изменения	17
2.2. Люминесцентно-микроскопический анализ легких	20
2.3. Патогистологическая диагностика	23
3. Методика получения гипериммунного флуоресцентно-меченного иммуноглобулина для иммунофлуоресцентной детекции вируса ИБК в тканях	26
4. Иммунофлуоресцентный анализ на наличие антигенов вируса ИБК в гистологическом препарате	28
5. Анализ воспалительных и иммунологических реакций	31
6. Математическое моделирование активности вирулицидных препаратов с использованием программной платформы BioUML	36
7. Тактика терапии и профилактики кур вирулицидными препаратами	44
7.1. Техника аэрозолетерапии Тривироном и Экоцидом	44
7.2. Выпаивание вирулицидных препаратов	45
8. Применение препаратов с преимущественно противовоспалительной активностью	47
<b>Заключение</b>	51
<b>Список использованной литературы</b>	52

## Введение

Поражение (патологические изменения) респираторной системы, вызванное вирусом инфекционного бронхита (ИБК) у кур [1, 11]., имеет много общих черт с поражением респираторной системы вызванной SARS CoV2 у человека. В обоих случаях есть основания полагать, что после локальной репродукции вируса непосредственно в месте заражения, происходит его накопление в кишечнике (органе, обладающем наибольшим секреторным потенциалом клеток, рецепторами и ферментными системами пригодными для репродукции коронавируса и формирования вирусных частиц). Оба вируса являются низкокопийными, и значительная часть повреждений развивается за счет реакции иммунной системы. Низкая концентрация коронавирусов в организме также создает основу для эффективной противовирусной терапии, нацеленной на дальнейшее снижение копияности вирусных частиц в органах с наибольшей активностью его репродукции [1].

Препараты с вирулицидной активностью в тонком отделе кишечника потенциально могут быть эффективны по отношению к коронавирусам. Клинические наблюдения показывают эффективность препаратов типа «Экоцид С», «Тривирон», «Арговит» (наночастицы серебра производства НПЦ «Вектор-Вита») при вирусной мальабсорбции на птицефабриках (флавивирусной, астровирусной этиологии). Противовирусный препарат Тривирон начали применять в ветеринарии сравнительно недавно [6,7]. По механизму действия он не имеет аналогов и относится к новой фармакологической группе синтетических рибонуклеаз [2, 3]. Арговит, содержащий наночастицы серебра, до недавнего времени рассматривали, в первую очередь, в контексте антибактериальной активности, ввиду большей методической сложности оценки противовирусных эффектов. Сравнительно недавно были

выявлены противовирусные эффекты наночастиц серебра и других металлов [ 8-11 13, 14, 19, 23]. Недавно была показана активность наночастиц серебра, в том числе, и против SARS Cov2 [24]. Экоцид С (представляет собой порошок перексомоносульфата (тройная соль)) (50%) поверхностное активное вещество (додecilбензолсульфонат натрия) органические кислоты и неорганические буферные системы. Достаточно широко это средство применяется в отечественном птицеводстве путем выпаивания живой птице (преимущественно при вирусной мальабсорбции). Высокая антибактериальная и, противовирусная активность, в сочетании с малой токсичностью и стабильностью в живом организме, делают его перспективным в том числе в качестве противовирусного средства местного применения [4] и дезинфектанта, препятствующего горизонтальному переносу генов антибиотикоустойчивости [5].

Внелегочные формы COVID-19 описаны в научной литературе [17]; поражение кишечника часто отмечается практически при всех коронавирусных инфекциях, включая (FIP, TGS, IBV, COVID-19 [20, 25] и др.). Помимо исключительно большого потенциала для репликации вируса для коронавирусов большое значение имеет протеолитическое созревание S-белка и последующая интернализация вируса в клетку, после связывания с клеточным рецептором. В этом процессе активно участвуют сериновые протеазы, включая трипсин как у SARS CoV2[12, 15, 16, 26] так и у IBV [21]. В связи с этим, наночастицы серебра, потенциально могут оказывать дополнительный эффект в качестве ингибитора сериновых протеаз [9]. В научной литературе описан эффект ингибиторов сериновых протеаз – подавление попадания коронавирусов в клетку [16].

Инфекционный бронхит , как модель кишечных коронавирусных инфекций животных и человека, с осложнениями в виде ОРДС, более перспективнее, чем тесты *in vitro*. Относительно низкая копияность

коронавирусов и, следовательно, большое значение в реализации патологических процессов, процессов перераспределения вирусных частиц из зон с высокой концентрацией в органы, где наличие вируса может вызвать жизнеугрожающее состояние, делает клеточные модели малоэффективными.

В контексте нашего исследования, мы сформировали комплекс последовательного скрининга биологически активных веществ, с противовирусной (вирулицидной) активностью на бактериофагах, с последующим высокоэффективным тестированием их эффектов на уровне их эффектов на уровне организма, органов и тканей на модели инфекционного бронхита кур с инструментальной оценкой эффектов вирулицидных веществ методами ОТ-ПЦР и DLAS 3D.

В нашем исследовании мы считаем важным рассмотреть перспективы борьбы с коронавирусными инфекциями, включая COVID-19, путем использования вирулицидных препаратов. Вирулицидные препараты т.е. вещества вызывающие инактивацию вирусных частиц, ограничивающую их последующее заражение новых клеток, без повреждения клеток и тканей организма. К такому классу препаратов следует отнести и наночастицы серебра. В отличие от классических противовирусных препаратов, например, ингибиторов активности РНК-зависимой РНК-полимеразы коронавирусов (арепливир, ремдесивир и т.д.) вирулицидные препараты могут не проникать внутрь клетки, чтобы оказывать свое противовирусное действие. По этой причине дозировки препаратов могут быть меньше или их токсический эффект может быть существенно меньшим, по причине плохого транспорта внутрь клеток (что существенно снижает риски нарушения метаболизма). Особенности фармакокинетики многих вирулицидных препаратов заключаются в плохом проникновении через слизистые барьеры. Однако, инактивация вирусных частиц на поверхности слизистых оболочек (кишечник,

носоглотка) в сочетании с весьма интенсивным самоочищением поверхностей слизистых, создает хорошие перспективы для ограничения попадания вируса SARS CoV2 в кровеносные и лимфатические сосуды, с последующим гематогенным и лимфогенным транспортом в малый круг кровообращения (т.е. легкие). Так как в крови вирус SARS CoV 2 практически не обнаруживается, а интенсивность биосинтетических процессов в эпителии слизистых оболочек велика, ограничение размножения вируса в кишечнике и носоглотке может оказывать системное действие на развитие COVID-19, в т.ч. в сочетании с системным адаптивным иммунитетом (который менее эффективен в просвете кишечника и носоглотки).



## **1.Скрининг препаратов с вирулицидной активностью *in vitro***

### **1.1 Использование бактериофагов в качестве модельного объекта для скрининга веществ и препаратов с вирулицидной активностью**

Вирусы бактерий (бактериофаги) - удобная модель для исследований противовирусной активности различных антисептических препаратов. Так как бактериофаги поражают бактерии, которые удобно выращивать на плотных и жидких питательных средах, то эксперименты, проведенные в условиях *in vitro*, помогут адекватно оценить рабочую концентрацию исследуемого препарата, и его рабочий температурный диапазон. Выбор диапазона температур основывается, на том, что в условиях внешней среды температура может варьировать в широких пределах, это необходимо для санации помещений, приборов и т.д., температура тела животных также варьирует, например, температура тела человека колеблется от 35,5 до 37,2°C, температура тела собак от 38,5 - 39°C, температура тела кошки 38 – 39,5°C, температура тела у индеек и уток от 40,5 до 41°C, у цесарок от 41 до 42°C и температура тела у кур 40,5 – 42°C. Всё это приводит к тому, что разную концентрацию препарата необходимо оценивать в температурном градиенте от 0 до 42°C.

Оценивая противовирусную активность препарата с помощью бактериофага  $\phi 6$  можно оценить активность этого вещества относительно других вирусов, содержащих в своем капсиде липиды, например, хорошо известные липидсодержащие вирусы эукариотических клеток, как герпесвирусы 1 и 2 типа, коронавирус COVID-19 [29-31].

Представляет интерес проведение сравнительных исследований в отношении вирусных частиц, не содержащих в своем составе липиды, а нуклеиновая кислота представлена не RNA, а DNA. В качестве модельных объектов перспективны бактериофаги  $\phi 6$ , PA136. Преимуществом, в

сравнении с “эукариотическими” вирусами, является возможность ограничиться работой с бактериями, что минимизирует трудоемкость и требования к обеспечению биобезопасности.

Бактериофаг  $\phi 6$  относится к семейству *Cystoviridae*. Фаговые частицы сферической или икосаэдрической формы, тип нуклеиновой кислоты dsRNA. В составе оболочки (капсида) находятся липопротеиды.

Бактериофаг PA136 относится к семейству *Mioviridae*. Головка фаговой частицы имеет икосаэдрическую форму и сокращающийся хвост, тип нуклеиновой кислоты dsDNA. В составе оболочки (капсида) отсутствуют липопротеиды.

### **1.1.1 Описание методики тестирования вирулицидной активности ветеринарных и медицинских препаратов *in vitro***

В качестве модели противовирусной активности препаратов с вирулицидным действием *in vitro* использовали бактериофаг  $\phi 6$ .

Объектами исследования являются бактериофаги  $\phi 6$  и PA136. Оба бактериофага активны против бактерий рода *Pseudomonas*, но видовая чувствительность различна. Бактериофаг  $\phi 6$  поражает *P.phaseolicola*, а бактериофаг PA136 активен в отношении *P. aeruginosa*.

Выживаемость фаговых частиц определяли методом двухслойного агара (метод Грация). Для оценки активности фаговых частиц используют культуру клеток *Pseudomonas phaseolicola*.

Тестируемые препараты инкубировали с культурой бактериофага в различных концентрациях при комнатной температуре. Через 1, 5, 15, 30, 60 минут после инкубации проводили посеvy образцов, содержащих бактериофаги и интактную культуру бактериофага. Посевы проводили в 10-кратных разведениях (для определения остаточной концентрации бактериофага). Все опыты проводятся в двух - четырех повторностях.

После воздействия тестируемого препарата на культуры бактериофагов  $\phi$  6 и на PA136 препарата, выживаемость фаговых частиц определяются методом двухслойного агара (метод Грация). Для оценки активности фаговых частиц использовали культуру клеток *Pseudomonas phaseolicola* в отношении фага  $\phi$  6, и *P. aeruginosa* в отношении фага PA136.

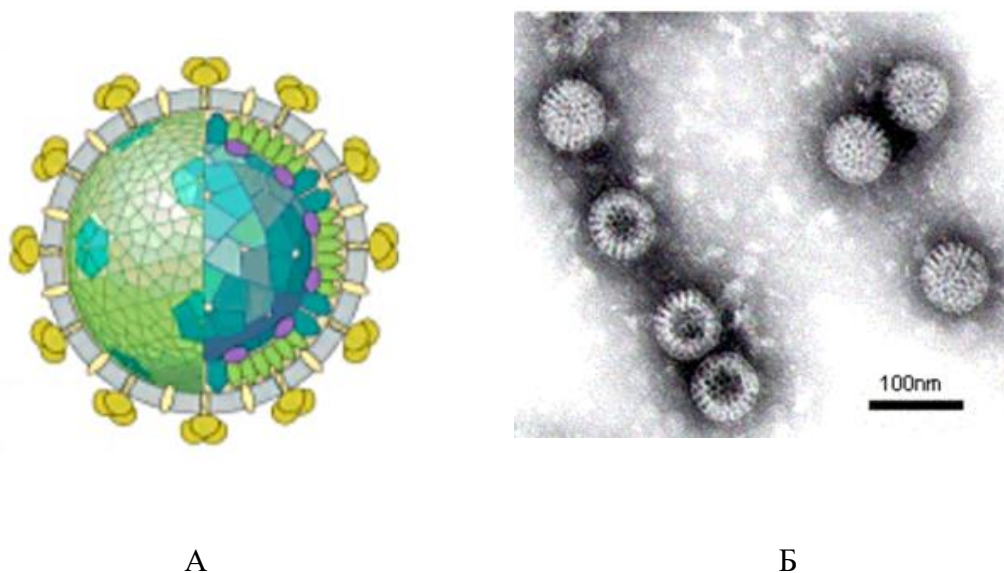


Рисунок 1 – Строение бактериофага  $\phi$ 6 семейства *Cystoviridae* (А – схематичное строение, Б – электронная микрофотография бактериофагов) [30].

### 1.1.2 Примеры тестирования *in vitro* различных вирулицидных препаратов

Для определения рабочей концентрации препарата Тривирон использовали бактериофаг  $\phi$ 6. Исследования проводили при комнатной температуре  $26 \pm 2$  °С. Препарат Тривирон подавлял активность фаговых частиц в концентрации 0,003 % (30 мкг/мл) включительно, в течение 1 минуты (таблица 1).

Препарат «Экоцид С», в концентрации 0,05 %, полностью подавлял вирусную активность в условиях *in vitro*, также в течение минуты

Арговит, в концентрации 10 мкг/мл, инактивировал вирусные частицы после 15 минут инкубации, при комнатной температуре.

Таблица 1 – Изменение концентрации бактериофага ф6 после инкубации с вирулицидными препаратами, БОЕ/мл

Наименование препарата и концентрация	Исходная концентрация бактериофага ф6, БОЕ/мл	Экспозиция, мин.				
		1	5	15	30	60
Экоцид С, 0,05%	$9 \times 10^5$	0	0	0	0	0
Тривирон, 3 мкг/мл	$1 \times 10^7$	0	0	0	0	0
Арговит 10 мкг/мл	$4,2 \times 10^6$	$3,4 \times 10^4$	$6 \times 10^2$	0	0	0

## 1.2 Электронно-микроскопический анализ повреждения вирусных частиц вирулицидными веществами на примере органического производного серебра

Суспензию вируса гриппа с концентрацией  $10^7$  частиц/мл обрабатывали препаратом  $Ag_2S$  (Аргосил) [34] в течение 20 ч при  $37^\circ C$ . Контролем служила суспензия вируса гриппа, инкубированная при  $37^\circ C$  в течение 20 ч.

Изменения морфологии частиц вируса гриппа изучали методом негативного контрастирования, для чего образцы вируса гриппа, инкубированные с препаратом, сорбировали на медные сетки, покрытые формваровой подложкой, в течение 1 минуты, затем контрастировали 2% раствором уранилацетата в течение 5 сек., избыток жидкости оттягивали фильтровальной бумагой. Образцы изучали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения

вирусных частиц получали с помощью цифровой камеры Veleta (SIS, Германия).

#### Морфология частиц вируса гриппа (контроль)

Препараты вируса гриппа, инкубированные в течение 20 часов при 37°C, содержали вирионы округлой формы, в основном имеющие размеры 80-100 нм, с отчетливыми шипиками на поверхности (Рис. 2). Структура вирусных частиц соответствовала описанной в научной литературе. В препаратах встречались также мембранные фрагменты и «обломки» клеточных структур, бесструктурное вещество.

Вирусные частицы сорбировались поодиночке или небольшими скоплениями по несколько штук, агрегация частиц отсутствовала.

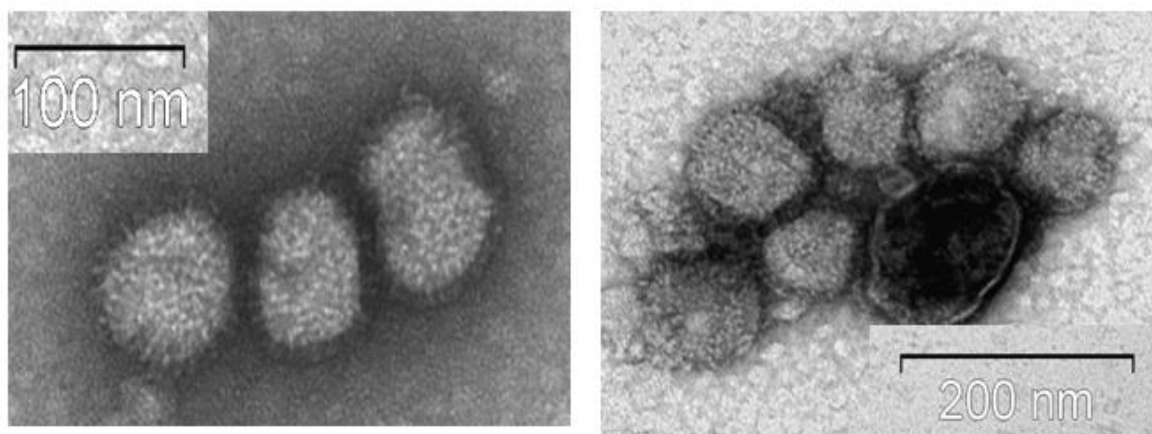


Рисунок 2 - Частицы вируса гриппа в суспензии, инкубированной в течение 20 часов при 37°C. На поверхности вирионов видны шипики. Просвечивающая электронная микроскопия. Негативное контрастирование 2% р-ром уранилацетата.

#### Влияние препарата Ag<sub>2</sub>S на морфологию частиц вируса гриппа

Суспензию вируса гриппа инкубировали с препаратом Ag<sub>2</sub>S в течение 20 часов при 37°C. В отличие от контроля, вирусные частицы формировали крупные скопления в электронно-плотном материале, структура вирионов нарушалась, они теряли округлую форму (рис. 3).

Отдельно лежащие частицы вируса гриппа были окружены электронно-плотным материалом в виде каймы, отмечается деформация шипиков на поверхности. Встречались вирионы с углублениями поверхности, свидетельствующими о повреждении вирусной оболочки и полуразрушенные вирусные частицы (рис. 4).

Таким образом, инкубация частиц вируса гриппа с препаратом  $Ag_2S$  приводит к нарушению структуры частиц вируса гриппа.

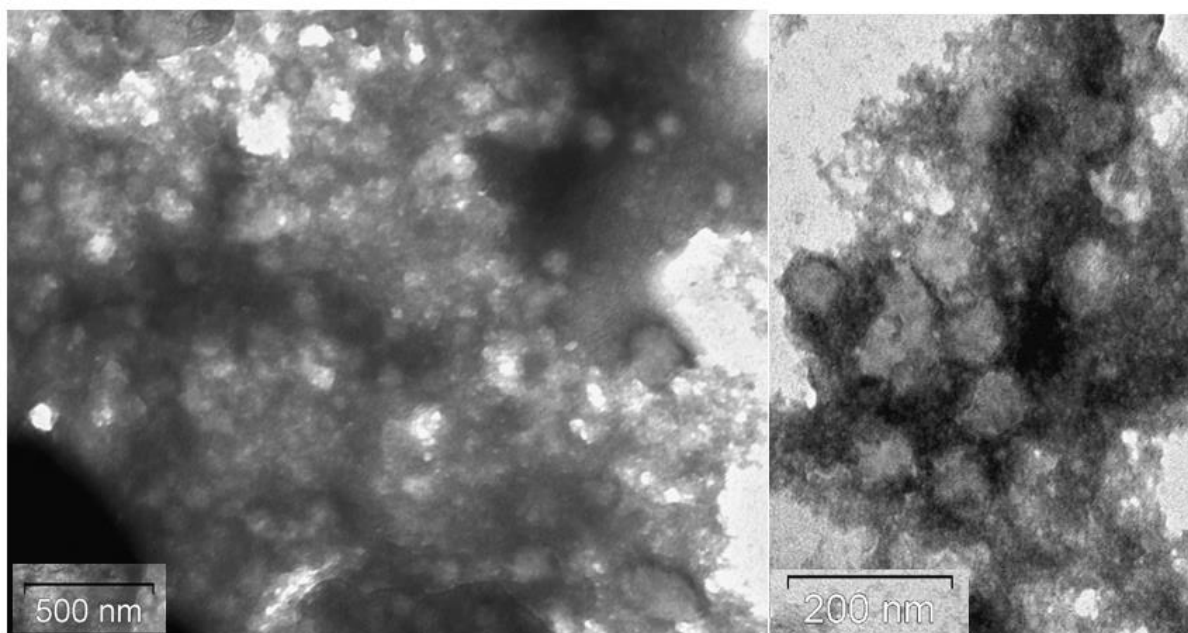


Рисунок 3 - Скопление частиц вируса гриппа (слева). Нарушение структуры частиц вируса гриппа (справа). Инкубация с препаратом  $Ag_2S$  в течение 20 часов. Просвечивающая электронная микроскопия. Негативное контрастирование 2% р-ром уранилацетата.

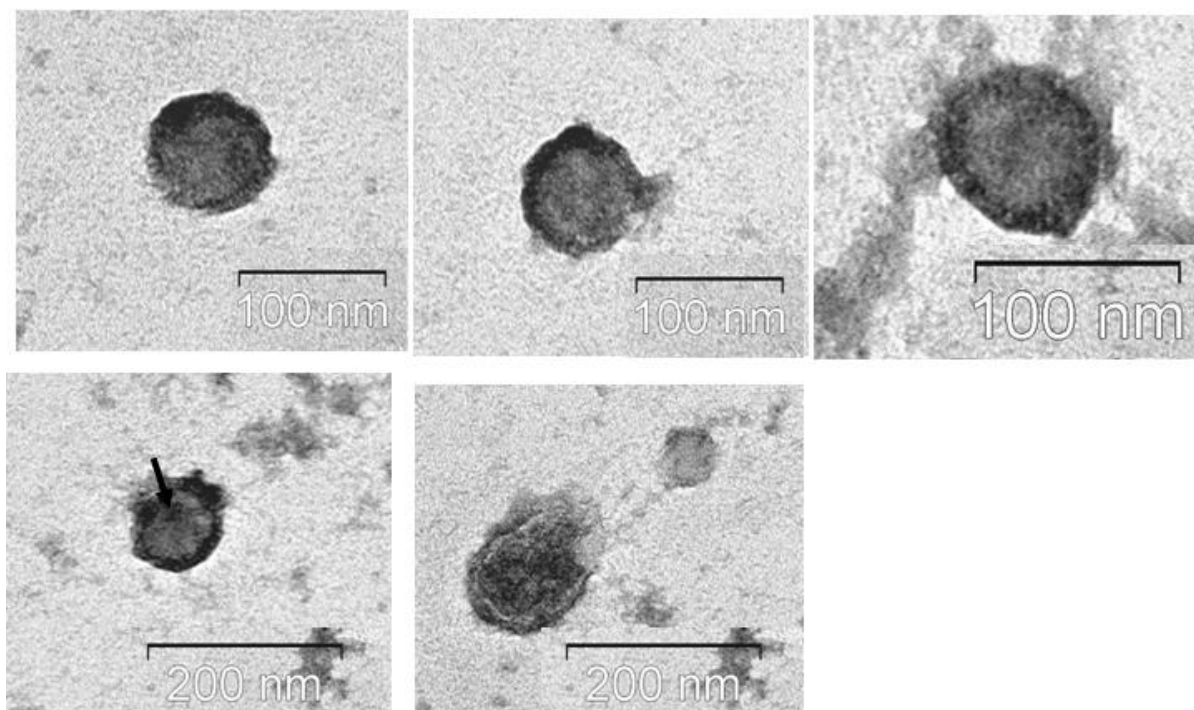


Рисунок 4 - Отдельно лежащие частицы вируса гриппа. Инкубация с препаратом  $Ag_2S$  в течение 20 часов. Просвечивающая электронная микроскопия. Негативное контрастирование 2% р-ром уранилацетата.

Примечание: Верхний ряд: электронно-плотный материал на поверхности вирионов, повреждение шипиков. Нижний ряд: углубление на поверхности вириона (показано стрелкой, разрушенный вирион).

На приведенном примере видно, что использование электронной микроскопии может быть эффективным инструментом для анализа вирулицидной активности новых химических соединений или уже известных ветеринарных/медицинских препаратов.

## **2. Экспериментальные модели для оценки влияния противовирусных препаратов на вирусную нагрузку, на модели инфекционного бронхита кур**

Сущность методического подхода состоит в том, что использование аттенуированного штамма вируса ИБК достаточно безопасно, но, позволяет смоделировать инфекционный процесс, ввиду наличия как процессов циркуляции вируса так и реакций воспалительного характера, достаточно выраженных, при оптимальных дозах заражения и путях введения [1, 6, 35].

Петушки кросса шейвер в возрасте 14 суток, получили вакцину против ИБК (Вакцина против инфекционного бронхита кур из штамма H120 живая сухая). Вакцину вводят перорально, индивидуально в дозе 5 lg ЭИД 40 на голову. Для исследований формируют опытные группы по 10 голов, контрольная группа 12-14 голов.

Курс выпаивания всех препаратов не более 5 суток. Производят убой на 6 сутки (для более стабильной оценки вирусной нагрузки, длительность эксперимента может составлять 4 суток, для анализа иммунологических и воспалительных реакций эксперимент можно проводить в течение 5-6 суток).

При длительности эксперимента более 4-х суток, можно провести оценку формирования антител класса М с использованием стандартного ИФА набора для определения антител к вирусу инфекционного бронхита кур (например, PROFLOCK) и конъюгата антивидового, специфичного в отношении антител класса М птиц (Goat Anti-Chicken IgM H&L (HRP) (ab112813) Abcam).

Для оценки вирусной нагрузки, а также анализа экспрессии генов следует отбирать пробы слизистой тощей кишки, кусочек легкого и тимуса.



Из внутренних органов выделяли РНК, проводили ОТ-ПЦР. РНК выделяли с использованием силика-колонок, с предварительным разрушением клеток гуанидин-изотиоционатом. Копийность вируса ИБК оценивали методом ОТ-ПЦР [6].

Синтез кДНК проводили с использованием олигонуклеотида N7.

ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем 67 мМ трис.-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров 5'-atgctcaaccttgccctagca-3' 5'tcaaactgcggatcatcacgt-3', и зонда FAM-tggaagtagagtgcgсссааас-ВНQ, 1-2 ед. HotStart Taq-ДНК полимеразы. ПЦР проводили на амплификаторе CFX (BioRad) по следующей программе: начальная денатурация – 95°С 15 мин., далее 40 циклов: денатурация - 95°С 10 сек, отжиг - 60°С 30 секунд.

Контроль полноты выделения РНК из образцов проводили с использованием ПЦР в режиме реального времени, специфичного в отношении мРНК гена домашнего хозяйства glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) по протоколу указанному выше, с использованием праймеров 5`cgtgaccccagcaacatcaa3` и 5` acttacccccagccttctccat3` taqman зонда ROX- tggagtccactgggtgtcttcacc- ВНQ2.

## 2.1. Патологоанатомические изменения

При респираторной форме ИБК отмечают цианоз производных кожи головы (гребешки, ушные мочки, сережки). Слизистая оболочка ротовой полости, клоаки бледно-розового цвета с синюшным оттенком. В носовой полости трупов павших и убитых цыплят обнаруживают серозный или серозно-катаральный экссудат. Слизистые оболочки гиперемированы и отечны, сосуды расширены, кровенаполнены и рельефно вырисовываются на ее поверхности. При осложнении гемофилезом в инфраорбитальных синусах встречается скопление творожисто-подобного гнойно-

фибринозного экссудата. Слизистая оболочка трахеи гиперемирована, набухшая, с наличием единичных точечных кровоизлияний. В просвете средней и задней частей трахеи обнаруживают фибринозно-слизистые пробки в виде колец, которые легко удаляются. Наиболее патогномоничный признак – пробочки фибрина в бифуркации трахеи (рис. 5). В крупных бронхах макроскопически обнаруживают скопление вязкого, сметанообразного экссудата с наличием пленок фибрина. Легкие не спавшиеся, розово-красного или темно красного цвета. Поверхность разреза их гладкая, влажная. При надавливании из легких выделяется мутноватая пенистая жидкость. В воздухоносных мешках также находят скопление пенистой прозрачной или мутноватой жидкости. Стенки воздухоносных мешков вначале имеют очаговое помутнение, а затем диффузное. В ряде случаев они покрыты пленками фибрина.

При осложнении респираторной формы ИБК колисептициемией обнаруживают фибринозный перикардит и перигепатит. При ассоциативном течении ИБК и респираторного микоплазмоза наиболее выраженные патологоанатомические изменения наблюдаются в трахее и воздухоносных мешках. При этом отмечают гиперемию слизистой оболочки трахеи, она отечная, рыхлая, матовая, покрыта беловатой тягучей слизью. В некоторых случаях отмечают в трахее наличие желтоватого цвета пробок фибрина. Стенки воздухоносных мешков помутневшие, утолщенные. В их полости содержится гнойно-фибринозный экссудат в виде густых творожисто-подобных масс (в литературе их иногда ошибочно называют «казеозными»).

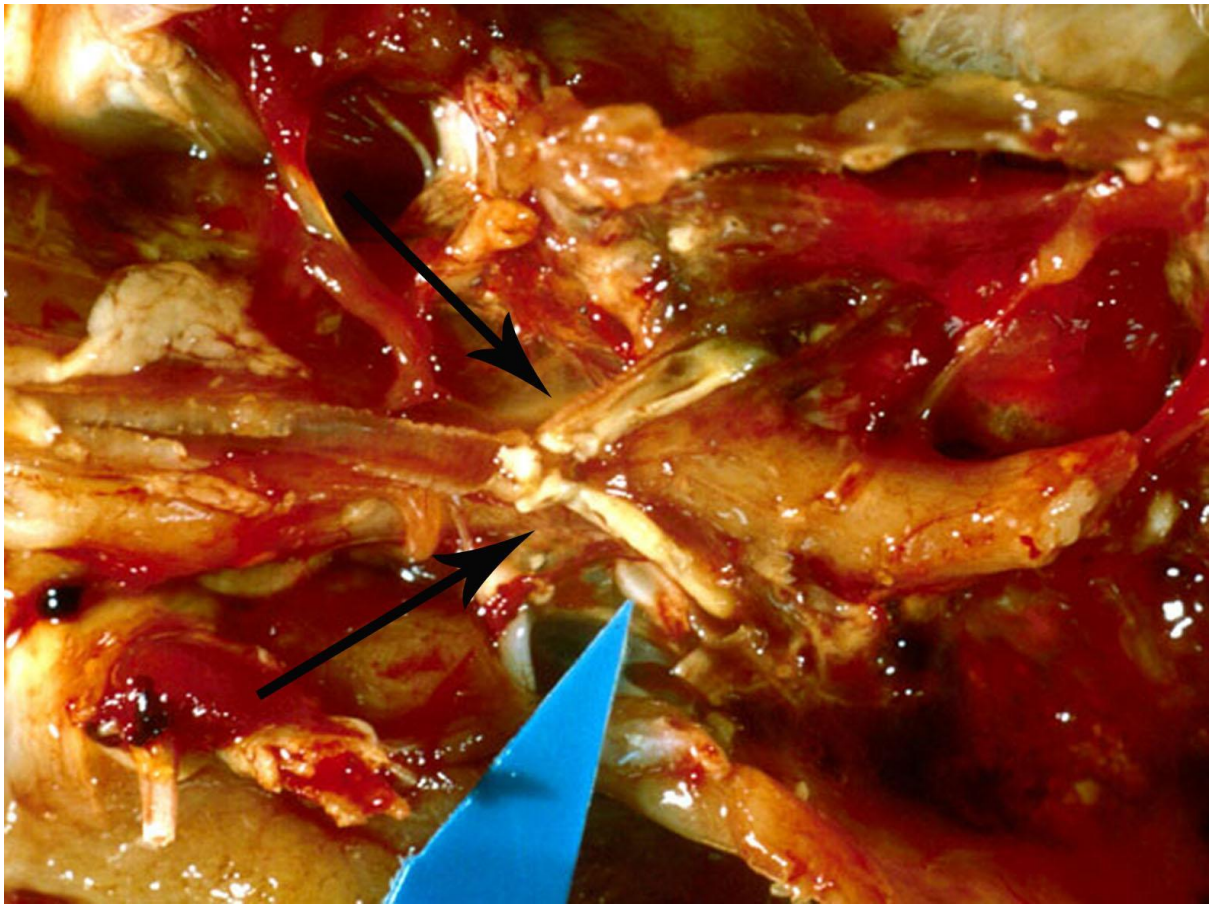


Рисунок 5 - Пробки в бифуркации трахеи

Патологоанатомический диагноз респираторной формы ИБК (у цыплят до 3-недельного возраста):

1. Серозно-катаральный ринит, конъюнктивит.
2. Серозно-катаральный, фибринозный трахеит и бронхит (пробочки и кольца фибрина в бифуркации трахеи).
3. Очаговая катаральная или катарально-фибринозная пневмония (осложнение). Отек легких.
4. Серозно-фибринозный аэросаккулит, полисерозит (осложнение).
5. Общая венозная гиперемия.

## 2.2. Люминесцентно-микроскопический анализ легких

Сущность люминесцентно-микроскопического анализа кусочков органов (легких) состоит в окрашивании фиксированного формалином биоматериала двумя интераклирующими красителями. SYPRO Ruby интеркалирует белки и светится в оранжево-красном диапазоне. SYBR Green I связывается с ДНК и флюоресцирует в зеленом диапазоне (рис. 6).

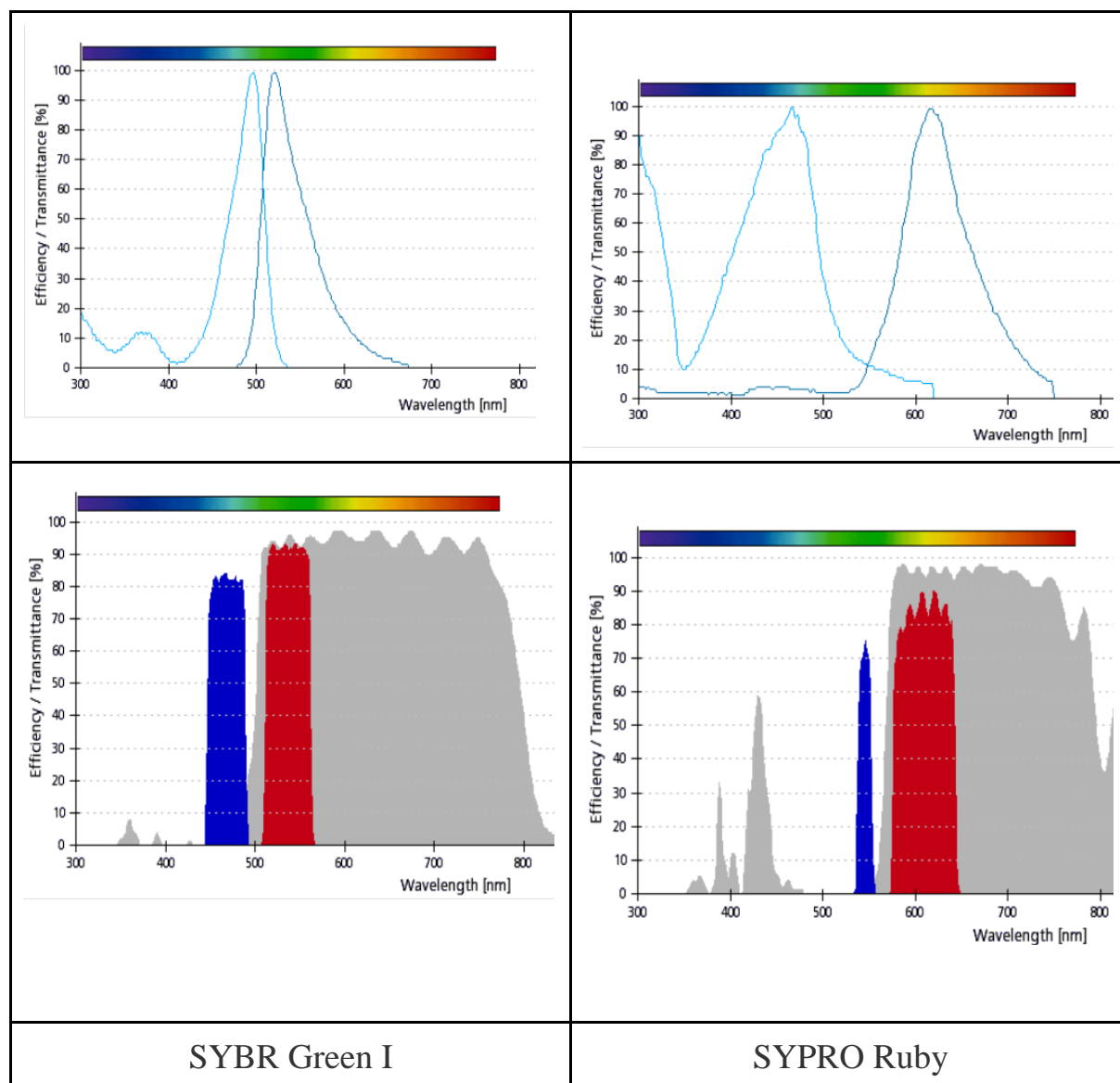


Рисунок 6 - Спектры возбуждения/флуоресценции SYBR Green I и SYPRO Ruby, оптические характеристики светофильтров FS 10, FS 20.

Окрашивание проводится в течение 20 минут. Диффузия красителя происходит в тонком слое клеток, что позволяет избежать интенсивного

фонового свечения всего кусочка ткани. Таким образом, в отличие от гистологического исследования (подразумевающего изучение двумерных гистологических срезов тканей), наша методика подразумевает изучение тонких слоев тканей с трехмерной ориентацией. Например, выстилки кровеносных сосудов, бронхов и т.д. Данная методика позволяет более успешно визуализировать эпителиальные и эндотелиальные клетки (например, внутреннюю поверхность бронхов и кровеносных сосудов, эпителий кишечника). Еще одним важным фактором является хорошая визуализация кровеносных капилляров, кровоизлияний, пропитывание тканей гемоглобином, что сопровождается резким снижением интенсивности флуоресценции. Отличие от конфокальной микроскопии состоит в дешевизне используемой аппаратуры, более быстрой технике окрашивания и большем акценте на изучении поверхностей эпителиев, влиянии диффузионных процессов на микроскопическую картину.

Таким образом, диффузионно-люминесцентный анализ трехмерных структур (DLAS 3D) кусочков легких, позволяет в течение 20-30 минут получать информацию о выраженности патологических процессов в легких.

Методика осуществляется следующим образом:

Кусочки легких фиксируют в 10% забуференном формалине. Фиксированный материал следует разрезать бритвенным лезвием на тонкие пластинки толщиной 1-2 мм. Пластинки ткани окрашивают SYPRO Ruby и 10х раствором SYBR Green I (длительность окраски SYBR Green I составляет не более 20 минут, после чего следует проводить эпифлуоресцентную микроскопию).

Признаки ИБК характеризуются наличием зон периваскулярного пропитывания гемоглобином и по периферии крупных кровеносных сосудов, что характеризуется пониженной фоновой флуоресценцией, слизистые фибринозные и гнойно-фибринозные пробки в просвете



бронхов, очаговой гиперемией паренхимы легких, наличием воспалительных инфильтратов, отеком интерстиция и сужением просветов воздухоносных капилляров (Рис. 7).

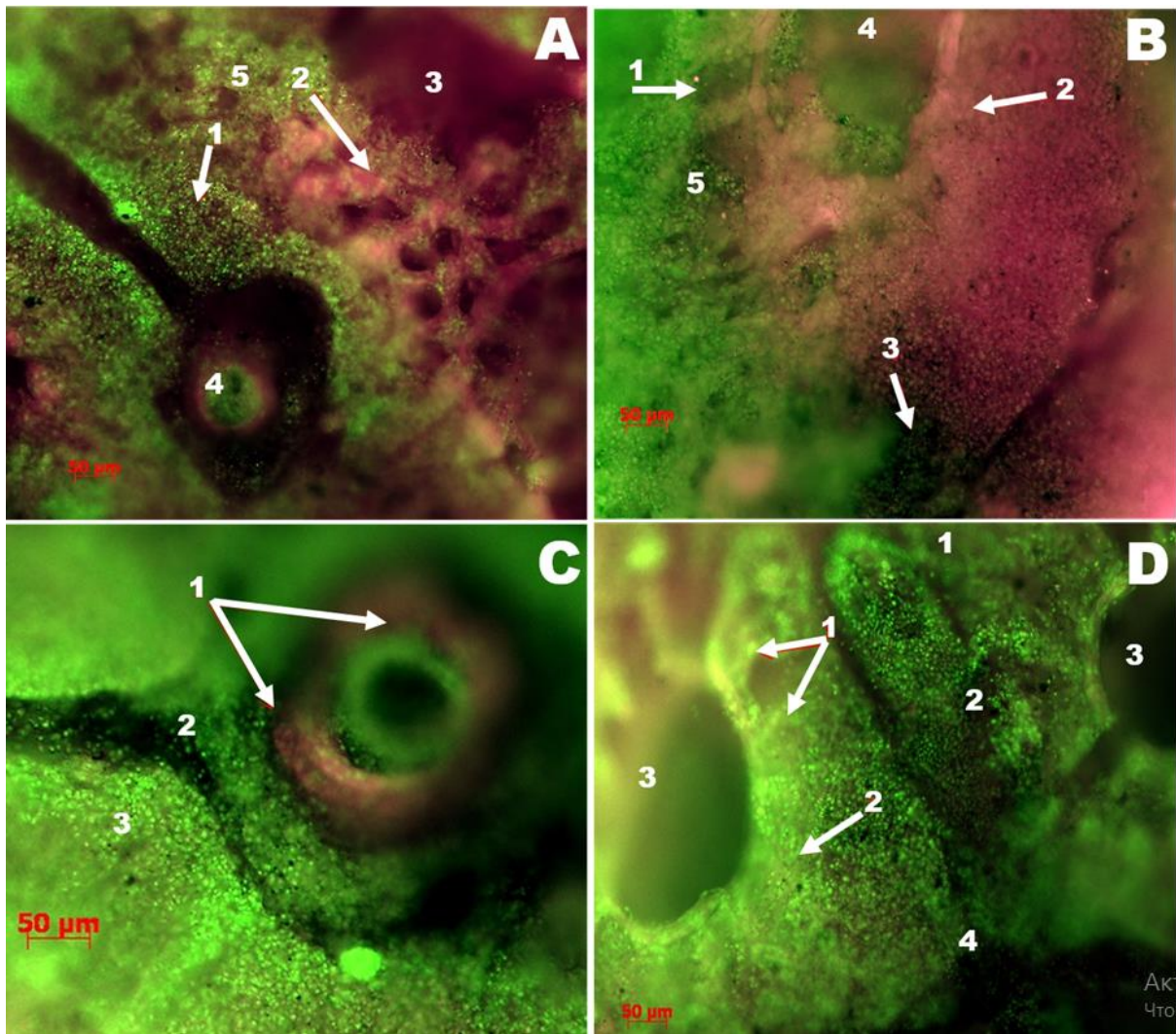


Рисунок 7 - Люминесцентная микроскопия легких. Окраска SYBR Green и Sypro Ruby (x50)

Примечание: А. Интерстициальное воспаление легких: 1 - инфильтраты, 2 - воздухоносные капилляры, 3 - парабронхи, 4 - кровеносные сосуды, 5 участки парабронхиального сегмента с уменьшением просвета воздушных капилляров за счет инфильтрации. В. Очаговые изменения в легких: 1 - воспалительная инфильтрация участка парабронха, 2 - насыщение серозно-катаральным экссудатом паренхимы легких и потеря просвета капилляров дыхательных путей, 3 - кровоизлияние, 4 просвет парабронха 5 сохранившиеся воздухоносные капилляры С. воспаление сосудов: 1- фибриноидное воспаление сосудистой стенки (артерия), 2 - подавление флуоресценции в участке пропитывания ткани гемоглобином, 3 - увеличение плотноклеточности связанное с воспалительной инфильтрацией интерстиция легких D. Воспалительные изменения в парабронхах: 1 - воздухоносные капилляры сохранившие просветы, 2 - воздухоносные капилляры утратившие проходимость, 3 - парабронхи, 4 - кровоизлияния вокруг поврежденного кровеносного сосуда.

### 2.3. Патогистологическая диагностика

Сами по себе факты выявления антител к вирусу ИБК или обнаружения РНК данного вируса методом ОТ-ПЦР мало информативны и не являются основанием для постановки диагноза – “Инфекционный бронхит кур” без соответствующего эпизоотологического, патологоанатомического и/или патогистологического анализа. Оценка эффективности противовирусных/противовоспалительных препаратов должна подразумевать уменьшение или исчезновение патогистологических изменений ассоциируемых с инфекционным бронхитом.

Рассмотрим основных патологические процессы в порядке их диагностической значимости:

**Трахея** – изменения более выражены в средней и задней 1/3 трахеи и менее выражены в передней 1/3 трахеи и гортани; умеренная лимфоидно-макрофагальная инфильтрация слизистой оболочки без формирования лимфоидных узелков (рис. 8); слабо выраженные воспалительная гиперемия и отек собственной пластинки; гиперсекреция желез и бокаловидных клеток, некроз и десквамация покровного эпителия; патологическая регенерация покровного эпителия не выражена, синцитиальные структуры не появляются; внутриядерные и цитоплазматические тельца-включения не выявляются.

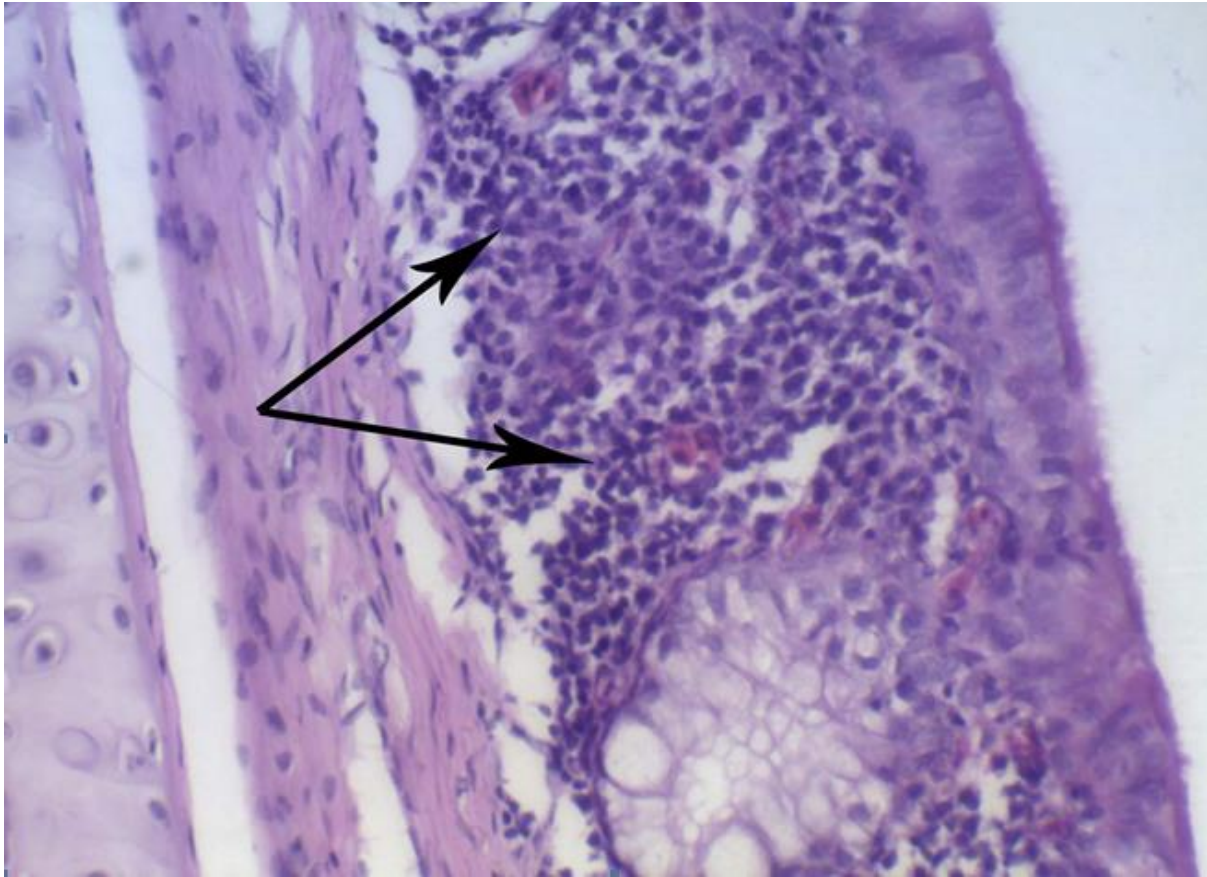


Рисунок 8 - Умеренная лимфоидно-макрофагальная инфильтрация слизистой оболочки трахеи цыпленка-бройлера при респираторной форме ИБК. Гематоксилин–эозин. Биомед-6. Ув.: x 480

**Легкие** – обширные лимфоидно-макрофагальные периваскулиты, пери- и парабронхиты; разрастание соединительной ткани в стенке парабронхов (при хроническом течении).

**Почки** – выраженная лимфоидно-макрофагальная и плазмноклеточная инфильтрация стромы и паренхимы с формированием лимфоидных узелков (рисунок 9); выраженная гиперемия межканальцевых капилляров; слабо выраженная гиперемия и отек сосудистых клубочков (серозный гломерулит); интерстициальный нефрит (при хроническом течении); дистрофические процессы в эпителии мочеобразующих канальцев носят вторичный характер; отложение мочекислых солей в строме сосудистых клубочков и просвете канальцев также носит вторичный характер.



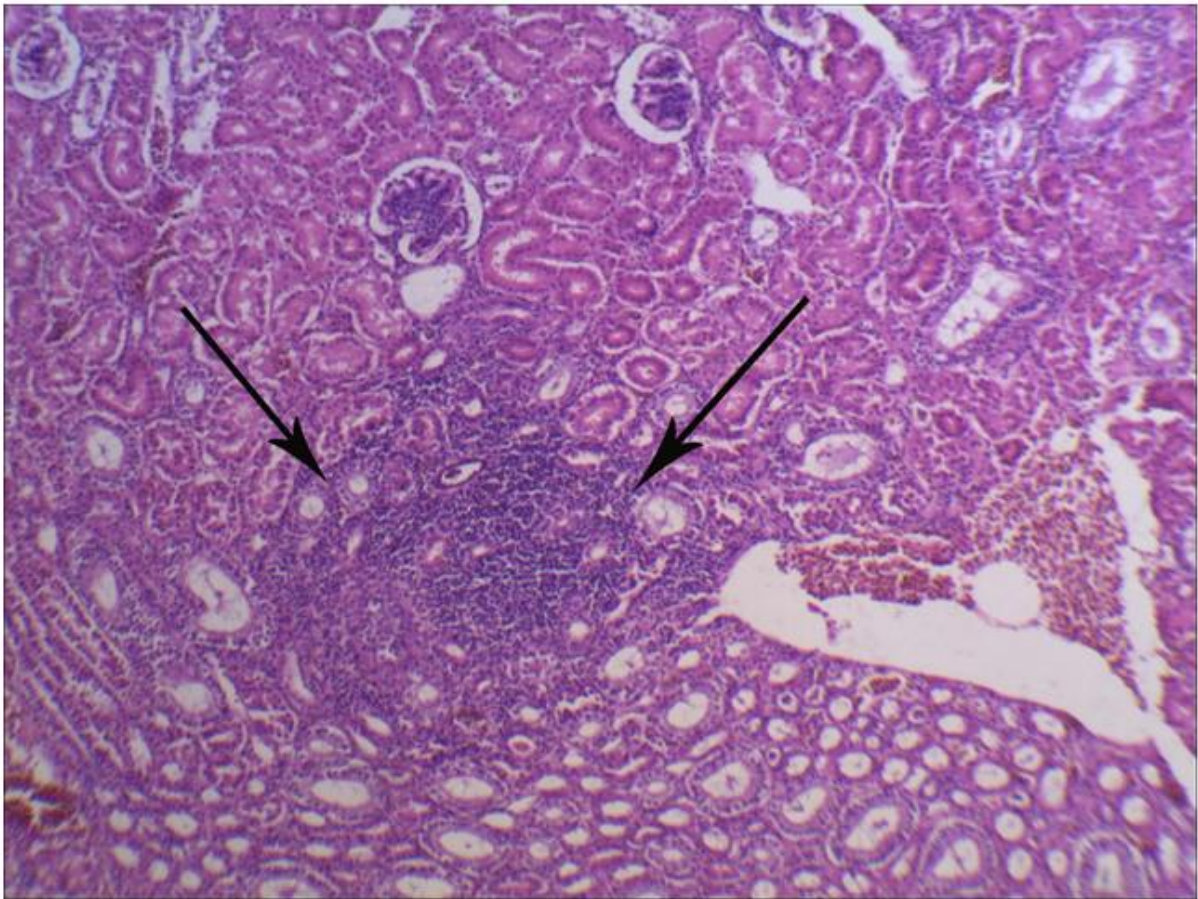


Рисунок 9 - Крупноочаговая лимфоидно-макрофагальная инфильтрация почки цыпленка-бройлера при нефрозо-нефритной форме ИБК. Гематоксилин–эозин. Биомед-6.

### **3. Методика получения гипериммунного флуоресцентно-меченного иммуноглобулина для иммунофлуоресцентной детекции вируса ИБК в тканях**

Гипериммунизация мышей проводится живой аттенуированной вакциной штамма Н120 или 4/91 трехкратно, с интервалом 1 неделю. Иммунизация проводится подкожно, в объеме 100 мкл, 10 доз.

Через 14 дней после последней иммунизации, получают сыворотку крови. Осаждение иммуноглобулина из мышинной сыворотки крови проводят неспецифическим высаливанием сернокислым аммонием.

К гипериммунной сыворотке мыши (500 мкл) добавить равный объем дистиллированной воды, затем при температуре  $(3\pm 1)^\circ\text{C}$  по каплям при перемешивании добавить 1,15 мл охлажденного до  $(4\pm 0,5)^\circ\text{C}$  насыщенного раствора сернокислого аммония. Смесь оставить на 16-20 ч при температуре  $(3\pm 1)^\circ\text{C}$  для формирования осадка.

Осадок отделить центрифугированием в течение 20 мин при 2000 g при температуре  $(20\pm 5)^\circ\text{C}$ , (можно предварительно растворить в свежей порции аммония сернокислого в 34-35% насыщения все остальные белки), надосадочную жидкость слить. Промыть осадок быстрым нанесением и удалением дистиллированной воды (внести в пробирку 500 мкл, тут же встряхнуть переворачиванием пробирки).

Осадок растворить в фосфатно-солевом буферном растворе, 0,01 моль/л (ФСБ) в объеме, 200 мкл.

Добавить насыщенный раствор сернокислого аммония до 35% насыщения. Оставить преципитироваться белки при  $+5^\circ\text{C}$  на 12-16ч. Центрифугировать на максимальных оборотах 10 минут. Надосадочную жидкость слить, осадок растворить в 200 мкл 0,01М фосфатно-солевого буфера рН 7,2-7,4.

Избыток солей аммония следует удалить из препарата методом диализа (трехкратно, по три часа при температуре  $+5^\circ\text{C}$ ).

Гипериммунную глобулиновую фракцию развести до концентрации 5мг/мл, добавить 10% к объему 1М карбонат-бикарбонатного буфера (рН 9,2-9,5), 1.4 мкл на 100 мкл раствора белка сукцинимидного производного флуоресцентной метки.

Инкубировать при комнатной температуре 30 минут. Затем провести очистку раствора иммуноглобулина от солей на сефадексе G-25 или G-75. Объем препарата должен составлять не более 10% объема колонки. Уравновесить предварительно колонку 100 мМ раствором ТрисНСl рН 7,2-7,4. После нанесения и впитывания препарата антител, нанести объем буфера обеспечивающий вытеснение антител из колонки, собрать конъюгат флуоресцентной метки и антител, до начала элюции фракции несвязавшейся метки.

#### **4. Иммунофлуоресцентный анализ на наличие антигенов вируса ИБК в гистологическом препарате**

При эпифлуоресцентной микроскопии поверхности слизистой крупных бронхов и трахеи, можно обнаружить дегенеративные изменения в клетках слизистых желез (рис.10, 11). Используемый метод позволил провести дифференциальную диагностику инфекционного бронхита, на птицефабрике неблагополучной также по ИЛТ и МПВИ (по данным ПЦР анализа). Локализация 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-бройлеров в возрасте 20 дней, повысило восприимчивость к заражению вирусами МПВИ и ИЛТ на более позднем периоде выращивания.

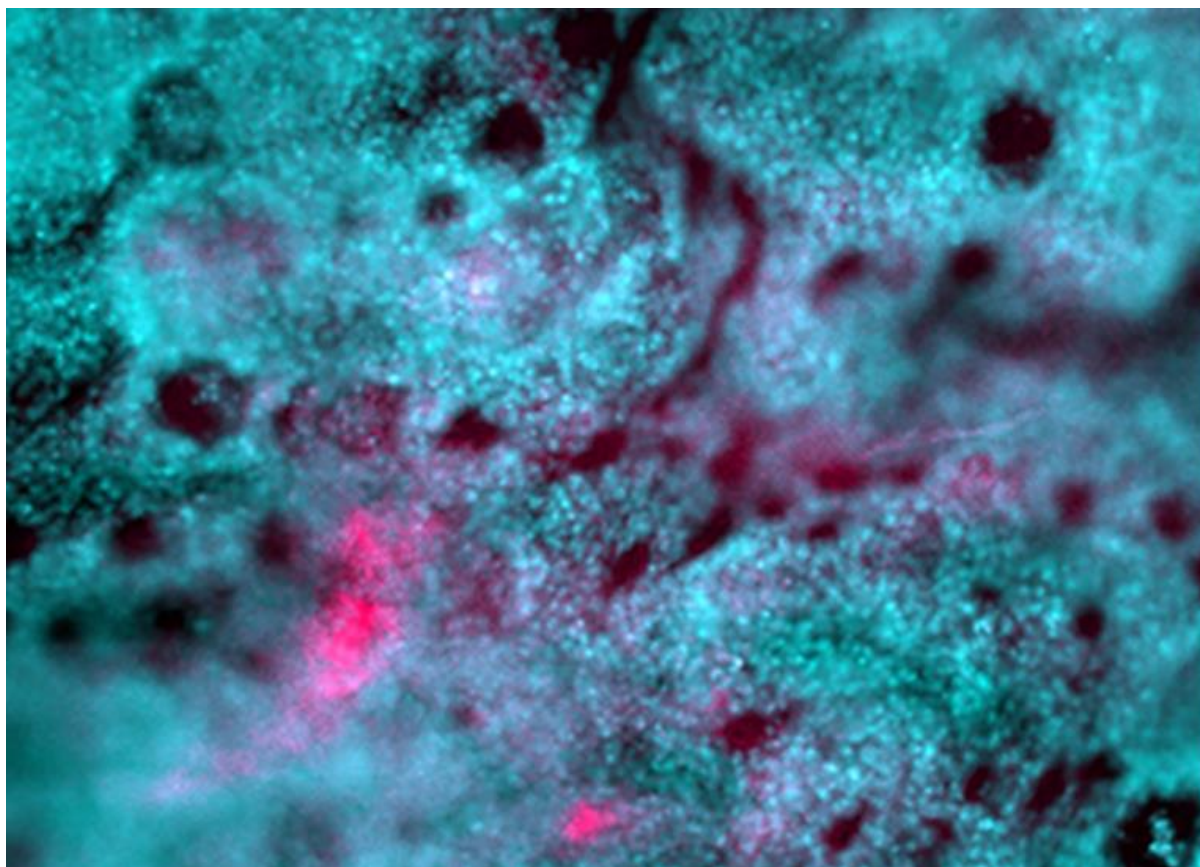


Рисунок 10 - Иммунофлуоресцентная микроскопия слизистой трахеи (вид сверху). Красная флуоресценция (антитела к вирусу ИБК)



меченные родамином), бирюзовая флуоресценция ядер клеток (окраска Hoechst 33258). Увеличение x150.

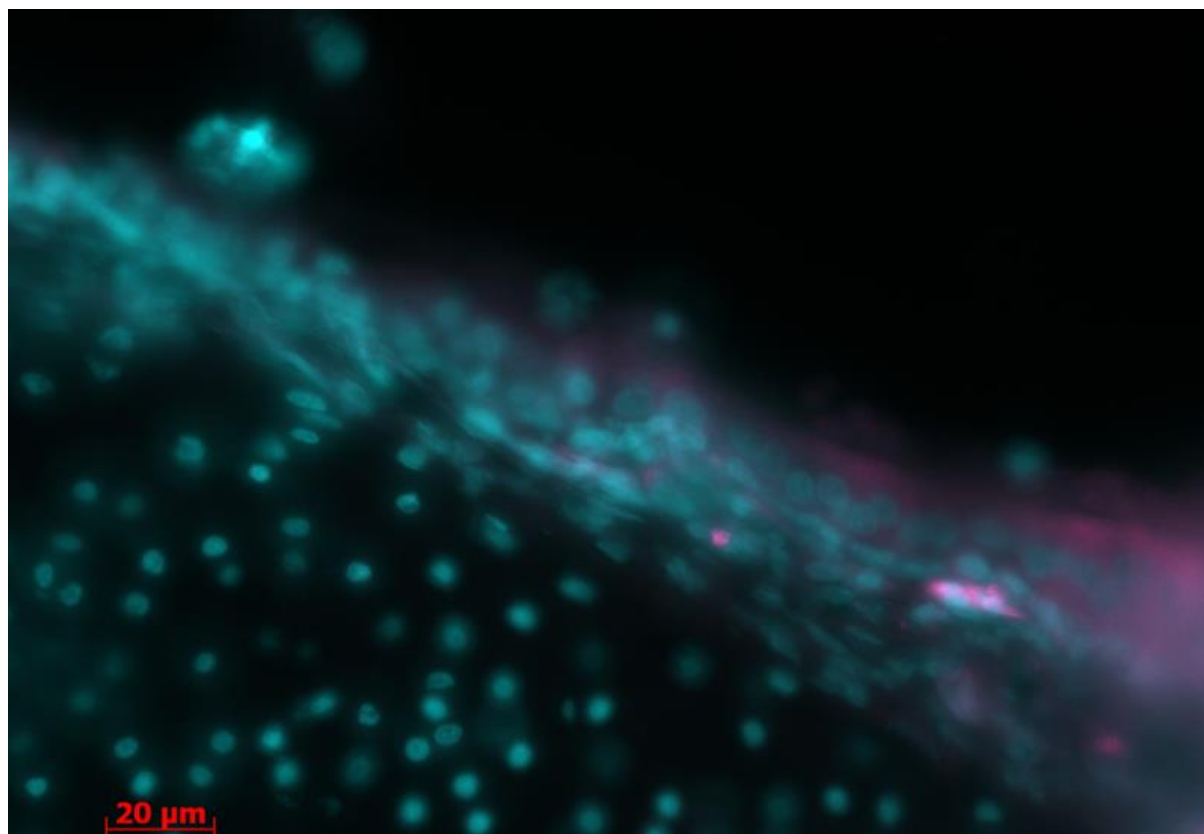


Рисунок 11 - Иммунофлуоресцентное окрашивание гистологического среза трахеи цыпленка -бройлера, привитого аэрозольно вирусом ИБК (штамм 4/91). Красная флуоресценция (антитела к вирусу ИБК меченные родамином), бирюзовая флуоресценция ядер клеток (окраска Hoechst 33258). Увеличение x900.

Как видно на рисунке 12, при аэрозольной терапии инфекционного бронхита кур, наблюдается локальная элиминация вирусного антигена, по месту попадания аэрозоля противовирусного препарата [6]. Результаты такого анализа демонстрируют вирулицидную активность в тканях легкого и, в то же время, обосновывают недостаточную эффективность аэрозолетерапии вирулицидными препаратами ИБК, ввиду того, что вирус вызывает поражения периферии легочных долек и интерстиция, куда аэрозоль проникает хуже.

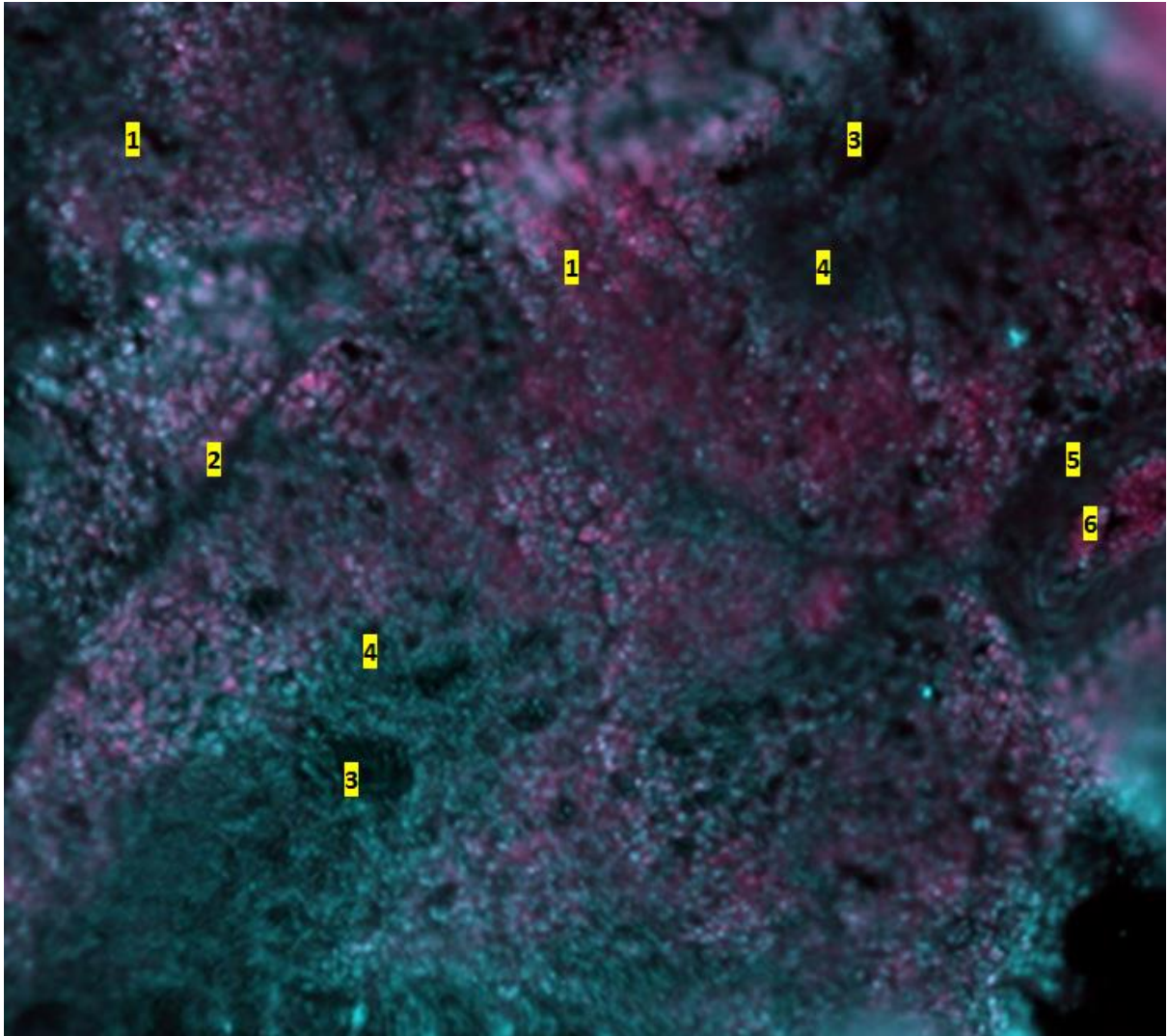


Рисунок 12. Иммунофлуоресцентное окрашивание гистологического среза легких цыпленка -бройлера, зараженного вирусом ИБК (штамм 4/91) после аэрозолетерапии противовирусным препаратом Тривирон (ООО “Трионис Вет” ) Красная флуоресценция (антитела к вирусу ИБК меченные родамином), бирюзовая флуоресценция ядер клеток (окраска Ноеchst 33258). Увеличение x50.

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

## 5. Анализ воспалительных и иммунологических реакций

Экспрессию генов интерлейкина 6, FcR, NFkB, каспазы 3, INF-γ оценивали методом дельта-дельта Ct относительно уровня экспрессии генов домашнего хозяйства glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) по протоколу указанному выше, с использованием праймеров 5`cgtgacccagcaaatcaa3` и 5` acttaccaccagccttctccat3` taqman зонда ROX-tggagtccactgggtgtcttcacc- ВHQ2. Использовали олигонуклеотидные последовательности праймеров (таблица 2).

Реакции проводили по следующей программе: 95°C горячий старт (7 минут), 39 циклов ( 95°C -15 сек, 64,5°C - 30 сек.)

Таблица 2 - ПЦР для оценки экспрессии генов

Название интерлейкина	Структуры праймеров	Ссылка на источник
IL-6	5`-aaatccctcctcgccaatct-3` 5`-ccctcacggtcttctccataaa-3`	[27]
Caspasa-3	5`-ccaccgagataccggactgt-3` 5`-aactgcttcgcttgctgtga-3`	[28]
INF-γ	5`-cactgacaagtcaaagccgc-3` 5`-accttcttcacgccatcagg-3`	[28]
FcR	5`-cactgacaagtcaaagccgc-3` 5`-accttcttcacgccatcagg-3`	[28]
NFkB	5`-tcaacgcaggacctaagacat-3` 5`-gcagatagccaagttcaggatg-3`	[28]

Данные обрабатывали методами вариационной и непараметрической статистики.

На рисунке 13 заметно, что препараты подавляют разрушение клеток в кишечнике опытных групп. Это не всегда может свидетельствовать о позитивном характере, т.к. в случае апоптоза происходит разрушение не только здоровых, но и зараженных клеток.

Наблюдается снижение количества активных макрофагов в кишечнике относительно контрольной группы. Количество вырабатываемого интерферона также находится ниже контроля, что свидетельствует о пониженной активности иммунной системы.

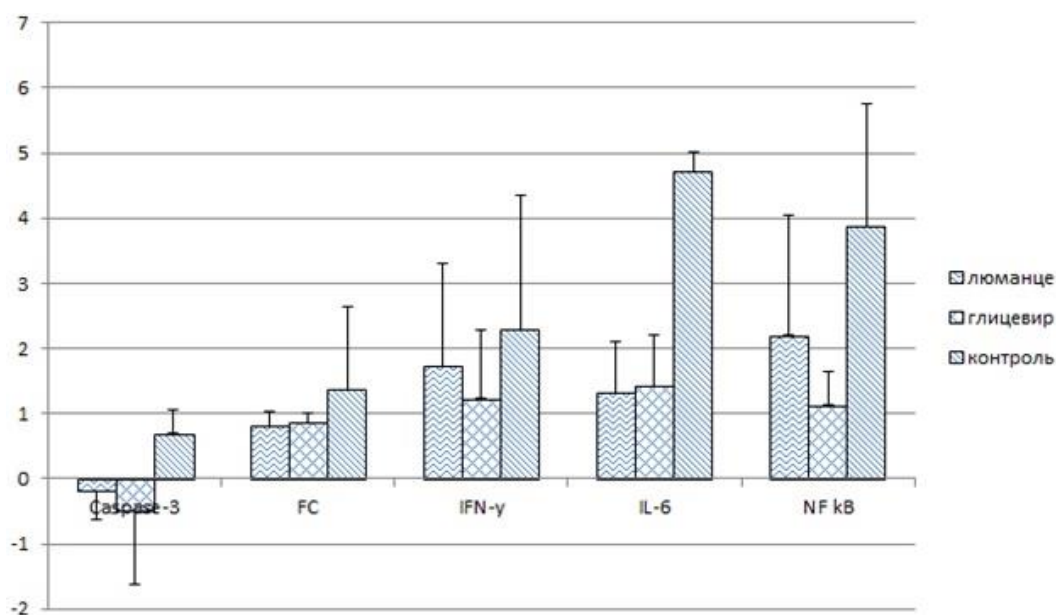


Рисунок 13 - Экспрессия генов в кишечнике у птицы контрольной группы и после терапии препаратами Люманце и Глицевир,  $\log_{10}(\text{ddCt})$  (относительно GAPDH).

Глицевир состоит из наночастиц, которые не всасываются, и обладает местным действием в кишечнике. Люманце в свою очередь может всасываться, т.к. содержит соли масляной кислоты, и помимо местного обладает ещё и системным действием. В кишечнике оба препарата снизили вирусную нагрузку.

Препарат Глицевир спровоцировал более интенсивную экспрессию генов участвующих в иммунном ответе и воспалении в легких, что характеризуется повышенным уровнем NFκB, IL-6, IFN-γ (большее количество Т-хелперов встречаются с вирусными частицами), Fc (большее количество макрофагов) и caspase-3 (клетки в легких разрушаются интенсивнее) (рис.14).



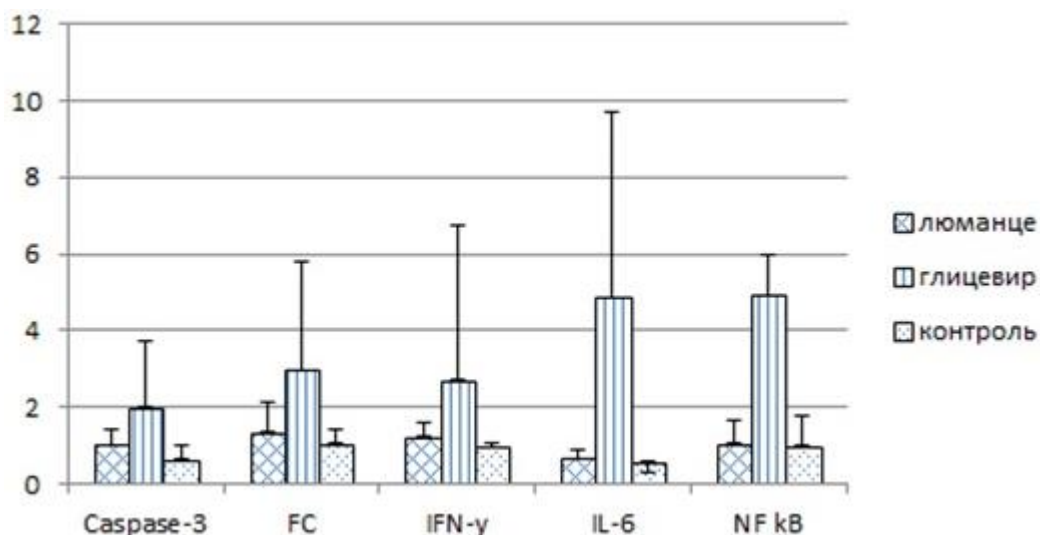


Рисунок 14 - Экспрессия генов в легких у птицы контрольной группы и после терапии препаратами Люманце и Глицевир,  $\log_{10}(\text{ddCt})$  (относительно GAPDH).

Препараты опытных групп подавляют разрушение клеток в кишечнике (рис. 13). Это не всегда может свидетельствовать о позитивном характере, т.к. в случае апоптоза происходит разрушение не только здоровых, но и зараженных клеток. Об этом также свидетельствует пониженная удельная доля Fc-фрагмента относительно контрольной группы. Fc-рецептор присутствует на макрофагах и отвечает за связывание антител с макрофагом. То есть, можно говорить о снижении количества активных макрофагов в кишечнике относительно контрольной группы. Каспазы играют важную роль в развитии и регуляции апоптоза и воспалительных процессов. В данном случае, поскольку сам коронавирус не влияет на разрушение клеток, происходит разрушение иммунными агентами, например, Т-киллерами.

При взаимодействии Т-хелпера с антигеном вырабатывается интерферон гамма ( $\text{IFN-}\gamma$ ), который является провоспалительным цитокином и активирует множество эффекторных клеток (Т-клетки, В-клетки и др.). В кишечнике количество вырабатываемого интерферона

снижено, это также свидетельствует о пониженной активности иммунной системы.

Интерлейкин-6 является провоспалительным цитокином, количество которого напрямую влияет на развитие цитокинового шторма. IL-6 создает в организме условия сверхнагрузки иммунной системы и возникает два пути развития – элиминация возбудителя в полной мере или элиминация самого зараженного. В момент, когда вирусные антигены встречается с толл-лайн рецепторами активируется NFκB, который в свою очередь является пусковым механизмом как для врожденного иммунного ответа (миграция макрофагов и тд), так и для адаптивного иммунитета (выработка антител, формирование Т-клеток). NFκB является наиболее ранним фактором и наиболее активно эксплуатируется при коронавирусных инфекциях. Это проявляется аномально длительной миграцией нейтрофилов, гранулоцитов в очаг воспаления, их активизацией, а также повышенной пролиферацией, в то время как при обычной инфекции имеется лишь короткий период, когда нейтрофилы осуществляют борьбу с первичным очагом заражения. Этот механизм может в последствие привести к лейкотриеновому шторму и в дальнейшем к цитокиновому.

В качестве основной версии рассматривается снижение активности иммунокомпетентных клеток в составе желудочно-кишечного тракта, в первую очередь – Treg лимфоцитов (активных продуцентов противовоспалительного цитокина IL10) в связи с подавлением инфекционного процесса локально, по месту действия Глицевира, т.е. в кишечнике. В пользу этого предположения свидетельствует подавление активности экспрессии гена IL-6, прямого антагониста провоспалительного цитокина IL10 и клеток продуцирующих данный интерлейкин. Так как вся кровь и лимфа из желудочно-кишечного тракта обязательно проходит через легкие, т.е. практически без разбавления, то и

вклад регуляторной активности иммунной системы кишечника в отношении иммунокомпетентных клеток легких должен быть существенным. Таким образом, можно спрогнозировать риск развития обострения инфекционного процесса в легких, на фоне локального снижения вирусной нагрузки в кишечнике, что требует комплексного подхода в терапии коронавирусных инфекций, включающего или противовирусные препараты системного действия или противовоспалительные средства.

## **6. Математическое моделирование активности вирулицидных препаратов с использованием программной платформы BioUML**

Моделирование инфекционного процесса проводили с использованием модульного подхода, реализованного в платформе BioUML. Модульная модель описывает накопление и деградацию вирусных частиц в назофарингеальной области, кишечнике и легких, включая процессы транспорта вирусных частиц по желудочно-кишечному тракту и кровеносной системе, что также влияет на динамику изменения вирусной нагрузки в этих компартментах организма.

Модель заражения и распределения вируса между тремя компартментами описывается системой, состоящей из шести дифференциальных уравнений с запаздывающими аргументами и 22 параметра (см формулы ниже):

$$\frac{df_{nf}}{dt} = - (1 - \epsilon * H_1) * \beta_{nf} * f_{nf} * V_{nf}$$

$$\begin{aligned} \frac{dV_{nf}}{dt} = & (1 - \epsilon * H_1) * (1 - \eta * H_2) * \gamma_{nf} * f_{nf} * V_{nf}(t - \tau_{r_{nf}}) - \frac{1}{1-\theta * H_3} * \delta_{nf} * V_{nf}(t - \tau_{d_{nf}}) - \\ & - K_{tr_{nf_i}} * V_{nf}(t - \tau_{t_{nf_i}}) - K_{tr_{nf_l}} * V_{nf}(t - \tau_{t_{nf_l}}) \end{aligned}$$

$$\frac{df_I}{dt} = - \beta_I * f_I * V_I$$

$$\begin{aligned} \frac{dV_I}{dt} = & K_{tr_{nf_i}} * V_{nf}(t - \tau_{t_{nf_i}}) + (1 - \epsilon * H_1) * (1 - \eta * H_2) * \gamma_I * f_I * V_I(t - \tau_{r_I}) - \\ & - \frac{1}{1-\theta * H_3} * \delta_I * V_I(t - \tau_{d_I}) - K_{tr_{I_L}} * V_I(t - \tau_{t_{I_L}}) \end{aligned}$$

$$\frac{df_L}{dt} = - \beta_L * f_L * V_L$$

$$\begin{aligned} \frac{dV_L}{dt} = & K_{tr_{nf_l}} * V_{nf}(t - \tau_{t_{nf_l}}) + K_{tr_{I_L}} * V_I(t - \tau_{t_{I_L}}) + (1 - \epsilon * H_1) * (1 - \eta * H_2) * \gamma_L * f_L * V_L(t - \tau_{r_L}) - \\ & - \frac{1}{1-\theta * H_3} * \delta_L * V_L(t - \tau_{d_L}) \end{aligned}$$

Где: nf, L, I - назофарингеальная область, легкие, кишечник, соответственно;

$\beta$  - константа скорости заражения вирусом в соответствующем компартменте;

$\gamma$  - константа максимального уровня репликации вируса в зависимости от компартмента;

$\delta$  - константа деградации инфицированных клеток (и вирусных частиц в этих клетках, соответственно);

f- доля чувствительных к заражению клеток;

V - количество вирусных частиц в соответствующем компартменте;

r,d,t - параметры временной задержки, связанных с процессами репликации и сборки вирусных частиц; деградацией инфицированных клеток и вирусных частиц, в том числе, в результате формирования клеточного и гуморального иммунных ответов; транспортом вирусных частиц из одного компартмента в другой (tnfI- транспорт из NP в Intestine; tnfL- транспорт из NP в Lung; tIL- - транспорт из Intestine в Lung), соответственно;

$\epsilon, \eta, \theta$  - константы эффективности внешних факторов, ограничивающих инфекционный процесс ( $0 < \epsilon, \eta, \theta < 1$ ):  $\epsilon=1$  соответствует полному подавлению

механизмов заражения клеток;  $\eta=1$  отражает 100% эффективность ингибирования репликации вируса и сборки вирусных частиц в зараженных клетках;  $\theta=1$  обозначает цитотоксическую активность эффекторных Т клеток/лекарственных средств.

H1, H2, H3 - ступенчатые функции Хевисайда, т.е.  $H(t)=0$ , если  $t < t'$ ; иначе  $H(t)=1$ ; где  $t'$  соответствует ингибированию заражения, репликации и сборки вирусных частиц, активация цитотоксичности зараженной клетки или комбинация этих факторов.

Программная платформа BioUML находится по адресу: <https://ict.biouml.org/>, где представлен открытый доступ к веб-серверу для расчета и анализа модульной модели: <https://ict.biouml.org/bioumlweb/>

В каталоге проектов в левой части рабочего окна можно найти трехкомpartmentную модель (Collaboration/Covid-19/Data/Virus Replication/SARS-CoV-2 infection and distribution\_compartmental model/) взаимодействия вируса SARS-CoV-2 с клетками соответствующего компартмента (кишечник, носоглотка, легкие) и смоделировать изменение вирусной нагрузки в каждом компартмента в зависимости от дозы заражения, эффективности разрушения вирусных частиц в каждом компартменте. К визуальному моделированию и численному анализу модели можно перейти по ссылке:

[https://ict.biouml.org/bioumlweb/#de=data/Collaboration/Covid-19/Data/Virus%20Replication/SARS-CoV-2%20infection%20and%20distribution\\_compartmental%20model/with%20total%20viral%20load/SARS-CoV-2%20infecton%20and%20ditribution\\_compartmental%20model](https://ict.biouml.org/bioumlweb/#de=data/Collaboration/Covid-19/Data/Virus%20Replication/SARS-CoV-2%20infection%20and%20distribution_compartmental%20model/with%20total%20viral%20load/SARS-CoV-2%20infecton%20and%20ditribution_compartmental%20model)

На начальном этапе работы следует открыть модуль верхнего уровня, интегрирующий все подмодели инфекционных процессов в отдельных органах и транспорт вирусных частиц между ними. В нижних разделах рабочего окна можно настраивать работу всей мультикомpartmentной модели. Например, во вкладке Simulation можно указать длительность численного расчета модели в днях (рис. 15).

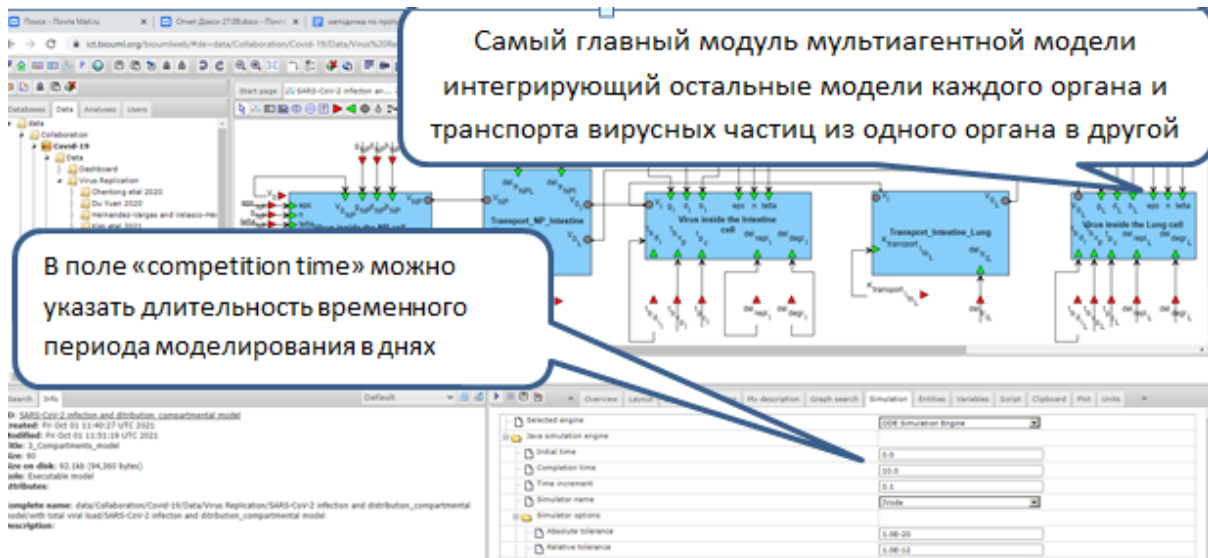


Рисунок 15 - Начальный этап работы по моделированию инфекционных процессов: вкладка Simulation.

Для численного анализа зависимости динамического поведения системы от путей заражения и накопления в соответствующем компартменте можно варьировать параметры “K\_transport\_NP\_to\_I”, “K\_transport\_NP\_to\_L”, “K\_transport\_I\_to\_L”, соответствующие транспорту вирусных частиц из носоглотки в кишечник, в легкие и из кишечника в легкие, в диапазоне от 0 до 0.9. Доза заражения вирусом может варьировать в широких пределах (от 10 до 10E+7 вирусных частиц); скорость гибели инфицированных клеток зависит также и от скорости естественного обновления клеток, поэтому, в кишечнике эта скорость выше, а в легких - ниже (рис. 16).

Title	Type	Initial value	Constant	Units	Comment
K_transport_I_to_L	Parameter	0.03	<input type="checkbox"/>		transport rate from intestini
K_transport_NP_to_I	Parameter	0.1	<input type="checkbox"/>		transport rate from NP to in
K_transport_NP_to_L	Parameter	0.03	<input type="checkbox"/>		transport rate from NP to L
V_0	Parameter	1000.0	<input type="checkbox"/>		Initial dose of the SARS-CoV
b_I	Parameter	5.2E-6	<input type="checkbox"/>		the rate constant for virus in
b_L	Parameter	5.2E-5	<input type="checkbox"/>		the rate constant for virus in
b_NP	Parameter	5.2E-6	<input type="checkbox"/>		the rate constant for virus in
d_I	Parameter	0.4	<input type="checkbox"/>		the death rate of infected ce
d_L	Parameter	0.18	<input type="checkbox"/>		the death rate of infected ce
d_NP	Parameter	0.2	<input type="checkbox"/>		the death rate of infected ce
del_degr_I	Parameter	0.1	<input type="checkbox"/>		the delay constant for virus

Рисунок 16 - Настройка параметров инфекционного процесса: “K\_transport”, транспорта вирусных частиц из носоглотки в кишечник, в легкие и из кишечника в легкие;

“V” - дозы заражения;

“b” - константы скорости репликации вируса в разных органах,

“d” - скорости гибели инфицированных клеток .

Параметр  $\epsilon$  отражает снижение эффективности заражения новых клеток, в том числе под действием вирулицидных препаратов, антител: 1 - соответствует 100% эффективности инактивации вирусных частиц или предотвращения заражения клеток. Варьируя значение этого показателя отдельно для носоглотки, легких и кишечника, можно учесть особенности всасывания и распределения действующего вещества в организме. Параметр “время блокирования инфекции *de novo*”, значение которого изменяется в днях, позволяет указать время начала терапии с учетом динамики распределения в разных компартментах или изменения терапии для разных компартментов организма, путей введения лекарственного средства (рис. 17).



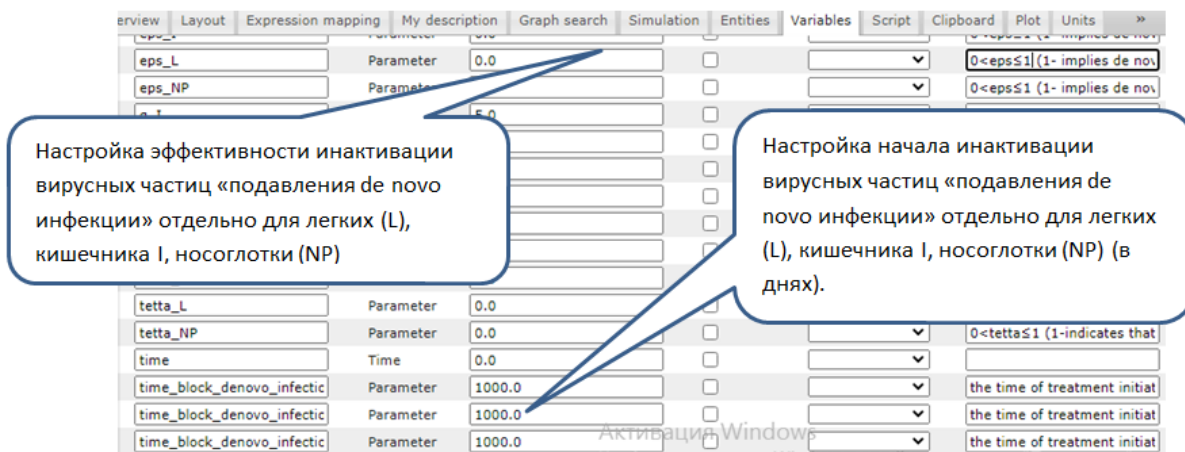


Рисунок 17 - Настройка параметров “активности вирулицидных препаратов” (“Eps” и “time block de novo infection”)

После изменения настроек компьютерного эксперимента по оценке влияния вирулицидного препарата в конкретном компартменте (или нескольких компартментах) во вкладке “Simulation” необходимо нажать на кнопку запуска численного расчета модели (рис. 18).

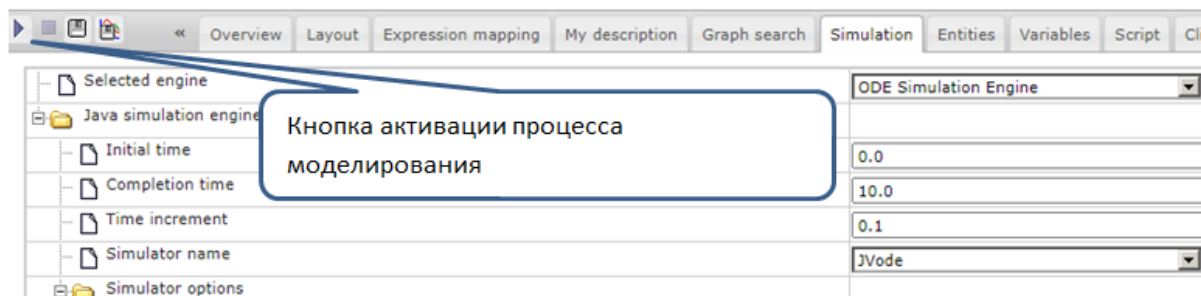


Рисунок 18 - Запуск численного расчета модели в соответствующей вкладке “Simulation”.

Моделирование санации носоглотки и кишечника вирулицидными препаратами следует проводить путем изменения значений таких параметров модели, как  $\epsilon$  ( $0 < \text{eps} \leq 1$  (значение параметра, равное 1, предполагает 100% эффективность ингибирования *de novo* инфекции в соответствующем компартменте), и время активации данного параметра. Моделировали лечение спустя сутки после заражения разными дозами вируса (100-100000 вирусных частиц).

В приведенном ниже примере, моделирование санации вирулицидными препаратами желудочно-кишечного тракта сопровождалось снижением вирусной нагрузки в 5,75 раз в кишечнике и в 1,12 раз в легких. Изменения были статистически значимыми. Наибольшего эффекта по снижению вирусной нагрузки в легких удавалось добиться при синхронной санации как кишечника, так и носоглотки (рис. 19).

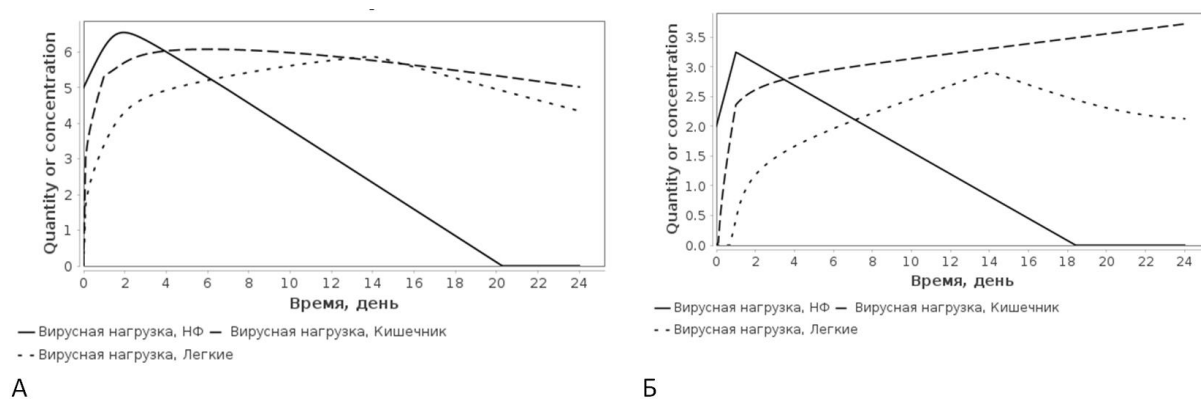


Рисунок 19 - Результаты численного эксперимента по оценки эффективности санации только кишечника (А) и параллельной санации кишечника и носоглотки (Б) с эффективностью 90% вирулицидного препарата.

Примечание: В расчетах используются следующие численные значения: доза заражения эквивалентна 100 тыс. вирусных частиц; коэффициент транспорта вируса для носоглотка-лёгкие и кишечник – лёгкие равен 0,005, а для носоглотка –кишечник - 0,1; константа скорости вирусной инфекции  $5.2E-7$ ; коэффициент подавления вирусной инфекции в кишечнике 0,9; начало подавления вирусной инфекции в кишечнике – 1 сутки.

Как следует из результатов моделирования, носоглотка и кишечник, как зоны первичного накопления вирусного агента, могут играть важную роль в транспорте вирусных частиц в легкие, поэтому санация слизистых оболочек вирулицидными препаратами может иметь не меньшую роль в подавлении повреждений легких, чем снижение интенсивности репликации вирусных частиц в самих легких.

Более того, численный анализ и запуск расчетов модели доступен через удобный интерфейс Jupyter Notebook, доступный в gitlab проекте: <https://gitlab.sirius-web.org/diploms/covid19-compartments>.

## **7. Тактика терапии и профилактики кур вирулицидными препаратами**

### **7.1. Техника аэрозолетерапии Тривироном и Экоцидом**

Для эффективного применения препарата Тривирон необходимо учитывать начальную фазу эпизоотологического процесса, когда вирусные частицы попадают в организм птицы именно воздушно-капельным путем. Рекомендуется применять препарат Тривирон в период массового прироста инфицирования птицы. Во время активного инфекционного процесса можно рассчитывать на более эффективное всасывание данного препарата в легких для терапии системной вирусной инфекции.

Расход подготовленного для аэрозольного распыления рабочего раствора препарата “Тривирон” (ООО “Трионис Вет”) (рабочий раствор препарата Тривирон – это препарат Тривирон, разведенный с водой в 100 раз) составил 3 мл/м<sup>3</sup>. Генерацию аэрозоля рекомендуется применять с помощью специального оборудования. Рекомендуемый диаметр капли – 10 мкм [6].

На 1 обработку (1 раз в сутки): на птичник объемом 12 000 м<sup>3</sup> расходуется 360 мл, на птичник объемом 18 000 м<sup>3</sup> - 540 мл концентрированного препарата. Разводить препарат 1:100 с дист.водой для получения рабочего раствора, тонкой струйкой вливая в воду при постоянном помешивании. Состав 1 литра рабочего раствора препарата Тривирон для распыления: к 890-900 мл дистиллированной воды тонкой струей добавить 10 мл препарата Тривирон (конц.) при постоянном помешивании, добавить 100 мл глицерина, развести в полученном растворе 6 г натрия гидрокарбоната (сода пищевая). Полученный раствор не должен иметь рН ниже 4. Пример расчета на птичник объемом 12000 м<sup>3</sup>: Тривирона (из флакона) - 360 мл, воды дист - 36 л, глицерин - 3 л, сода - 220 гр. на 18 000 м<sup>3</sup>: Тривирона (из флакона) - 540 мл, воды дист - 54 л,

глицерин - 5,4 л, сода - 540 гр. 4) Экспозиция – 40-50 минут. Размер капли аэрозоля – 10 мкм. Курс применения препарата – 5 дней.

Аэрозольное применение противовирусного препарата Тривирон повышало выживаемость цыплят при респираторной форме инфекционного бронхита кур (на 28% при экспозиции более 10 мин.) и снижало возникновение пневмоний (на 60% при экспозиции 40 и более мин.) в эксперимента [6].

В клинической практике, в основном, фиксировались успехи применения аэрозольного применения Тривирона, в присутствии птицы, при вспышках болезни Ньюкасла, Гриппа птиц (высокой протективной активности аэрозольное применение Тривирона при инфекционном бронхите кур не наблюдалось, по причине преимущественно кишечной локализации данного вируса).

Аэрозолетерапия и профилактика эоцидом (КРКА ФАРМА) подразумевает распыление 0,5-1% раствора в дозировки до 10 мл на 1 м<sup>3</sup>. Основной акцент делается не на санацию воздуха а на санацию носоглотки с целью снижения как вирусывыделения так и диссеминации вирусных агентов из мест первичного накопления и репродукции. При болезни Ньюкасла имелся опыт распыления с интервалом 1 сутки с 31 дня до убоя (бройлеры), для ИБК, очевидно использование более ранних сроков аэрозолетерапии в период серологического окна (когда снижается уровень трасовариальных антител).

## **7.2. Выпаивание вирулицидных препаратов**

### **Схемы применения вирулицидных препаратов при инфекционном бронхите кур у цыплят-бройлеров**

Вирулицидные препараты целесообразно применять в период роста инцидентности вирусной патологии: в случае с ИБК об этом можно судить по данным патологоанатомического мониторинга (появление пробок в

бронхах, воспалительных изменений в мозговой зоне тимуса), резкому росту заболеваемости коли-инфекцией в сочетании с выявлением ОТ-ПЦР позитивных на IBV проб в легких и кишечнике в период «серологического» окна – когда трансовариальные антитела закончились, а поствакцинальные еще не появились.

Можно рассмотреть следующие варианты:

А) Препарат Арговит С [35] 1% выпаивается в дозе в дозе 0,325 мг/кг живой массы утром и вечером (суточная доза на 1 кг живой массы 0,75 мг).

Б) Препарат Тривирон (0,03%) в дозе 1,5 мл на 1 кг живой массы, двукратно (утром и вечером).

В) Экоцид С 0,05%, т.е. 500 грамм на тонну воды.

Рекомендуемый курс этих препаратов 5 суток. После перед использованием живых вакцин обязательно промыть систему водопоения. Не рекомендуется выпаивать в день вакцинации живыми вакцинами через выпойку и в течение 3-х суток после.

В клинической практике наблюдались хорошие эффекты при выпаивании вышеперечисленных препаратов связанных с энтеротропными вирусами в т.ч. вызывающими мальабсорбцию (астровирусный нефрит, на фазе кишечной локализации вируса в первые 10-15 дней жизни - наночастицы серебра, флавивирусная инфекция, в 6-9, 13-15 дней жизни - Тривирон [2], экоцид). Помимо факта улучшения привесов, эффект вирулицидных препаратов в отношении энтеротропных вирусов можно отслеживать на основании биохимического мониторинга мальабсорбции (анализ уровня магния и/или цинка в крови с интервалом 5 суток).

## **8. Применение препаратов с преимущественно противовоспалительной активностью**

В последние годы, антибиотикам тетрациклинового ряда и макролидным антибиотикам начали уделять внимание в качестве средств с дополнительной противовоспалительной активностью. Показано наличие таких эффектов у препаратов доксициклина (например, доксатиб). Являясь ингибитором металлопротеазы нейтрофилов, доксициклин способен подавлять миграцию нейтрофилом через стенку сосудов, что в свою очередь предотвращает развитие васкулитов, активацию воспалительных каскадов

Если провести аналогию патогенеза вируса ИБК с SARS CoV2, то закономерно считать действие доксициклина успешным для применения во время коронавирусной инфекции и у птиц в том числе. Доксициклин включен в РКИ по ковиду, в отличие от большинства антибиотиков, и одним из важных побочных эффектов является предотвращение повреждения кровеносных сосудов. Доксициклин назначают при ковиде в качестве иммуномодулятора и противовоспалительного средства и уже во вторую очередь рассматривают, как антибиотик. При его применении удается дополнительно воздействовать на микоплазмы и хламидии, при этом почти не затрагивая лактобактерии и, как следствие, не провоцируя дисбиоз кишечника [32, 36].

Доксициклин имеет несколько потенциальных механизмов действия, с помощью которых он может предотвращать или ослаблять последствия инфекции COVID-19. Хорошо известно, что доксициклин ингибирует металлопротеиназы (ММП), в частности ММП-9, который, вероятно, необходим для первоначального проникновения вируса в клетку. Доксициклин ингибирует интерлейкин ИЛ-6, причем как ИЛ-6, так и ММП являются ключевыми регуляторами «цитокинового шторма», часто



связанного с тяжелым вирусным пневмонитом. Доксациклин - это признанный ионофор, помогающий транспортировать цинк внутриклеточно, при этом *in vitro* показано, что повышенные клеточные концентрации цинка подавляют репликацию коронавируса. Доксациклин ингибирует ядерный фактор (NF) -κB, что может снизить риск проникновения вируса из-за прямого ингибирования рецептора на поверхности клетки DPP4 и уменьшить гиперактивный иммунный ответ после инфекции. Было обнаружено, что неантимикробный доксициклин в низких дозах *in vivo* подавляет экспрессию CD147 / EMMPRIN, что может быть необходимо для проникновения SARS-CoV-2 в Т-лимфоциты. Структурный анализ показывает, что доксициклин может ингибировать папаин-подобную протеиназу (PLpro) и 3C-подобную основную протеазу (3CLpro), вирусные белки, которые необходимы как для репликации вируса, так и для его жизненного цикла [33].

Как следует из наших исследований, Доксатиб (доксициклин) характеризовался способностью снижать уровень провоспалительных цитокинов и транскрипционных факторов, таких как NFκB, IL-6 и ограничивать провоспалительную активность макрофагов снижая их миграцию /активацию в очаге инфицирования (рис. 20), без существенного влияния на вирусную нагрузку вирусом ИБК.

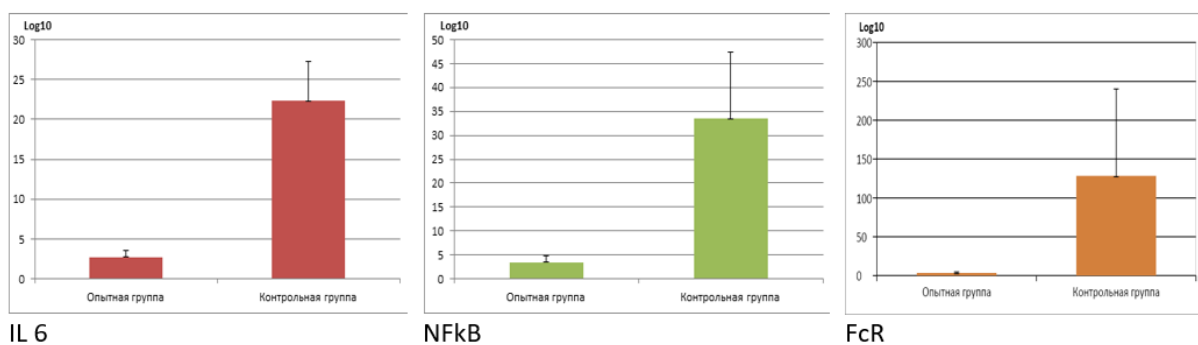


Рисунок 20 - Экспрессия генов IL-6, NFκB, FcR в кишечнике у птицы, получавшей доксатиб, и контрольной группы, log<sub>10</sub>(ddCt) (относительно GAPDH)

В результате применения препарата Люманце (композиция из солей масляной кислоты, обладающей выраженным противовоспалительным действием и эфирных масел обладающих иммуномодулирующим действием) мы наблюдали непротиворечивую картину снижения интенсивности воспалительных реакций в легких и тимусе при заражении вирусом ИБК, а также снижения инцидентности пневмоний и тимуситов в опытной группе, в сочетании с меньшей вирусной нагрузкой у птицы получавшей Люманце и, закономерно, меньшей или замедленной продукцией антител. Масса легких существенно возрастает при развитии воспалительного процесса. Легкие в группе, получавшей препарат Люманце, были, статистически значимо, на 0,105 грамм меньше ( $p=0,0168$ ), чем в контрольной группе (рис. 21). Что подтверждало снижение интенсивности воспалительных процессов в группе птицы получавшей препарат в сравнении с контролем.

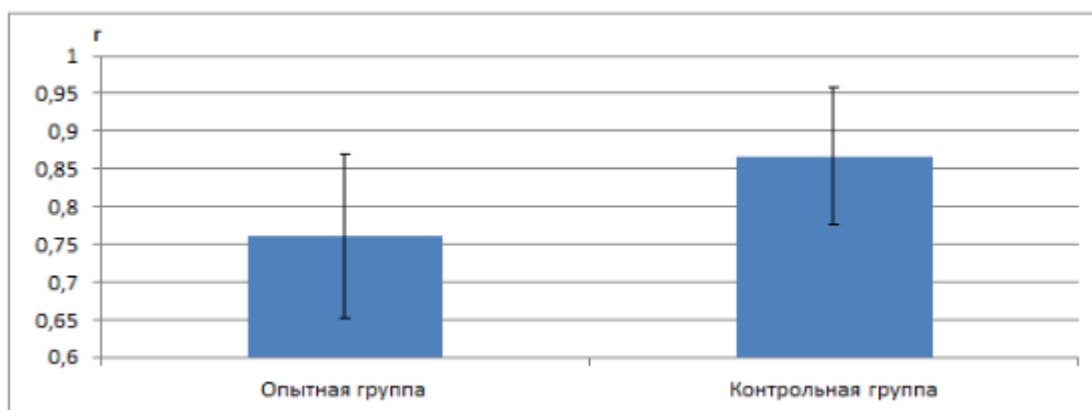


Рисунок 21 - Масса легких  $M \pm SD$ , г

Таким образом, применение препаратов подобного типа (люманце, соли масляных кислот) наиболее целесообразно в период роста манифестации вирусных пневмоний, т.е. после 20 дневного возраста у цыплят-бройлеров, что позволит снизить долгосрочное (при ИБК) поражение респираторной системы от вирусных пневмоний и вторичных коли-инфекций на фоне данных патологий. Также рекомендуется

применение препаратов этого класса, на стартовом рационе, до введения вакцин.

Активность кормовой добавки Церебра позволяла снизить повреждения воспалительного характера, затрагивающие легкие, но без риска подавления репликации вакцинного штамма ИБК в кишечнике и без риска нарушения формирования поствакцинального иммунитета. Более высокая активность макрофагов в кишечнике, заставляет рассматривать данную кормовую добавку в качестве фактора способствующего формированию поствакцинального иммунитета при использовании вакцины против ИБК выпойкой.

## Заключение

Изучение средств противовирусной терапии в отношении птицы имеет двойное значение, во-первых, в связи с пандемией COVID-19 цыплята-бройлеры и вирус ИБК стали очень дешевой и безопасной моделью, позволяющей проводить массовый скрининг препаратов с противовирусной и противовоспалительной активностью на организменном уровне, во-вторых, препараты с вирулицидной и противовоспалительной активностью приобретают большое значение в птицеводстве в связи с ограничением применения антибиотиков, появлением новых эмерджентных вирусных инфекций и накоплением вариантных штаммов вакцинопрофилактируемых инфекций. В этом контексте, вирулицидные препараты активные в отношении вирусных частиц в пределах слизистых оболочек (Тривирон, Арговит С, Экоцид) и

противовоспалительные препараты Доксатиб, Люманце становятся перспективными средствами минимизации экономических убытков от широкого спектра вирусных инфекций, а их функциональные аналоги могут быть перспективны для терапии COVID-19 у людей.

## Список использованной литературы

1. Афонюшкин В.Н. Возможный патогенез коронавирусных инфекций на примере ИБК в качестве модели инфекции, ассоциированной с COVID-19 у людей / В.Н. Афонюшкин // БИО. – 2020. – №4. – С.4-6.
2. Афонюшкин В.Н. Влияние флавивирусной инфекции на продуктивность бройлеров / В.Н. Афонюшкин, Е.И. Рябчикова, В.Н.Сильников и др.//Ветеринария. – 2014. № 8. С. 15-19.
3. Афонюшкин, В.Н. Альтернативный способ профилактики и лечения РРСС / В.Н. Афонюшкин, А.В. Литвинов // Свиноводство. – 2017. – №1. – С.56 – 58.
4. Афонюшкин В.Н. Изучение противофаговой активности дезинфектантов в качестве фактора подавления горизонтальной передачи генов / В.Н. Афонюшкин, В.С. Черепушкина, О.П. Татарчук, О. А. Фролова // Вестник КрасГАУ. – 2020. – № 4 (157). – С. 88-96.
5. Афонюшкин В.Н. Влияние дезинфицирующих средств на основе персульфата калия, перекиси водорода, глутаральдегида и четвертичных аммонийных соединений на генетический материал бактериальных патогенов, специфичных для мясоперерабатывающей промышленности / В.Н. Афонюшкин, К.А. Табанюхов, В.С. Черепушкина и др. // Теория и практика переработки мяса. – 2016. Т. 1. – № 1. – С. 54-61.
6. Афонюшкин В.Н. Изучение противовирусного действия препарата Тривирон на возбудителя инфекционного бронхита кур / В.Н. Афонюшкин, А.Н. Ширшова, Д.В. Шамовская и др. // Ветеринария. – 2018. – № 7. – С. 24-28.
7. Burakova, E. Structure–activity relationships in new polycationic molecules based on two 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octanes as artificial

- ribonucleases / E. Burakova, N. Kovalev, M. Zenkova et al. // *Bioorganic Chemistry*.– 2014.– №57.– P.127 – 131.
8. Baram-Pinto, D. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate / D. Baram-Pinto, S. Shukla, N. Perkas, A. Gedanken, R. Sarid // *Bioconjug. Chem.*– 2009.– №20.– P.1497–1502. doi: 10.1021/bc900215b.
  9. Baram-Pinto, D. Inhibition of HSV-1 attachment, entry, and cell-to-cell spread by functionalized multivalent gold nanoparticles / D. Baram-Pinto, S. Shukla, A. Gedanken, R. Sarid // *Small*.– 2010.– №6.– P.1044–1050. doi: 10.1002/sml.200902384.
  10. Chin A. , Julie Chu, Mahen Perera, Kenrie Hui, Hui-Ling Yen, Michael Chan, Malik Peiris, Leo Poon. Stability of SARS-Co 2 in different environmental conditions. *The Lancet Microbe: Medical journal*. - Гонконгский университет: Elsevier, 2020. – 2 April (vol.20, iss.4) – ISSN 2666-5247
  11. Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.*– 2005.– №34.– P.439 – 448.
  12. Chambers, J.L., Christoph G.G., Krieger M., Kay L., Stroud R.M. Silver ion inhibition of serine proteases: Crystallographic study of silver-trypsin *Biochemical and Biophysical Research Communications*.–1974.– №59(1).– P.70-74 [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(74\)80175-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(74)80175-0)
  13. Balagna C. , Sergio Perero, Elena Percivalle, Edoardo Vecchio Nepita, Monica Ferraris Virucidal effect against coronavirus SARS-CoV-2 of a silver nanocluster/silica composite sputtered coating//*Open Ceramics*.– 2020.– №1 <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2020.100006>
  14. Elechiguerra J.L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H., Yacaman M.J. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnol.*– 2005.– №29.– P.3–6.

15. Simmons, G., Dhaval N Gosalia, Andrew J Rennekamp, Jacqueline D Reeves, Scott L Diamond, Paul Bates Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry Proc Natl Acad Sci USA.–2005 Aug 16;102(33):11876-81 DOI: 10.1073/pnas.0505577102.
16. Kawase, M. Shirato, K. van der Hoek, L. Taguchi, F. Matsuyama, S. Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. J Virol 86, 6537-6545 (2012).
17. Puelles, V. G. et al., Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. N Engl J Med, 2020.
18. Lara H.H., Ayala-Nuñez N.V., Ixtepan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. J. Nanobiotechnol.–2010.– №8.– P.1–10. doi: 10.1186/1477-3155-8-1.
19. Lara H.H., Ixtepan-Turrent L., Garza-Treviño E.N., Rodriguez-Padilla C. PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. J. Nanobiotechnol.– 2010.– №8.–P.15–25. doi: 10.1186/1477-3155-8-15.
20. Lucio B., Fabricant J. Tissue tropism of three cloacal isolates and Massachusetts strain of infectious bronchitis virus. Avian Dis.–1990.– №34.–P.865 – 870.
21. Mahmood, M. S. Siddique, M. Hussain, I. and A. Khan Trypsin-induced hemagglutination assay for the detection of infectious bronchitis virus // Pakistan Vet. J.–2004.–№24(2).– P.54.
22. Rogers J.V., Parkinson C.V., Choi Y.W., Speshock J.L., Hussain S.M. A preliminary assessment of silver nanoparticles inhibition of monkeypox virus plaque formation. Nanoscale Res. Lett.– 2008.–№3.– P.129–133. doi: 10.1007/s11671-008-9128-2.

- 23.Sun L., Singh A.K., Vig K., Pillai S., Shreekumar R., Singh S.R. Silver nanoparticles inhibit replication of respiratory syncytial virus. *J. Biomed. Biotechnol.*– 2008.– №4.– P.149–158.
- 24.Santos, J. et al., Repurposing Therapeutics for Potential Treatment of SARS-CoV-2: A Review. *Viruses* 12, (2020).
- 25.Xiao, F. et al. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* 158, 1831–1833.e3 (2020).
- 26.Xia, S., Lan, Q., Su, S., Wang, X., Xu, W., Liu, Z., Zhu, Y., Wang, Q., Lu, L., & Jiang, S. (2020). The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0184-0>
- 27.Cheng P. Baicalin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Liver Inflammation in Chicken by Suppressing TLR4-Mediated NF-κB Pathway / P. Cheng, T. Wang, W. Li // *Front. Pharmacol.* 2017, pp. 547. [Doi.org/10.3389/fphar.2017.00547](https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00547).
- 28.Sun X. Analysis of chicken macrophage functions and gene expressions following infectious bronchitis The cytokine network virus M41 infection / X. Sun, Z. Wang, Ch. Shao, J. Yu // *Veterinary research.* 2021, no. 52(1), pp.14. [Doi: 10.1186/s13567-021-00896-z](https://doi.org/10.1186/s13567-021-00896-z).
- 29.Поздеев О.К. Бактериофаги (строение, свойства, практическое применение). Учебно-методическое пособие для студентов [Текст] / Под ред. Поздеев О.К., Федорова Е.Р., Валеева Ю. В. – Казань: КГМУ, 2012. – 50 с.
- 30.Литусов Н.В. Бактериофаги. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург: Изд-во УГМА. – 2012. – 38 с.
- 31.Arévalo, J.M. Guía del grupo de trabajo sobredesinfectantes y antisépticos / J.M. Arévalo, J.L. Arribas, L. Calbo, M.J. Hernández, M. Lizán, R. Herruzco // *Medicina Preventiva.*– 1998.– №4.– P.– 38-43.



32. Mathieu Gendrot, Julien Andreani, Priscilla Jardot, Sébastien Hutter and etc. In Vitro Antiviral Activity of Doxycycline against SARS-CoV-2 / *Molecules*. 2020 Nov; 25(21): 5064. Published online 2020 Oct 31. doi: 10.3390/molecules25215064, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7663271/>
33. Paul A. Yates, Steven A. Newman, Lauren J. Oshry Doxycycline treatment of high-risk COVID-19-positive patients with comorbid pulmonary disease / <https://doi.org/10.1177/1753466620951053>.
34. Silnikov, V., E. Plotnikov, and V. Plotnikov. "PHARMACOKINETIC STUDIES OF NEW SILVER-BASED COMPLEX". *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, no. 6, June 2015, pp. 41-43, <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/5396>.
35. Nefedova, E.; Koptev, V.; Bobikova, A.S.; Cherepushkina, V.; Mironova, T.; Afonyushkin, V.; Shkil, N.; Donchenko, N.; Kozlova, Y.; Sigareva, N.; Davidova, N.; Bogdanchikova, N.; Pestryakov, A.; Toledano-Magaña, Y. The Infectious Bronchitis Coronavirus Pneumonia Model Presenting a Novel Insight for the SARS-CoV-2 Dissemination Route. *Vet. Sci.* 2021, 8, 239. <https://doi.org/10.3390/vetsci8100239>
36. Alexandre E. Malek, Bruno P. Granwehr, and Dimitrios P. Kontoyiannis Doxycycline as a potential partner of COVID-19 therapies / *IDCases*. 2020; 21: e00864. Published online 2020 Jun 6. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e00864, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7298522/>