

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ
ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ПОЛУПАН ІВАН МИКОЛАЙОВИЧ

УДК 636.09:612.017:616.98:57.083:591.531.2(477)

**ДИСЕРТАЦІЯ
ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ ТВАРИН**

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та
імунологія» (ветеринарні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук

Дисертація містить результати власних досліджень.

Використання ідей, результатів і текстів інших авторів
мають посилання на відповідне джерело

І.М. Полупан

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Полупан І.М. Тема: «Епізоотологія та лабораторна діагностика сказу тварин» – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина». Інститут ветеринарної медицини НААН. Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2024.

Дисертаційну роботу присвячено вивченню просторово-часових особливостей прояву епізоотії сказу в Україні, теоретично-експериментальному обґрунтуванню протиепізоотичних антирабічних заходів, розробці методів і засобів лабораторної діагностики сказу тварин.

Епізоотологічні дослідження прояву сказу в Україні на початку XXI століття, з використанням описово-статистичного методу, показали, що сказ в Україні є ендемічним захворюванням, яке широко поширене в усіх природно-географічних зонах й адміністративних одиницях нашої держави. Встановлено, що резервуаром збудника сказу на території України – є лисиця звичайна, на частку якої припадає більше 36 % лабораторно виявлених випадків. Серед свійських тварин найбільше реєструється захворювання в собак (19,3 %) і котів (25,3 %), що становлять найбільшу загрозу для людей, так як володіють найвищим епідемічним потенціалом.

Характеристика прояву сказу, з використанням інструментів геоінформаційних систем, дала змогу встановити просторово-часові особливості епізоотії сказу в Україні та виявити статистично-достовірні угруповання випадків захворювання тварин на сказ. Зокрема, в центральних і південно-західних районах Чернігівської області в 2011-2016 рр. виявлено 18 просторово-часових кластерів із трендом «спорадичний». Території цих кластерів є стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу. Виявлено 3 кластери із трендом «новий», які були виявлені на південному сході області, завдяки чому сформоване припущення про опосередкований пресингу на

епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області кампаніями з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин, що були проведені в Полтавській та Сумській областях в 2006-2015 рр.

Виявлено на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр. три просторово-часових скупчення (кластерів) випадків захворювання тварин на сказ, які включали випадки як серед диких, так і свійських тварин, що свідчить про можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Отримані результати підтверджують, що статистично значущі скупчення випадків сказу серед лисиць передували з часом скупченням випадків сказу серед усіх інших видів тварин. Дослідження ендемічних спалахів сказу в західних областях України (Волинська, Львівська та Закарпатська області) з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній. Включення собак і котів до ендемічних вогнищ показало недостатність існуючої системи профілактики сказу серед свійських тварин.

Просторово-часовим аналізом поширення сказу в Україні протягом 2018-2022 рр. встановлено у Вінницькій, Черкаській і Хмельницькій областях 23 гарячі кластери, в яких 90 % двомісячних часових інтервалів були статистично значущими гарячими точками. Також виявлено 954 холодних кластерів, на території яких зустрічалися випадки сказу, однак в 90 % двомісячних часових інтервалів вони були статистично значущими холодними точками.

Відсутність холодних і гарячих кластерів виявлено лише в трьох областях: Волинська, Закарпатська та Івано-Франківська. На території цих областей були тільки кластери без визначеного тренду.

Встановлено відмінність між кількістю гарячих і холодних кластерів випадків сказу в Україні протягом 2018-2022 рр. Ні рівні часового проміжку листопада-грудня 2020 року кількість кластерів була на одному рівні (476 гарячих кластери проти 472 холодних). В подальшому, до кінця 2022 року відмічали зменшення кількості гарячих кластерів і збільшення кількості

холодних, що вказує на достовірне поступове зменшення прояву епізоотії сказу в Україні (станом на грудень 2022 р.) внаслідок проведення в Україні кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Однак, аналіз ефективності кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу свідчить про їхню недостатню ефективність. Для досягнення кращого ефекту пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу потрібно було проводити двічі на рік: весною і восени. Включення свійських м'ясоїдних тварин (собак і котів) також вказує про наявність проблем в існуючій системі профілактики сказу серед цих тварин.

Проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних, свійських і сільськогосподарських тварин. Була встановлена дуже висока ймовірність поширення сказу серед популяції диких м'ясоїдних тварин саме від невакцинованих диких м'ясоїдних тварин; було виявлено дуже високу ймовірність неефективності проведення парентеральної вакцинації свійських тварин; визначено високу ймовірність не проведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин. Виходячи з результатів оцінки ризиків, підготовлено звіти та зроблено рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками.

З метою удосконалення проведення кампаній пероральної вакцинації лисиць проти сказу розроблені методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», в яких враховано положення відповідного керівництва ЄС, а також сучасні аспекти здійснення повітряного розподілу принад з вакциною і методику фіксування точної локалізації приладами з GPS, що підвищить ефективність пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Наступним етапом було проведення порівняльних досліджень ефективності різних антирабічних вакцин, що призначені для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Встановлено наявність антитіл до вірусу сказу в 75-96 % лисиць, що свідчить про високу антигенну активність обох антирабічних препаратів.

Відповідно до критеріїв, що визначені методичними рекомендаціями, проведено епізоотичний нагляд за зоною вакцинації, дослідження зубів лисиць на наявність тетрациклінового маркеру та визначення напруженості антирабічного імунітету в сироватках крові лисиць, що були впольовані в зоні пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Так, нагляд за напруженістю епізоотичної ситуації зі сказу виявив тенденцію до зменшення превалентності сказу тварин в Україні. Показник наявності біомаркеру тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин був в межах 46,7–50,1 %. а захисний рівень антитіл до вірусу сказу в сироватках крові виявлений в межах 15,1–37,7 %.

Отримано високоактивний антиген вірусу сказу вакцинного штаму Щолково-51К з титром інфекційної активності вірусу $6,8 \text{ MLD}_{50}/\text{cm}^3$. З використанням інактивованого β -пропіолактоном очищеного антигену проведені дослідження і розроблено схему гіперімунізації тварин для отримання гіперімунної антирабічної сироватки. Схема полягала у чотирикратному (0 та 21-у, 35-у та 49-у добу) комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в п'ять точок по $0,1 \text{ cm}^3$ і внутрішньом'язово в одну точку $0,5 \text{ cm}^3$ антигену вірусу сказу і препарату «Фоспреніл» (за добу до першої імунізації та на 21-у та 49-у добу). Використання такої схеми дало змогу отримати сироватку крові з високими титрами антитіл до вірусу сказу – $185 \pm 9,2 \text{ MO}/\text{cm}^3$ в РН і $212 \pm 10,4 \text{ MO}/\text{cm}^3$ в ТФ-ІФА.

Здійснено розробку дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в РПШФ. Для чого сконцентровано антирабічну гіперімунну сироватку крові кролів до активності $327,0 \pm 48 \text{ MO}/\text{cm}^3$ в РН та $391,6 \pm 64 \text{ MO}/\text{cm}^3$ в ТФ-ІФА. Визначено оптимальну концентрацію ФІТЦ (1,5 мг/100 мг) та рН (близько 9,0) для кон'югації з імуноглобуліном. Отриманий дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну мав робоче розведення 1:8, був специфічним ($\text{DSp} = 100 \%$) та чутливим до вірусу сказу ($\text{DSe} = 96,6 \%$). За результатами проведених досліджень розроблено технологічний регламент

виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу».

З метою отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць першим етапом було проведення гіперімунізації перепілок, для чого використовували інактивовані вакцинні штами вірусу сказу G 52 Wistar (зразок № 1) та CVS-11 (зразок № 2). Внаслідок чого отримано два зразки очищеного і концентрованого Ig Y.

Дослідженнями в РН на білих мишах зразок № 1 володів специфічною активністю на рівні 26,25 МО/см³, а зразок № 2 – 81,25 МО/см³ порівняно із Другим міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну людини.

Дослідження концентрованих дослідних зразків антирабічних Ig Y в FAVN-тест продемонструвало тотожні результати: титр зразку 1 був в межах 23,39-30,83 МО/см³, а зразку № 2 70,63-93,10 МО/см³ відносно стандартної позитивної антирабічної сироватки крові ВООЗТ.

Після мічення ФІТЦ і очистки від незв'язаного флуорохрому дослідний зразок антирабічного Ig Y № 2 досліджували в РПФ. Дослідженнями мазків-відбитків встановлено специфічність Ig Y (зразок № 2), однак із недостатньою активністю робочого розведення – лише 1:2. Проведені нами дослідження встановили принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу.

Здійснені порівняльні дослідження якості фіксації мазків-відбитків мозку фізичним і хімічним методами. Встановлено, що 60 із 65-ти досліджуваних зразків виявились позитивними на сказ за фіксації обома методами. Із 5-ти зразків, які були визнані негативними на сказ методом ЗТ-ПІР, негативними в РПФ виявились 2 зразки за фіксації ацетоном та 4 за фіксації над полум'ям спиртівки. Сумнівним результат вважали у трьох зразках, які були фіксовані ацетоном та у одного, який був фіксований над полум'ям спиртівки.

Отримані результати свідчать про ідентичність якості мазків-відбитків за фіксації обома способами. Однак, фіксація над полум'ям спиртівки значно

скорочує час постановки реакції та не потребує використання ацетону, який є небезпечною хімічною речовиною, що вимагає спеціальних заходів для його зберігання, обробки та утилізації.

Сформовано методичні підходи до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу на основі застосування референс-штаму вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR-959) для виготовлення позитивних контрольних зразків. Розроблено принципи характеристики контрольних зразків для забезпечення належної якості та проведено в 2021 році раунд МПВ «Виявлення антигену збудника сказу» відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014. «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації лабораторій».

Для розробки методики виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу в культурі клітин використано клітини нирки сирійського хом'яка (ВНК-21 С13, ATCC CCL-10), нейробластоми миші (N2a, ATCC CCL-131), нирки сайги (НС). На етапі апробації клітин досліджено 11 патологічних матеріалів позитивних на сказ в РПФ від котів, собак, лисиць і великої рогатої худоби. В культурі клітин ВНК-21 С13 виділено вірус сказу у вісьми з 11-и матеріалів (72,7 %). Культура клітин N2a показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено вірус сказу з 11 патологічних матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах. Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культурі клітин НС, в якій було виділено вірус казу лише з двох з 11 (18,2 %) патологічних матеріалів.

Запропоновано метод виділення вірусу сказу в культурі клітин N2a, який забезпечує швидке (протягом 72-76 годин) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби на білих мишах. Однак, при впровадженні в практику методу вірусвиділення з використанням перещеплюваної культури клітин N2a, необхідно враховувати придатність для дослідження тільки свіжого патологічного матеріалу, що забезпечить достовірність отриманих результатів.

Здійснено апробацію міжнародних (ВООЗТ) протоколів виявлення геному вірусу сказу методом ПЛР в режимі реального часу, ПЛР в агарозному гелі та гніздового варіанту ПЛР. Порівняльними дослідженнями 100 патологічних матеріалів від тварин методом біологічної проби на білих мишах підтверджено наявність антигену вірусу у 80-и зразках. Після перевірки досліджуваних зразків в ПЛР з'ясовано наявність РНК вірусу сказу в 82 зразках.

За результатами молекулярно-генетичної характеристики ізолятів вірусу сказу виділених на території України встановлено, що за своїми генетичними характеристиками ізоляти вірусу сказу однорідні, належать до I-ої філогрупи першого генотипу ліссавірусів тварин (RABV). Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8 % за амінокислотним складом, що є типовим для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи.

Виділено польовий ізолят від кажана на території Харківської області. В результаті побудови філогенетичного дерева, на якому були представлені всі класифіковані генотипи вірусу сказу виділені від кажанів на території різних країн, визначено приналежність зразку до I-ої філогрупи п'ятого генотипу ліссавірусів тварин (EBLV-1).

В результаті проведення філогенетичного аналізу двох секвенованих зразків від людей з'ясовано, що вони належать до першої філогрупи. За своїми генетичними характеристиками зразки близькі до польового ізоляту, який виділено від лисиці на території Франції в 1991 році (генетичні послідовності внесені до GenBank) і є типовим представником 1-го генотипу ліссавірусів тварин. Молекулярно-генетичні дослідження, проведені шляхом філогенетичного аналізу частини послідовності N гену (нуклеопротеїну), дали можливість встановити, що генетична спорідненість за амінокислотним складом вуличних ізолятів виділених від людей з території України і зразків, які представлені в GenBank, становила 96–99 %. Також генетичні послідовності досліджуваних зразків характерні для ізолятів, які виділяються в географічній зоні степу і лісостепу південно-східної Європи.

Виявлено географічну локалізацію геентичних варіантів випадків сказу, що були виявлені в нових ендемічних спалахах на території країн ЄС. Так, генетичний варіант SE (центрально-європейський варіант) виявлено тільки в республіці Польща, а варіант NEE (північно-східний варіант) в Польщі, Словаччині, Угорщині та Румунії в прикордонних з Україною територіях. Поряд з цим ізоляти вірусу сказу з України (три з Вінницької, один з Кіровоградської та два з Рівненської областей) відносилися до генетичного варіанту С (східно-європейський варіант). Отримані результати можуть бути підтвердженням ефективності буферної зони з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що проводиться на території західних областей України з 2012 року, так як свідчать про генетичну відмінність між ізолятами з країн ЄС та України.

Повторна поява сказу в Угорщині та Словаччині нагадує про важливість збереження достатньо широкого імунного поясу вздовж прикордонних ендемічних країн. Таким чином, попередні програми співпраці з впровадження пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу дозволили підтримувати імунний пояс шириною щонайменше 100 км, ширина якого продемонструвала свою ефективність у попередні роки.

За результатами проведених порівняльних досліджень зразків патологічного матеріалу з підозрою на сказ, удосконалено схему лабораторної діагностики сказу з використанням ЗТ-ПЛР як один з методів для постановки заключного діагнозу та подальшим секвенуванням зразків від хворих на сказ тварин, які мали контакт із людьми, що дозволить на сучасному рівні здійснювати моніторинг сказу і контролювати появу нових генетичних варіантів вірусу на території України. До того ж, створена схема пропонує умови гармонізації лабораторної діагностики сказу з міжнародними рекомендаціями. Адже, з 2018 року в Керівництві з діагностичних тестів МЕБ (ВООЗТ) метод ЗТ-ПЛР для лабораторної діагностики сказу визнано діагностичним тестом.

На основі отриманої гіперімунної сироватки крові кролів розроблено зразок Галузевого стандарту антирабічного глобуліну, який придатний для визначення напруженості антирабічного імунітету методами *in vivo* та *in vitro*.

Встановлено, що оптимальним кріопротекторним середовищем для ліофільного висушування антирабічного імуноглобуліну є середовище із вмістом сахарози, гліцину та желатину, взятих в рівних кількостях.

Проведено калібрування зразку антирабічного імуноглобуліну до Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну та визначено активність в РН на білих мишах на рівні 11,03 МО/см³, у FAVN-тест – 11,27 МО/см³. Аналіз результатів досліджень сироваток крові собак на наявність антитіл до вірусу сказу перед щепленням та на 14-у та 29-у добу достовірної різниці між значеннями титрів антирабічних антитіл, з використанням в якості контролю стандартного імуноглобуліну та отриманого нами Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну, не виявив.

Аналіз напруженості специфічного імунітету до вірусу сказу серед собак і котів (3927-и проб сироваток крові) показав в 57-и пробах недостатній рівень (менше 0,50 МО/см³) антитіл до вірусу сказу, що становить 1,45 %, де 31-а проба була від тварин, що були вакциновані моновалентними антирабічними вакцинами, а 26 – полівалентними вакцинами. Частка проб з недостатнім антирабічним імунітетом у тварин, які були щеплені моновалентними вакцинами, становила 0,97 % (31 з 3181), а частка сироваток крові із недостатнім титром антитіл до вірусу сказу, що отримані від тварин, яким вводили полівалентні вакцини, становила 3,49 % (26 з 746).

Отримані результати свідчать про захищеність популяцій тварин-компаньйонів від зараження вірусом сказу, хоча й демонструють значну неоднорідність популяційного імунітету серед вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

В іншому досліді були проведені дослідження антирабічної активності сироваток крові безпритульних собак, які були вакциновані вакциною проти сказу Рабістар. Встановлено, що в сироватках крові усіх тварин (6 голів)

містилися антирабічні антитіла в титрах більше мінімального захисного рівня, а саме в межах 1,12-5,87 МО/см³. Встановлено, що гуманне регулювання чисельності безпритульних собак є ефективним не тільки для контролю їхньої популяції, а також дає змогу провести антирабічну вакцинацію та забезпечити захист цих тварин від зараження вірусом сказу, що підтверджено лабораторними дослідженнями сироваток крові на наявність антирабічних антитіл.

Результати досліджень антирабічної активності сироваток крові протягом тривалого зберігання показали, що для сироваток крові заморожування за температури $t - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ є оптимальною умовою для зберігання. Заморожування зразків показало стабільність та незначні відхилення у збереженні рівня антирабічних антитіл. Після розморожування дослідного зразку сироватки крові, в подальшому її слід зберігати за температури $+ 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Однак, зберігання сироваток крові за $t + 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ придатне лише для короткочасного зберігання (не більше 14 діб).

Ключові слова: сказ, епізоотична ситуація, геоінформаційні системи, пероральна вакцинація, дикі м'ясоїдні тварини, культура клітин, вуличні ізоляти, філогенетичний аналіз, лабораторна діагностика, гіперімунізація, флуоресціюючий антирабічний імуноглобулін, сироватка крові, титр антитіл.

ABSTRACT

Polupan I.M. Epizootology and laboratory diagnostics of animal rabies. – Qualification scientific work as a manuscript.

Thesis for a Doctor's of Veterinary degree by speciality 211 «Veterinary Medicine». Institute of Veterinary Medicine of the NAAS. State scientific and research institute of laboratory diagnostics and veterinary and sanitary expertise. National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2024.

The dissertation is devoted to the study of spatio-temporal characteristics of the manifestation of rabies epizootics in Ukraine, the theoretical and experimental

justification of anti-epizootic rabies measures and the development of methods and means of laboratory diagnosis of rabies.

Epizootological studies of the rabies in Ukraine at the beginning of the 21st century, using a descriptive-statistical method, showed that rabies in Ukraine, with a generalization of cases among people, wild and domestic animals, is an endemic disease that is widespread in all natural and geographical zones and administrative units of our state. It was established that the red fox is the reservoir of the causative agent of rabies on the territory of Ukraine, which accounts for more than 36 % cases. Among domestic animals, the disease is most frequently registered in dogs (19.3 %) and cats (25.3 %), which pose the greatest threat to humans, as they have the highest epidemic potential.

Characterization of the manifestation of rabies, using the tools of geoinformation systems, made it possible to establish the spatio-temporal features of rabies epizootics in Ukraine and identify statistically reliable groupings of rabies cases. In particular, in 2011–2016, 18 spatio-temporal clusters with a "sporadic" trend were found in the central and southwestern districts of Chernihiv region. The territories of these clusters are stationary- unfavorable points for rabies. There were identified 3 clusters with a "new" trend, found in the southeast of the region, that led to the assumption of indirect pressure on the rabies epidemiological situation in Chernihiv region by the campaigns for oral immunisation of wild carnivores, which were carried out in Poltava and Sumy regions in 2006–2015.

In 2012–2016, three clusters of animal rabies disease were detected on the territory of Volyn, Lviv, and Zakarpattia regions, which included cases among both wild and domestic animals, which indicates the possible interspecies transmission of the rabies virus from foxes to dogs and cats. The obtained results confirm that the statistically significant accumulation of rabies cases among foxes preceded over time the accumulation of rabies cases among all other animal species. A study of endemic rabies outbreaks in three western regions of Ukraine (Volyn, Lviv, and Zakarpattia regions) from 2012 to 2016, in the territory where the program of oral vaccination of wild carnivores against rabies was active, showed insufficient effectiveness of the

conducted campaigns. The inclusion of dogs and cats in endemic foci showed the inadequacy of the existing system of rabies prevention among domestic animals.

Spatial-temporal analysis of rabies spread in Ukraine during 2018–2022 identified 23 Hot clusters in Vinnytsia, Cherkasy and Khmelnytsky regions, where 90 % of the two-month time intervals were statistically significant Hot spots. In addition, 954 cold clusters were identified in which rabies cases occurred, but in 90 % of the two-month time intervals they were statistically significant Cold spots.

The absence of Cold and Hot clusters was found only in three regions: Volyn, Zakarpattia, and Ivano-Frankivsk. On the territory of these regions there were only clusters without a defined trend.

A difference was established between the number of Hot and Cold clusters of rabies cases in Ukraine during 2018–2022. The number of clusters was at the same level during the time period of November-December 2020 (476 Hot spot vs 472 Cold spot). Subsequently, until the end of 2022, a decrease in the number of Hot spots and an increase in the number of Cold spots were noted, which indicates a reliable gradual decrease in the manifestation of rabies epizootics in Ukraine (as of December 2022) as a result of conducting oral rabies vaccination campaigns of wild carnivores.

However, analysis of the effectiveness of oral rabies vaccination campaigns of wild carnivores suggests that they are insufficiently effective. To achieve the best effect, oral rabies vaccination of wild carnivores had to be carried out twice a year: in spring and autumn. The inclusion of domestic carnivores (dogs and cats) also indicates problems in the existing rabies prevention system among these animals.

The qualitative assessment of the risks of rabies spread among wild carnivores, domestic and farm animals was carried out. A very high probability of the spread of rabies in the wild carnivore population has been established precisely from unvaccinated wild carnivores; a very high probability of inefficiency of parenteral vaccination of domestic animals was found; a high probability of non-vaccination of homeless carnivores was determined. Based on the results of the risk assessment, reports were prepared and recommendations were made regarding methods of managing the identified risks.

In order to improve the conduction of campaigns for oral vaccination of foxes against rabies, methodological recommendations "Planning, organization and conduct of oral immunization of carnivores against rabies" have been developed, which take into account the provisions of the relevant EU guidelines, as well as modern aspects of the aerial distribution of baits with the vaccine and the method of fixing accurate localization with GPS devices, which will increase the effectiveness of oral rabies vaccination of wild carnivores.

Comparative studies of the effectiveness of various rabies vaccines, intended for oral rabies vaccination of wild carnivores, were conducted. The presence of antibodies to the rabies virus was established in 75–96 % of foxes, which indicates the high antigenic activity of both rabies vaccines.

In accordance with the criteria defined by the methodical recommendations, epizootic surveillance was carried out in the vaccination zone, examination of the teeth of foxes for the presence of a tetracycline marker and determination of the intensity of rabies immunity in the blood sera of foxes that were hunted in the zone of oral vaccination of wild carnivores against rabies. Thus, monitoring the intensity of the epizootic situation with rabies revealed a tendency to decrease the prevalence of animal rabies in Ukraine. The indicator of the presence of the tetracycline biomarker in the teeth of wild carnivores was in the range of 46.7–50.1 %, and the protective level of rabies antibodies in blood sera was detected in the range of 15.1–37.7 %.

A highly active rabies virus antigen of the Shcholkovo-51K vaccine strain was obtained with a viral infectious activity titer of 6.8 MLD₅₀/cm³. With the use of purified antigen inactivated by β-propiolactone, studies were conducted and a scheme of hyperimmunization of animals was developed to obtain hyperimmune rabies serum. The scheme consisted of a four-fold (0 and 21, 35 and 49) combined injection of 0.1 cm³ intradermally into five points of 0.1 cm³ and intramuscularly into one point of 0.5 cm³ of cultured rabies virus antigen from injections of the drug "Fosprenil" a day before the first immunization and on the 21st and 49th days. The use of such a scheme made it possible to obtain blood serum with high titers of antibodies to the rabies virus – 185±9.2 IU/cm³ in MNT and 212±10.4 IU/cm³ in ELISA.

The development of a test sample of fluorescent rabies immunoglobulin in FAT was carried out. Why is rabies hyperimmune blood serum of rabbits concentrated to an activity of 327.0 ± 48 IU/cm³ in MNT and 391.6 ± 64 IU/cm³ in ELISA. The optimal concentration of FITC (1.5 mg/100 mg) and pH (about 9.0) for conjugation with immunoglobulin was determined. The resulting test sample of fluorescent rabies immunoglobulin had a working dilution of 1:8, was specific (D_{Sp} = 100%) and sensitive to rabies virus (D_{Se} = 96.6%). Based on the results of the research, the technological regulations for the production and control of the veterinary immunobiological drug "Immunofluorescence diagnosis of rabies kit" were developed.

In order to obtain fluorescent rabies globulins based on Ig Y from quail eggs, the first step was hyperimmunization of quails, for which inactivated vaccine strains of rabies virus G 52 Wistar (sample 1) and CVS-11 (sample 2) were used. As a result, two samples of purified and concentrated Ig Y were obtained.

When tested in MNT, sample 1 (Ig Y G 52 Wistar, 30 mg/cm³) had a specific activity at the level of 26.25 IU/cm³, and sample 2 (Ig Y CVS-11, 19.5 mg/cm³) 81.25 IU/cm³ compared to the 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin.

The study of concentrated test samples of rabies Ig Y in the FAVN test showed identical results: the titer of sample 1 was in the range of 23.39–30.83 IU/cm³, and sample 2 was 70.63–93.10 IU/cm³ relative to the standard positive rabies blood serum of WOA. H.

After FITC labeling and purification, rabies Ig Y test samples were examined in FAT. The research in FAT of rabies Ig Y samples from quail eggs labeled with FITC showed the specificity of Ig Y obtained for the antigen of rabies virus strain CVS-11, but with insufficient activity of the working dilution – only 1:2.

Our research has established the fundamental possibility of obtaining rabies Ig Y from quail eggs, the use of which is promising in the design of laboratory rabies diagnostic tools.

Comparative studies of the quality of fixation of smears-imprints of the brain by physical and chemical methods were carried out. It was established that 60 samples out of 65 examined ones were positive for rabies by both methods. Speaking about 5 samples that were found to be negative for rabies by the RT-PCR method, 2 samples were negative in FAT after fixing with acetone and 4 after fixing over the flame of an alcohol still. The result was considered doubtful in three samples that were fixed with acetone and in one that was fixed over the flame of an alcohol still.

The obtained results indicate the identity of the quality of smears-imprints for fixation by both methods. However, fixation over the flame of an alcohol still significantly reduces the reaction time and does not require the use of acetone, which is a dangerous chemical that requires special measures for its storage, processing and disposal.

Standardized methodological approaches to organizing and conducting of interlaboratory comparative tests on rabies based on the use of the reference strain of the rabies virus CVS-11 (ATCC VR-959) for the production of positive control samples have been developed. The principles of characterization of control samples were developed to ensure proper quality, and in 2021 of the professional testing round "Detection of the antigen of the causative agent of rabies" was held in accordance with DSTU EN ISO/IEC 17043:2014. "Compliance assessment. General requirements for testing the qualifications of laboratories".

To develop a technique for isolating the rabies virus from pathological material in cell culture, Baby hamster kidney cells (BHK-21 C13), Mouse neuroblastoma (N2a), and Saiga kidney (SK) were used. At the cell approval stage, 11 pathological materials from cats, dogs, foxes and cattle were examined. In the culture of BHK-21 C13 cells, eight out of 11 materials (72.7%) were isolated. N2a (ATCC CCL-131) showed an absolute sensitivity of 100% (11 out of 11 materials isolated) compared to the results of a biological test on white mice. Low sensitivity to street isolates of the rabies virus was established in the culture of SK cells, in which only two out of 11 (18.2%) street isolates of the rabies virus were isolated.

A method of isolation of rabies virus in N2a cell culture is proposed, which provides rapid (within 72–76 hours) isolation of rabies virus from pathological material and has sensitivity at the level of a biological sample on white mice. However, when putting into practice the method of virus isolation using a transplantable culture of N2a cells (ATCC CCL-131), it is necessary to take into account the suitability for research of only fresh pathological material, which will ensure the reliability of the results obtained.

International protocols for detection of the rabies virus genome by real-time PCR, PCR in agarose gel and hemi-nested PCR were tested. Comparative studies of 100 pathological materials from animals by the method of biological testing on white mice confirmed the presence of virus antigen in 80 samples. After checking the studied samples in PCR, the presence of rabies virus RNA was found in 82 samples.

Based on the results of the molecular genetic characterization of street isolates of the rabies virus isolated on the territory of Ukraine, it was established that the field isolates of the rabies virus are genetically homogeneous in their characteristics and belong to the 1st phylogroup of the 1st genotype of animal lyssaviruses (RABV). The degree of genetic relatedness is 99.8 % in terms of amino acid composition, which is typical for representatives of animal lyssaviruses circulating in the territory of northeastern Europe.

A field isolate from a bat was selected on the territory of the Kharkiv region. As a result of the construction of a phylogenetic tree, which presented all the classified genotypes of the rabies virus isolated from bats in different countries, it was determined that the sample belonged to the first phylogroup of the fifth genotype of animal lyssaviruses (EBLV-1).

As a result of the phylogenetic analysis of two sequenced human samples, it was found that they belong to the first phylogroup. According to their genetic characteristics, the samples are close to the field isolate, which was selected from a fox in France in 1991 (genetic sequences are included in GenBank) and is a typical representative of the 1st hetotype of animal lyssaviruses. Molecular genetic studies, conducted by phylogenetic analysis of part of the sequence of the N gene

(nucleoprotein), made it possible to establish that the genetic affinity in terms of amino acid composition of street isolates selected from people from the territory of Ukraine and samples presented in GenBank was 96–99 %. Also, the genetic sequences of the studied samples are characteristic of isolates that are isolated in the geographical zone of the steppe and forest-steppe of southeastern Europe.

The geographical affiliation of rabies cases, which were detected in new endemic outbreaks in the territory of the EU countries, was revealed. Thus, the SE variant was found in the Republic of Poland, and the NEE variant was found in Poland, Slovakia, Hungary and Romania in the territories bordering Ukraine. Phylogenetic analysis showed that rabies virus isolates from Ukraine (from Vinnytsia (3), Kirovohrad (1), and Rivne (2) regions) belong to cluster C. Therefore, this may be a confirmation of the effectiveness of the buffer zone for oral rabies vaccination of wild carnivores, which has been conducted in the western regions of Ukraine since 2012, as it indicates a genetic difference between isolates from EU countries and Ukraine.

The re-emergence of rabies in Hungary and Slovakia reminds us of the importance of maintaining a sufficiently wide immune belt along bordering endemic countries. Thus, previous collaborative programs to introduce oral rabies vaccination of wild carnivores have allowed the maintenance of an immune belt at least 100 km wide, which width has proven efficiency in previous years.

According to the results of comparative studies of samples of pathological material suspected of rabies, the scheme of laboratory diagnosis of rabies was improved using RT-PCR as one of the methods for making a final diagnosis and subsequent sequencing of samples from rabies-affected animals that had contact with humans, which will allow to carry out rabies monitoring at the current level and control the appearance of new genetic variants of the virus on the territory of Ukraine. In addition, the proposed scheme offers conditions for harmonizing the laboratory diagnosis of rabies with international recommendations. After all, since 2018, the OIE (WOAH) Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial

Animals have recognized the RT-PCR method for laboratory diagnosis of rabies as a diagnostic test.

On the basis of the obtained hyperimmune blood serum of rabbits, a sample of the standard of rabies globulin was developed, which is suitable for determining the intensity of rabies immunity by *in vivo* and *in vitro* methods.

It was established that the optimal cryoprotective medium for lyophilic drying of rabies immunoglobulin is a medium containing equal amounts of sucrose, glycine, and gelatin.

The calibration of the rabies immunoglobulin sample to the The 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin was carried out and the activity in MNT on white mice was determined at the level of 11.03 IU/cm³, in the FAVN – 11.27 IU/cm³. The analysis of the results obtained from the determination of the level of rabies immunity from the study of blood sera of dogs before vaccination and on the 14th and 29th days of the experiment of a reliable difference between the values of antibody titers, using as a control the standard immunoglobulin and the industry standard sample of rabies immunoglobulin obtained by us, did not reveal.

Analysis of the intensity of specific immunity to the rabies virus among dogs and cats (3927 samples of blood serum) showed in 57 samples an insufficient level (less than 0.50 IU/cm³) of antibodies to the rabies virus, which is 1.45 %, where 31 samples were from animals vaccinated with monovalent rabies vaccines, and 26 - with polyvalent vaccines. The proportion of samples with insufficient protective rabies immunity in animals vaccinated with monovalent vaccines was 0.97 % (31 of 3181), and the proportion of blood sera with insufficient titer of antibodies to rabies virus obtained from animals injected with polyvalent vaccines was 3.49 % (26 out of 746).

The obtained results indicate the protection of companion animal populations from infecting with the rabies virus, although they demonstrate significant heterogeneity of population immunity in vaccinated domestic carnivores.

In another experiment, the tests of the rabies activity of blood serums of free-roaming dogs were conducted. The research has established that the blood sera of all

animals contained rabies antibodies in titers higher than the minimum protective level – 0.5 IU/cm³, in the range of 1.12–5.87 IU/cm³. It has been established that the humane regulation of the number of dogs is effective not only for controlling their population, but also makes it possible to protect these animals from infection with the rabies virus, which is confirmed by laboratory tests of blood sera for the presence of rabies antibodies.

The results of studying of the rabies activity of blood sera during long-term storage has shown that for blood sera, freezing at a temperature of – 20 °C is the optimal storage condition. Freezing of the samples showed stability and minor deviations in the preservation of the level of rabies antibodies. After thawing the test sample of blood serum, it should be stored at a temperature of + 4 °C. However, the storage of blood sera at t + 4 °C is suitable only for short-term storage (no more than 14 days).

Key words: rabies, epizootic situation, geographic information systems, oral vaccination, wild carnivores, cell culture, street isolates, phylogenetic analysis, laboratory diagnostics, hyperimmunization, fluorescent rabies immunoglobulin, blood serum, titer of antibody.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії:

1. **Полупан, І.М.,** Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Нікітова, А.П., Мазур, Н.В. (2017). Імунопрофілактика сказу в Україні. Херсон: Грінь Д.С. *(Здобувачем підготовлено аналіз літературних щодо особливостей вакцинопрофілактики сказу, оформлено ілюстративний матеріал, підготовлено монографію до друку).*
2. **Полупан, І.М.,** Недосєков, В.В., Рудой, О.В. (2021). Лабораторна діагностика сказу. Київ: ДНДІЛДВСЕ. *(Здобувачем підготовлено аналіз літератури та оформлено протоколи методів діагностики сказу РПФ, ПЛР, біологічною пробою. Представлено основи філогенетичного аналізу*

та висвітлені власні результати досліджень, підготовлено монографію до друку).

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. Недосєков, В.В., Нікітова, А.П., **Полупан, І.М.**, Ничик, С.А., Галка, І.В., Дрожже, Ж.М., Іванов, М.Ю. (2014). Особливості формування антирабічного імунітету у вакцинованих тварин. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 25. 71-75. (Здобувачем здійснені серологічні дослідження та їх аналіз).
4. Mazur, N., Nedosekov, V., **Polupan, I.** (2015). The Role of the FAT in Laboratory Diagnosis of Rabies. *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія»*, 26. 232-237. (Здобувачем проведено аналіз літератури та обрахунок кількості досліджень з підозрою на сказ різними методами).
5. Мазур, Н.В., Мазур, М.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2015). Застосування імуностимулюючих препаратів за антирабічної вакцинації. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 27. 190–197. (Здобувачем здійснені підбір препаратів, серологічні дослідження, їх аналіз та математичні обрахунки).
6. Голік, М.О., Недосєков, В.В., Карловська, К.П., **Полупан, І.М.** (2015). Характеристика епізоотичної ситуації зі сказу в Україні. *Тваринництво України*, 9. 16–19. (Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації, підготовлено карти напруженості та підготовлено статтю до друку).
7. Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., **Полупан, І.М.** (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 28. 158–165. (Здобувачем здійснено гіперімунізацію тварин, проведено серологічні дослідження і підготовлено статтю до друку).
8. Ничик, С.А., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Хоменко, Я.В., Спиридонов, В.Г. (2016). Чутливість та специфічність антирабічних глобулінів, отриманих на основі Ig Y з перепелиних яєць. *Бюлетень «Ветеринарна*

- Біотехнологія*», 29. 196–204. (Здобувачем здійснено підготовку антигену для гіперімунізації перепілок, проведено серологічні дослідження і дослідження мазків-відбитків в РППФ, підготовлено статтю до друку).
9. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Підбір кріопротекторного середовища для ліофілізації галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну з сироватки крові кролів. *Науково-технічний бюлетень науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*, 5(1). 48–52. (Здобувачем здійснено аналіз літератури, підбір середовищ і серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).
10. Мазур, М.В., **Полупан, І.М.** (2017). Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 30. 145–152. (Здобувачем здійснено підбір ізолятів вірусу сказу, постановку ЗТ-ПЛР, філогенетичний аналіз).
11. **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Недосєков, В.В. (2017). Калібрування галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові кролів. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина»*, 103. 311–313. (Здобувачем здійснено аналіз порівняльні серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).
12. **Polupan, I.**, Bezymennyi, M., Golik, M., Drozhzhe, Z., Nychyk, S., & Nedosekov, V. (2017). Spatial and temporal patterns of enzootic rabies on the territory of Chernihiv oblast of Ukraine. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, 3, 2, 31-36. (Здобувачем сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).
13. Мазур, М.В., Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.** (2017). Видова характеристика епізоотії сказу в Україні за 2011 – 2016 рр. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій*

- імені С.З. Гжицького, 19. 73. 159–162. (Здобувачем здійснено описово-статистичний аналіз прояву сказу в Україні).
14. **Полупан, І.М.**, Мазур, М.В., Голік, М.О., Недосєков, В.В. (2017). Антропургізація сказу в Україні. *Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*, 265. 182–189. (Здобувачем здійснено аналіз прояву сказу в Україні, визначені основні вектори і причини значного прояву сказу серед свійських тварин, підготовлено статтю до друку).
15. **Полупан, І.М.**, Дрожже, Ж.М., Гібалюк, Ю.О., Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи антирабічних заходів в Україні. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету*, 1-2 (47). 149–152. (Здобувачем проведені аналіз літератури, епізоотологічні дослідження, визначені методичні основи повітряного розподілу вакцини для пероральної вакцинації диких тварин проти сказу, підготовлено статтю до друку).
16. Дзюба, Я.М., Рудой, О.В., **Полупан, І.М.** (2018). Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих домашніх м'ясоїдних тварин. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина»*, 104. 382–385. (Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).
17. Маковська, І.Ф., Недосєков, В.В., **Полупан, І.М.**, Латманізова, Т.С. (2018). Аналіз тренду поширення сказу котів в Україні. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 20(92), 18–23. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9204> (Здобувачем проведено епізоотологічні дослідження, визначено основні причини прояву сказу серед котів).
18. Голік, М.О., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2018). Прогнозування епізоотії сказу в Чернігівській області на основі геоінформаційного аналізу. *Наукові доповіді НУБіП України*, 6. (76),

- <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2018.06.025> (Здобувачем здійснено короткостроковий прогноз розвитку епізоотичної аналіз на основі отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).
19. Рудой, О.В., Дзюба, Я.М., Полупан, І.М. (2019). Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 105.* 84–87. (Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).
20. Kornienko, L., Moroz, O., Mezhenyky, A., Skorokhod, S., Datsenko, R., Karpulenko, M., **Polupan, I.**, Dzyuba, Y., Nedosekov, V., Makovskaya, I., Hibaliuk, Y., Sonko, M., Tsarenko, T., & Pishchanskyi, O. (2019). Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти сказу в Україні за період 1999-2018 рр. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, (3),* 90-109. <https://doi.org/10.31890/vttp.2019.03.14> (Здобувачем здійснено частину описово-статистичного аналізу прояву сказу в Україні).
21. **Полупан, І.М.**, Рудой, О.В., Ложкіна, О.В., Павлунько, В.Г., Купневська, М.В., Теплих, Н.І., Кравченко, А.Л., Гібалюк, Ю.О. (2021). Оцінка ефективності пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу (2018-2020 рр.). *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія», 39.* 96–107. doi:10.31073/vet_biotech39-09 (Здобувачем здійснено серологічні дослідження, аналіз отриманих даних і підготовку статтю до друку).
22. Полупан, І.М. (2021). Реакція прямої імунофлуоресценції в лабораторній діагностиці сказу тварин в Україні. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 107.* 15–18. (Здобувачем проведено аналіз літератури, визначено особливості лабораторної діагностики сказу, підготовлено статтю до друку).
23. Рудой, О.В., Дрожже, Ж.М., Кардаш, О.В., Дедок, Л.А., **Полупан, І.М.** (2022). Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в

Україні. *Ветеринарна біотехнологія*, 40. 110–120. https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-10 (Здобувачем визначено методичні основи проведення міжлабораторних порівняльних досліджень, проведено отримання і характеристизація контрольних зразків, аналіз отриманих результатів і підготовлено статтю до друку).

Статті у наукових фахових виданнях інших держав, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

24. **Polupan, I.**, Bezymennyi, M., Gibaliuk, Y., Drozhzhe, Z., Rudoi, O., Ukhovskiy, V., Nedosekov, V., & De Nardi, M. (2019). An Analysis of Rabies Incidence and Its Geographic Spread in the Buffer Area Among Orally Vaccinated Wildlife in Ukraine From 2012 to 2016. *Frontiers in veterinary science*, 6, 290. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00290> (Здобувачем сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).
25. **Polupan I.M.**, Nedosekov V.V., Stepanova T.V., Rudoi O.V., Parshikova A.V., Drozdova E.I. (2021). Molecular characteristics isolates of rabies virus isolated from humans in Ukraine. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 677, 042025. doi:10.1088/1755-1315/677/4/042025 (Здобувачем проведений відбір патологічного матеріалу, молекулярно-генетичні дослідження, філогенетичний аналіз, аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).
26. Robardet, E., Smreczak, M., Orłowska, A., Malik, P., Nándori, A., Dirbáková, Z., Jerg, S., Rudoi, O., **Polupan, I.**, Groza, O., Arseniev, S., Barbuceanu, F., Vuta, V., Picard-Meyer, E. (2023). Two sylvatic rabies re-emergences in Central-Eastern Europe over the 2021-2022 period: an unprecedented situation in recent years. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023. Article ID 5589201. doi:10.1155/2023/5589201 (Здобувачем проведений збір зразків патологічного матеріалу, аналіз літератури та отриманих даних).

Патенти:

27. Недосєков, В.В., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Ничик, С.А. (2016). *Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові* (Патент України № 110313). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-110313-sposib-oderzhannya-antirabichno-giperimunno-sirovatki-krovi.html> (Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).
28. **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Мазур, М.В., Нікітова, А.П. (2017). *Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну* (Патент України №118385). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-118385-sposib-otrimannya-galuzevogo-standartnogo-zrazka-antirabichnogo-imunoglobulinu.html> (Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).
29. Ничик, С.А., Мінцюк, Є.П., **Полупан, І.М.** (2023). *Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу* (Патент України № 153299). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743463> (Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, культуральних дослідженнях та підготовці матеріалів до патентування).

Методичні рекомендації:

30. Дрожже, Ж.М., Недосєков В.В., **Полупан, І.М.** (2016). *Методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин»*. Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем підготовлено протоколи методів дослідження антирабічного імунітету).
31. Мазур, М.В., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). *Методичні рекомендації «Виявлення РНК вірусу сказу методом*

- ЗТ-ПЛР*». Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем підготовлено протоколи виявлення РНК вірусу сказу молекулярно-генетичними методами).
32. Мазур, М.В., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). *Методичні рекомендації «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин»*. Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем проведено аналіз літератури і підготовлено порядок проведення філогенетичного аналізу ізолятів вірусу сказу).
33. **Полупан, І.М.**, Ничик, С.А., Недосєков, В.В., Кобаль, Б.І., Солодчук, В.Л., Шарай, Я.М., Хома, Ю.Б., Давиденко, О.Г., Гібалюк, Ю.О., Дрожже, Ж.М., Романенко, О.А. (2019). *Методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу»*. Київ: ПП «Тім-Сервіс К». (Здобувачем проведений аналіз літератури, визначені основні етапи проведення пероральної вакцинації диких тварин проти сказу та методи оцінки ефективності цього заходу).
34. **Полупан, І.М.** (2023). *Методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу»*. Київ: Редакційно-видавничий відділ НУБІП. (Здобувачем проведений аналіз літератури, вірусологічні дослідження, підготовлено рекомендації до друку).

Тези наукових доповідей:

35. **Polupan, I.M.**, Mazur, M., Mazur, N., Nikitova, A., Nychuk, S.A. (2016). Studies of bat lyssaviruses by RT-PCR. *СВЕР Ukraine research forum and peerreview session* (р. 69). 4–8 квітня, 2016, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження ізоляту вірусу сказу від кажана методом ЗТ-ПЛР).
36. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2016). Вибір тварин-продуцентів гіперімунної антирабічної сироватки. *Чотирнадцятий міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини* (с. 22–23). 6–7

- жовтня, 2016, Київ, Україна. *(Здобувачем здійснено аналіз літератури та вибір тварин для гіперімунізації).*
- 37.Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 44–46). 16 червня 2016, Київ, Україна. *(Здобувачем здійснено гіперімунізацію кролів та серологічні дослідження).*
- 38.Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Визначення специфічності та активності дослідних зразків флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в реакції прямої імунофлуоресценції. *XVI Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини»* (с. 103–104). 19–20 квітня, 2017, Київ, Україна. *(Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).*
- 39.Mazur, N., **Polupan, I.**, Drozhzhe, Zh., Nedosekov, V., Nikitova, A. (2017). Comparison of the quality of brain tissue smears for the rabies immunofluorescence diagnosis, which were obtained by means of chemical or physical fixation. *СВЕР Ukraine regional One Health research symposium and peerreview session* (p. 146). 24–28 квітня, 2017, Київ, Україна. *(Здобувачем здійснено підбір патологічного матеріалу і його дослідження в РППФ).*
- 40.Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Підбір оптимальних умов кон'югації антирабічного імуноглобуліну з ФІТЦ. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 50–51). 22 червня, 2017, Київ, Україна. *(Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).*
- 41.**Полупан, І.**, Дрожже, Ж., Гібалюк, Ю., Мазур, М., Нікітова, А., Ничик, С. (2018). Епізоотологічна характеристика захворюваності тварин на сказ в

- Україні та прогноз епізоотичної ситуації. *Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (# 289, P. 76). 16-20 квітня, 2018, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації зі сказу).
42. **Polupan, I.**, Hibaliuk, Yu., Rudoi, O., Dzyuba, Ya. (2019). Antigenic Activity of Oral Rabies Vaccines for Rabies Vaccination of Wild Carnivorous Animals. *Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (P. 212). 20-24 травня, 2019, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).
43. Гібалюк, Ю.О., **Полупан, І.М.**, Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи заходів профілактики сказу в Україні. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 28–30). 19 липня, 2018, Київ, Україна. (Здобувачем визначені методичні основи повітряного розподілу вакцини для пероральної вакцинації диких тварин проти сказу).
44. Дзюба, Я.М., Дрожже, Ж.М., Рудой, О.В., **Полупан, І.М.**, Гібалюк, Ю.О. (2019). Дослідження сироваток крові від диких лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу після пероральної вакцинації в 2018 р. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 19–20). 27 червня, 2019, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).
45. Rudoi, O., Dzyuba, Ya., **Polupan, I.** (2021). Impact of temperature of storage of blood sera on titers of antibodies to rabies virus. *International Biothreat Reduction Symposium* (p. 77). 29 червня – 2 липня, 2021, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом FAVN).
46. Rudoi, O., Hibaliuk, Yu., **Polupan, I.** (2022). Description of Threshold Positive Values of Titers of Anti-rabies Antibodies in the Assessment of the

Efficacy of Oral Vaccination of Wild Carnivorous Animals. *BTRP Ukraine. 2022 International Biothreat Reduction Symposium* (p. 122). 24-27 жовтня, 2022, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).

47. **Полупан, І.М.,** Радзиховський, М.Л., Дишкант, О.В. (2023). Особливості діагностики сказу. *Патоморфологія сьогодення. Збірник тез Міжнародної наукової конференції, присвяченої 125-річчю з часу заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України* (с. 44-45). 28–29 вересня, 2023, Київ, Україна. (Здобувачем здійснені моніторингові дослідження та їх аналіз).

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	35
ВСТУП	37
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	48
1.1. Сучасні методи дослідження прояву сказу серед тварин	48
1.2. Протиєпізоотичні антирабічні заходи	53
1.3. Лабораторна діагностика сказу	57
1.3.1. Метод флуоресціюючих антитіл	61
1.3.2. Методи виявлення вірусу сказу	64
1.3.3. Методи аналізу геному вірусу сказу	67
1.3.4. Філогенетичний аналіз послідовностей нуклеїнових кислот.	72
1.4. Антирабічний імунітет	79
1.4.1. Методи оцінки імунітету до вірусу сказу	81
1.4.2. Способи отримання та методи очистки гіперімунних антирабічних сироваток	87
1.4.3. Стандартизація і контроль антирабічного імуноглобуліну при визначенні гуморального імунітету за сказу тварин	96
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1	100
РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ	104
2.1. Матеріали	104
2.2. Методи	117
РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	155
РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЯВУ СКАЗУ В УКРАЇНІ	155
3.1. Описово-статистична характеристика прояву сказу в Україні протягом на початку ХХІ століття	155
3.2. Дослідження поширення сказу в Україні з використання інструментів ГІС	172

3.2.1. Просторово-часова характеристика прояву сказу в Чернігівській області в 2011-2016 рр.	173
3.2.1.1. Аналіз випадків сказу на території Чернігівської області	173
3.2.1.2. Виявлення стаціонарно-неблагополучних зон і нових зон поширення сказу шляхом проведення Emerging Hotspot Analysis	181
3.2.2. Просторово-часова характеристика прояву сказу на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр.	184
3.2.2.1. Характеристика дослідного регіону та формування бази даних випадків сказу	184
3.2.2.2. Описовий статистичний аналіз сказу	188
3.2.2.3. Просторово-часовий аналіз прояву сказу	194
3.2.3. Просторово-часова характеристика прояву сказу в Україні протягом 2018-2022 рр.	203
3.2.3.1. Описово-статистична характеристика прояву сказу	203
3.2.3.2. Просторово-часова характеристика випадків сказу	209
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3	215
РОЗДІЛ 4. ТЕОРЕТИЧНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СИСТЕМИ КОНТРОЛЮ СКАЗУ В УКРАЇНІ	221
4.1. Оцінка ризику поширення сказу серед диких, свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні	221
4.2. Удосконалення системи профілактики сказу серед диких м'ясоїдних тварин в Україні	229
4.3. Аналіз ефективності заходів боротьби зі сказом тварин в Україні	234
4.3.1. Оцінка ефективності різних антирабічних вакцин для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в контрольованому експерименті	237
4.3.2. Нагляд за епізоотичною ситуацією зі сказу в зоні проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин	241
4.3.3. Дослідження зубів диких м'ясоїдних тварин на наявність тетрациклінового маркера	243

4.3.4. Дослідження сироваток крові диких м'ясоїдних тварин на наявність антитіл до вірусу сказу	246
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4	256
РОЗДІЛ 5. ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ	260
5.1. Отримання антигену вірусу сказу	260
5.2. Розробка методики гіперімунізації тварин для отримання антирабічних сироваток	271
5.3. Отримання дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну	280
5.4. Отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць	296
5.5. Порівняльна характеристика фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної діагностики сказу	302
5.6. Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні	305
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5	313
РОЗДІЛ 6. ВИДІЛЕННЯ ВІРУСУ СКАЗУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН	318
6.1. Оцінка придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу	318
6.2. Порівняльна характеристика методів детекції вірусу сказу	321
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 6	323
РОЗДІЛ 7. ДЕТЕКЦІЯ ВІРУСУ СКАЗУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ	325
7.1. Лабораторна діагностика сказу методом ЗТ-ПЛР	325
7.2. Молекулярно-генетична характеристика вірусу сказу	329
7.2.1. Характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України	330
7.2.2. Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених від свійських і диких м'ясоїдних тварин	335

7.2.3. Філогенетичний аналіз ліссавірусів кажанів з території України	339
7.2.4. Молекулярно-генетична характеристика ізолятів вірусу сказу виділених від людей хворих на сказ	342
7.2.5. Кластеризація та картографування секвенованих зразків	349
7.2.6. Порівняння амінокислотних послідовностей секвенованих зразків з території України із послідовностями виділеними на території сусідніх країн	352
7.3. Удосконалення схеми лабораторної діагностики сказу	359
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 7	363
РОЗДІЛ 8. ОЦІНКА АНТИРАБІЧНОГО ІМУНІТЕТУ	367
8.1. Створення галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну	367
8.2. Характеристика параметрів реакції віруснейтралізації в культурі клітин для виявлення антитіл до вірусу сказу (FAVN-тест)	373
8.3. Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин	376
8.4. Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання	383
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 8	387
РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	391
ВИСНОВКИ	411
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ	417
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	419
ДОДАТКИ	480

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

- БП (MIT) – Біологічна проба (Mouse Inoculation Test);
- ВООЗ (WHO) – Всесвітня організація охорони здоров'я (World Health Organization);
- ВООЗТ (WOAH) – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин (World Organisation for Animal Health);
- ВРХ – Велика рогата худоба;
- ГІС – Геоінформаційні системи;
- ДНК – Дезоксирибонуклеїнова кислота;
- ЗТ-ПЛР – Зворотнотранскриптазна полімеразно-ланцюгова реакція;
- ДСТУ – Державний стандарт України;
- ТФ-ІФА (ELISA) – Твердофазний імуноферментний аналіз (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay);
- МО – Міжнародна одиниця;
- МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро;
- МЛД – Мишача летальна доза;
- МФА – Метод флуоресціюючих антитіл;
- НС – Культура клітин нирки сайги;
- ПЕГ – Поліетиленгліколь;
- ПЛР (PCR) – Полімеразно-ланцюгова реакція (Polymerase Chain Reaction);
- РН (MNT) – Реакція нейтралізації (Mouse Neutralization Test);
- РНК – Рибонуклеїнова кислота;
- РПФ (DFA) – Реакція прямої імунофлуоресценції (Direct Fluorescent Antibody);
- ФАГ – Флуоресціюючий антирабічний глобулін;
- ФІТЦ – Флуоресцеїнізотіоціонат;
- ФСБ – Фосфатно-сольовий буфер;
- АТСС – American Type Culture Collection (Американська колекція культур клітин);
- ВСІ – Binomial confidence interval (біноміальні довірчі

- інтервали);
- BHK-21 – Baby Hamster Kidney Cell (культура клітин нирки сирійського хом'яка);
- CVS – Challenge Virus Standard (стандарт вірусу сказу);
- dRIT – Direct Rapid Immunohistochemical Test (імуногістохімічний тест виявлення вірусу сказу);
- ED – ефективна доза;
- ERA – Evelyn Rokitniki Abelseth strain (штам вірусу сказу);
- ESRI – Environmental Systems Research Institute (Інститут досліджень екологічних систем);
- FBS – Fetal bovine serum (фетальна сироватка крові ВРХ);
- GPS – Global positioning systems (глобальна система позиціонування);
- ISO – International Organization for Standardization (Міжнародна організації із стандартизації);
- TCID – Tissue Culture Infectious Dose (клітинно-культуральна інфекційна доза);
- FAVN – Fluorescent antibody virus neutralisation (Нейтралізація вірусу флуоресцентними антитілами);
- Ig – Імуноглобулін;
- KDE – Kernel density estimation (оцінка щільності ядра);
- NIH – National Institutes of Health (Національні інститути охорони здоров'я);
- Neuro-2a (N2a) – культура клітин нейробластоми миші;
- RABV – Rabies virus (перший генотип ліссавірусів);
- RFFIT – Rapid Fluorescent Focus Inhibition Test (Швидкий тест інгібіції фокусів флуоресції);
- RTCIT – Rabies Tissue Culture Infection Test (Тест інфікування культури клітин вірусом сказу);
- SAD – Street-Alabama-Dufferin (штам вірусу сказу);
- V-RG – Vaccinia Rabies Glycoprotein (вакцинний глікопротеїн вірусу сказу).

ВСТУП

Актуальність теми. Сказ відомий як смертельна хвороба з давніх часів, однак сучасне моделювання оцінює, що ця інфекція щорічно є причиною смерті близько 60000 людей у всьому світі [448].

В Україні, сказ є також актуальною проблемою ветеринарної та гуманної медицини. На початку XXI століття епізоотична ситуація щодо цієї інфекції характеризується як стабільно напружена із періодичними спалахами захворюваності [1, 8, 11, 19, 33].

Аналіз сучасного стану епізоотичної ситуації зі сказу в світі та Україні свідчить про широке поширення інфекції, не зважаючи на використання різноманітних протиепізоотичних заходів [88, 263, 285, 362, 413]. Стратегія боротьби зі сказом в Україні базується на впровадженні визначеного комплексу антирабічних заходів, направлених на профілактику та ліквідацію сказу серед основних резервуарів (дикі й свійські м'ясоїдні тварин) цього захворювання і включає в себе: парентеральну і пероральну імунізацію та епізоотологічний моніторинг [6, 11, 13, 35, 47, 66].

Широке використанням інструментів геоінформаційних систем (ГІС), основою яких є GPS (global positioning systems), відкрило нові можливості для здійснення ефективного і достовірного епізоотологічного моніторингу прояву сказу, а також дало змогу здійснювати візуалізацію статистичної інформації в просторово-часовому вигляді [101, 107, 297, 416], проводити кластеризацію випадків та формулювання, на основі отриманих результатів, пропозицій щодо покращення існуючої системи боротьби та профілактики цієї летальної хвороби [90, 155, 200, 308, 325].

У випадку сказу немає чітких патогномонічних уражень, а також специфічних і постійних клінічних ознак сказу, тому заключний діагноз можна поставити лише в лабораторії [286, 448].

Доцільність використання реакції прямої імунофлуоресценції (РПІФ) для виявлення антигену вірусу сказу була доведена багатьма дослідниками [84, 95,

269, 353]. Метод найбільше застосовується в світі та рекомендується ВООЗ і ВООЗТ. РПФ відрізняється високою чутливістю та специфічністю (96-99 %) і дає надійні результати на свіжих зразках менш ніж за 2 години [92, 286, 359].

Іншим тестом, який дає змогу виявити життєздатність (реплікацію) вірусу сказу в зразках патологічного матеріалу є ізоляція вірусу в культурі клітин. Вважається, що вірусовиділення в культурі клітин володіє аналогічною чутливістю, що й біологічна проба [91, 111, 324, 463].

Для ідентифікації вірусу сказу все ширше застосовуються методи аналізу геному, в першу чергу це полімеразно-ланцюгова реакція – ПЛР. Порівняльні оцінювання методів ПЛР відповідно до стандартів ВООЗТ показали чутливість і специфічність, подібну до РПФ, і можливість виявляти всі відомі ліссавіруси та застосовуватись як метод рутинної діагностики сказу [110, 207, 295, 312, 332, 367, 392, 436].

Зважаючи на значне генетичне різноманіття, ізоляти вірусу сказу, що виділяються в різних регіонах світу, є неоднорідними за своїми біологічними властивостями, тому дослідженню їхніх властивостей приділяють увагу багато вчених [96, 116, 158, 177, 216, 324, 331, 332, 435].

В наш час достовірно встановлено, що основним критерієм напруженості імунітету є оцінка рівня антирабічних антитіл у сироватках крові. Проведені різними авторами дослідження вказують на залежність ступеню захисту від рівня антирабічних віруснейтралізуючих антитіл [16, 98, 176, 425].

Для будь-якого захворювання, при виборі відповідного аналізу оцінки титрів антитіл та інтерпретації значень можливі певні дискусії і протиріччя, але для летальної хвороби, такої як сказ, вони мають першорядне значення [448]. Існуючі обмеження лабораторних досліджень для вимірювання рівнів антирабічних антитіл, а також перевірка правильності й доцільності вибору методу, повинні ретельно розглядатися з точки зору усіх біологічних аспектів, особливо при інтерпретації результатів, з метою недопущення отримання сурогатних результатів захищеності від інфікування летальною дозою вірусу сказу [85, 303, 304, 465].

Таким чином, дослідження особливостей прояву сказу з використанням інструментів ГІС, аналіз комплексу протиепізоотичних антирабічних заходів в Україні, а також розробка засобів і методів, що удосконалюють і доповнюють систему лабораторної діагностики сказу із отриманням нових знань щодо біологічних властивостей ізолятів вірусу сказу є актуальними завданнями та мають важливе значення на шляху до ерадикації сказу в Україні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася як самостійний фрагмент планових науково-дослідних робіт Інституту ветеринарної медицини НААН «Вивчити молекулярно-генетичні та імунобіологічні властивості ізолятів вірусу сказу, що циркулюють на території України, та відповідність їх вакцинним штамам» (номер державної реєстрації 0111U000473, 2011-2015 рр.); «Вивчити особливості формування антирабічного імунітету» (номер державної реєстрації 0116U000721, 2016-2020 рр.); «Розроблення сучасних біотехнологічних підходів у лабораторній діагностиці сказу та формування геоінформаційної системи моніторингу сказу в Україні» (номер державної реєстрації 0121U108466, 2021-2023 рр.) та Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи «Розробка нових та вдосконалення існуючих підходів, методів та засобів моніторингу, оцінки ризику, прогнозування, діагностики, лікування та профілактики хвороб тварин» (номер державної реєстрації 0118U100595, 2019-2028 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи була епізоотологічна характеристика прояву сказу в Україні та розробка засобів і методів лабораторної діагностики сказу.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

- здійснити описово-статистичну та просторово-часову характеристику прояву епізоотії сказу в Україні;
- виконати якісну оцінку ризику поширення сказу серед диких, свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та запропонувати шляхи її удосконалення;

- розробити спосіб гіперімуназації тварин для отримання гіперімунової антирабічної сироватки;
- створити дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну та оцінити його активність та специфічність в РПФ;
- розробити схему гіперімуназації, здійснити отримання, перевірку активності та специфічності антирабічних ФІТЦ-глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць;
- розробити стандартизовані методичні підходи до створення та оцінки придатності контрольних зразків для виявлення антигену вірусу сказу при організації раундів міжлабораторних порівняльних випробувань;
- провести оцінку придатності різних перещеплюваних культур клітин та розробити методику виділення вірусу сказу в культурі клітин;
- апробувати міжнародні протоколи постановки ПЛР в режимі реального часу, ПЛР в агарозному гелі та гніздового варіанту ПЛР для детекції РНК вірусу сказу;
- провести секвенування та філогенетичний аналіз ізолятів вірусу сказу, виділених від диких і свійських тварин, людей та кажанів на території України;
- теоретично обґрунтувати та розробити схему лабораторної діагностики сказу;
- розробити Галузевий стандарт антирабічного імуноглобуліну, здійснити його калібрування та порівняльну виробничу характеристику;
- здійснити серологічний моніторинг антирабічного імунітету серед вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

Об'єкт дослідження: сказ.

Предмет дослідження: епізоотична ситуація, лабораторна діагностика сказу, вуличні ізоляти та референс-штам вірус сказу, антирабічні імуноглобуліни, реакція прямої імунофлуоресценції, полімеразно-ланцюгова реакція, філогенетичний аналіз, культура клітин, сироватки крові, антирабічна активність сироваток крові.

Методи дослідження: епізоотологічні (описово-статистичний, просторово-часовий аналіз), вірусологічні (біологічна проба, титрування вірусу сказу на білих мишах, ідентифікація, культивування та титрування вірусу сказу в культурі клітин, реакція прямої імуофлуоресценції), серологічні (FAVN-тест, ELISA, РН на білих мишах), біохімічні (загальний білок), молекулярно-генетичні (ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР Real Time, секвенування), статистичні та біостатистичні (біноміальні довірчі інтервали, тест хі-квадрат Пірсона, критерій суми рангів Wilcoxon, статистика Getis-Ord G^* , тренд-тест Mann-Kendall) методи досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше, із застосуванням інструментів просторово-часового геоінформаційного аналізу, виявлено стаціонарно-неблагополучні пункти та встановлено вплив пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу на напруженість епізоотичної ситуації.

Розроблено схему отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові тварин, яка полягає в чотирикратному комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в 5 точок по 0,1 см³ і внутрішньом'язово в одну точку 0,5 см³ концентрованого поліетиленгліколем (ПЕГ) культурального антигену вірусу сказу та імуностимулюючого препарату «Фоспреніл» з відбором крові на 63 добу. Новизна підтверджена патентом України на корисну модель «Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові» (№ 110313 від 10.10.2016).

Запропоновано спосіб виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу з використанням культури клітин нейробластоми миші (С-1300, клон N2a), новизна якого підтверджена патентом України на корисну модель «Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу» (№ 153299 від 14.06.2023).

Продемонстровано принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з яєць та отримано антирабічний Ig Y з яєць перепелів імунізованих антигеном вірусу сказу штам CVS-11, який після концентрування володів віруснейтралізуючою активністю на рівні 81,25 МО/см³ та встановлено

специфічну активність ФІТЦ-кон'югованих препаратів IgY при люмінесцентній мікроскопії мазків-відбитків позитивного на сказ матеріалу.

Вперше в Україні, в результаті філогенетичного аналізу секвенованих зразків, за допомогою пакету електронних програм MEGA 6.06, встановлено належність зразку від кажана з території Харківської області до 5-го генотипу (EBLV-1) першої філогрупи ліссавірусів тварин.

Вперше в Україні проведено секвенування ізолятів вірусу від двох людей, які були в контакті з хворими на сказ тваринами, та визначено приналежність досліджуваних зразків до 1-го генотипу, I-ої філогрупи ліссавірусів тварин. Доведено, що вуличні ізоляти вірусів сказу від людей за своїми генетичними характеристиками походять від ізолятів, які циркулюють в природних умовах серед популяції лисиць в географічній зоні степу і лісостепу Південно-Східної Європи.

Вперше в Україні отримано Галузевий стандартний зразок антирабічного імуноглобуліну з активністю 11,03–11,27 МО/см³, який придатний для визначення напруженості антирабічного імунітету методами *in vivo* та *in vitro*. Новизна розробки підтверджена патентом України на корисну модель «Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну» (№ 118385 від 10.08.2017).

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень доповнюють і поглиблюють сучасні знання про поширення сказу, можуть бути використані для планування та проведення протиепізоотичних антирабічних заходів та у лабораторній діагностиці сказу тварин фахівцями-епізоотологами, працівниками діагностичних лабораторій та лікарями ветеринарної медицини.

На запит Держпродспоживслужби України проведено якісну оцінку ризику поширення сказу серед диких, свійських та сільськогосподарських тварин в Україні. Проаналізована сучасна системи боротьби та профілактики сказу серед тварин, розглянуті відповідні стратегії управління з метою зменшення визначених ризиків і підготовлено ряд ключових рекомендацій.

Проведено оцінку ефективності протиепізоотичних антирабічних заходів в Україні та розроблено методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», які розглянуті та схвалені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (Протокол № 1 від 24 квітня 2018 року).

Розроблено технологічний регламент виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу» (затверджений Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 10 від 11.10.2016). Розроблено технологічний регламент виготовлення «Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну» (Затверджений Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 13 від 24.10.2016).

Проведена модифікація стандартного методу фіксації мазків-відбитків мозкової тканини для імунофлуоресцентної діагностики сказу дозволяє скоротити час постановки реакції та не потребує використання ацетону, що вимагає спеціальних заходів зберігання, обробки та утилізації.

Розроблено відповідні методичні рекомендації та робочі інструкції, що стало основою для впровадження в лабораторну діагностику сказу в Україні методу полімеразно-ланцюгової реакції та методу виділення вірусу сказу в культурі клітин.

За результатами проведених наукових досліджень здобувачем (у співавторстві) опубліковано монографію «Імунопрофілактика сказу в Україні» до лекційного курсу з дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби» (рекомендовано Вченою радою НУБіП України, протокол № 12 від 21.06.2017) та монографію «Лабораторна діагностика сказу» (рекомендовано Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 2 від 23.06.2021).

Розроблено методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у свійських і диких м'ясоїдних тварин» (затверджені Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 12 від 24.12.2015); «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 10 від

11.11.2016); «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 10 від 11.11.2016); «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН протокол № 9 від 02.11.2023).

Запропоновано удосконалену схему лабораторної діагностики сказу з додатковим використанням методу ЗТ-ПЛР та подальшим секвенуванням зразків, що дозволить скоротити час постановки заключного діагнозу та забезпечить достовірність діагностичних досліджень.

Сферу акредитації Випробувального центру ДНДІЛДВСЕ доповнено вірусологічними дослідженнями «Виявлення антигену збудника сказу» відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014.

Досліджено активність сироваток крові до вірусу сказу протягом тривалого зберігання проб і встановлено, що повторні цикли температурних перепадів (заморожування-відтаювання) критично впливають на титр антирабічних антитіл та можуть негативно впливати на достовірність серологічних досліджень.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно визначено напрям та створена програма наукових досліджень, встановлена мета і завдання роботи, виконаний пошук та аналіз наукової літератури за темою роботи, проведені експериментальні дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих матеріалів, формулювання висновків роботи і пропозицій виробництву.

За допомогу в ряді експериментів здобувач висловлює подяку д.вет.н. С.А. Ничику та д.вет.н. Меженському А.О. (Інститут ветеринарної медицини НААН), к.вет.н. О.В. Рудому та к.вет.н. Дрожже Ж.М. (Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи), к.вет.н. М.О. Голіку (Управління безпечності харчових продуктів та ветеринарної медицини МО України), к.вет.н. Я.М. Шараю (ТОВ «Укрветпромстач»).

Геоінформаційний аналіз прояву сказу в Україні проведено спільно з Безименним М.В. (Інститут ветеринарної медицини НААН).

Аналіз протиепізоотичних антирабічних заходів та розробку рекомендацій з пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу проведено спільно з Ю.О. Гібалюком (Держпродспоживслужба України).

Молекулярно-генетична характеристика ізолятів вірусу сказу з України проведена спільно з співробітниками департаменту вірусології Національного ветеринарного дослідницького інституту Marcin Smreczak, Anna Orłowska (м. Пулави, Польща) та директором Європейської референс-лабораторії зі сказу Emmanuelle Robardet (м. Нансі, Франція).

Окрема подяка за підтримку, консультування та науково-методичну допомогу д.вет.н. В.В. Недосєкову (Національний університет біоресурсів і природокористування України).

Одержані наукові результати, що виносяться на захист, є особистим досягненням здобувача.

Апробація результатів дисертації. Матеріали наукових досліджень доповідались та обговорювались на: засіданнях Вченої ради Інституту ветеринарної медицини НААН упродовж 2012–2023 рр. та Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи упродовж 2019–2022 рр.; щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2015); XV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (Київ, 2016); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених ІВМ НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2016); XIV Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту, науку, виробництво» (Київ, 2016); XV Всеукраїнської науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді

вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (Львів, 2016); СВЕР Ukraine Regional One Health Research Symposium (Київ, 2017); XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (Київ, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Транскордонні емерджентні хвороби тварин (африканська чума свиней, нодулярний дерматит, грип птиці, сибірка, сказ, туляремія, КЧС, блютанг, бруцельоз та ін.): актуальні аспекти біологічної безпеки та контролю» (Одеса, 2017); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених IBM НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2017); Науково-практичній конференції «Сказ: ерадикація до 2030 року» (Київ, 2017); Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми біологічної безпеки та контролю транскордонних емерджентних інфекційних захворювань (африканської чуми свиней, нодулярного дерматиту великої рогатої худоби, ящуру, бруцельозу, високопатогенного грипу птиці тощо) (Харків, 2018); Міжнародній науково-практичній конференції «Інфекційна патологія тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики» (Дніпро, 2018); Міжнародній науковій конференції «Сучасні епідеміологічні виклики в концепції «Єдине здоров'я» (Тернопіль, 2018); Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Київ, 2018); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2018); Науково-практичній конференції «СКАЗ: поділись знаннями. Збережи життя» (Київ, 2018); VI всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів» (Житомир, 2019); СВЕР Ukraine Research Forum & Peer Review Session (Київ, 2019); Щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2019); IX International conference Bioresources And Viruses (Київ, 2019); VIII науково-практичній конференції

«Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (Київ, 2019); 10th International Scientific and Practical Internet Conference (Дніпро, 2020); EURL for Rabies Workshop (Nancy, 2021); International Biothreat Reduction Symposium (Київ, 2021); 3-й щорічній міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я» (Тернопіль, 2021); Міжнародній науково-практичній конференції «Біобезпека, захист та благополуччя тварин» (Київ, 2022); Міжнародному симпозиумі зі зменшення біологічної загрози (Київ, 2022); Міжнародній науковій конференції, присвяченій 125-річчю з часу заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ, 2023).

Публікації. Основні положення дисертації викладено у 47 наукових працях, з яких 21 стаття у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, 3 статті у наукових періодичних виданнях, проіндексованих у базі даних Scopus, 3 патенти України на корисні моделі, 2 монографії, 5 методичних рекомендацій та 13 тез наукових доповідей.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасні методи дослідження прояву сказу серед тварин

Для дослідження особливостей прояву будь-якої інфекції у тварин, в тому числі й сказу, застосовується комплексний епізоотологічний (епідеміологічний) метод, який є сукупність різноманітних методичних прийомів і способів, об'єднаних на основі єдності предмета дослідження – захворюваності та епізоотичного (епідемічного) процесу, призначений для забезпечення найбільш повної та всебічної його характеристики як комплексного явища біологічної та антропогенної природи [209].

Основні цілі застосування комплексного епізоотологічного методу – це вивчити показники захворюваності та епізоотичного процесу, дати оцінку доцільності та ефективності протиепізоотичних заходів, розробити епізоотологічний прогноз. Основними складовими комплексного епізоотологічного методу є порівняльно-історичний прийом, порівняльно-географічний прийом, система статистичних методів епізоотології. Порівняльно-історичний і порівняльно-географічний прийоми можуть включати збір відомостей про фактори, що сприяють поширенню інфекційних хвороб на визначеній місцевості, про кількість та якість епізоотичних вогнищ, відомості про популяцію сприйнятливих тварин, захворюваності, летальності тощо. Дані цих двох методів можуть допомогти встановити зв'язок попередніх спалахів хвороби із поточною епізоотичною ситуацією, виявити повторюваність епізоотії у певній місцевості та у певні роки (стаціонарність та періодичність), а також можливий вплив на напруженість епізоотичної ситуації природно-географічних та соціально-економічних факторів [166, 284, 378, 381, 394].

Однак, усі методи і прийоми, що узагальнені в комплексному епізоотологічному методі були розроблені в XIX-XX століттях [74].

З часом, технологічні досягнення людства щодо відстежування і картографування індивідуумів (в нашому варіанті випадків захворювання) з використанням GPS (global positioning systems) відкрило нові можливості для

вивчення прояву інфекційних захворювань застосовуючи різні статистики та візуалізуючи інформацію в просторово-часовому вигляді [101, 297].

Науковцями визначено п'ять основних областей, які критичні для розвитку просторово-часової епідеміології: просторово-часова епідеміологічна теорія, вибір масштабу відповідного просторового аналізу, вибір просторового або просторово-часового методу для ідентифікації шаблонів (кластерів), оцінка експозиції на індивідуальному рівні в епідеміологічних дослідженнях і оцінка та врахування невизначеності розташування кластерів та їхніх атрибутів [297].

Область просторової епідеміології існує на стику статистики, географії та епідеміології, загалом складається з просторового аналізу випадків, характеристик захворювання та їхніх взаємозв'язків. Лише після того, як настільні географічні інформаційні системи (ГІС) стали широко доступними в 1990-х роках, просторові епідеміологічні дослідження та картографування даних про здоров'я популяцій, або про прояв інфекційних захворювань, стали звичним явищем [333]. Однак, ключовим обмеженням цих досліджень і карт було неврахування часової мінливості. Звичайні ГІС підходили для створення статичних карт, генеруючи «моментальні знімки» в часі [215]. Нещодавно технологія картографування стала дозволяти імпортувати та візуалізувати дані, що містять як географічні, так і часові координати, створюючи справді динамічні карти [81, 100, 199, 220, 298, 371, 379, 466].

Динамічні карти створили можливість для просторово-часового аналізу в епідеміології, яку, фактично, науковці тільки починають розуміти, розвивати та використовувати. Історично просторово-часовий епідеміологічний аналіз найчастіше включав пошук гарячих точок у сукупних рівнях захворювання. Фахівці просторово-часового аналізу можуть шукати просторові гарячі точки на кожному знімку в часі, просторово-часові гарячі точки в усьому наборі даних або наносити на карту та аналізувати відмінності протягом визначеного проміжку часу, щоб виявити регіони з найбільшим покращенням або погіршенням епідемічної ситуації [297]. Такий вид аналізу має велике значення, але представляє лише підмножину можливих варіантів просторово-часових

аналізів. Коли науковці змінюють певні атрибути (наприклад рівень захворюваності), а також базові географічні характеристики (наприклад історія поширення або зміни географічних кордонів), можливості для просторово-часового аналізу стають значно розширеними, хоча ускладнюється процес інтерпретації отриманих результатів [101, 343]. Однак, незважаючи на певні труднощі, що пов'язані необхідністю залучення для аналізу фахівців з області статистики, географії та епідеміології, галузь просторово-часової епідеміології швидко розвивається [297].

Використання різних інструментів просторово-часового аналізу при дослідженні поширення сказу в багатьох країнах Африки дало змогу проводити локалізацію найбільш неблагополучні території і як наслідок краще проводити планування антирабічних заходів, отримувати основну епідеміологічну інформацію щодо потенційних факторів ризику, пов'язаних із зараженням людини сказом [112, 184, 194, 221, 250, 301].

Було досліджено фактори міжвидової передачі збудника від кажанів-вампірів до ВРХ в Латинській Америці (Перу). Визначено зони з найвищою щільністю випадків, встановлено відсутність сезонності. Отримані результати вказують на необхідність перегляду національної програми профілактики та боротьби зі сказом у тваринництві, із включенням в концепцію екології кажанів-вампірів, а також прогнозу географічного та часового поширення інфекції [418]. Також було встановлено міждержавне поширення сказу серед коней у країнах Південної Америки [322]. Значні просторово-часові кластеризації випадків сказу серед собак в Болівії показали тенденцію до кластерів із високим рівнем захворюваності у двох конкретних районах порівняно з прилеглими районами міста. Автори описали переваги, отримані від використання кожної з аналітичних методик, і обговорили практичні труднощі у проведенні та інтерпретації результатів [429].

В інших дослідження з використанням просторово-часового аналізу підтверджено, що сказ у свійських і диких видів є ендемічним у тропічних і субтропічних зонах. В аналізі надано корисну інформацію для підтримки дій,

спрямованих на припинення поширення вірусу сказу або резервуару, а також планування стратегії вакцинації з урахуванням часу та місця [90, 325].

Ще одним прикладом практичного значення просторово-часового аналізу сказу стало дослідження прояву цієї інфекції серед лисиць в Німеччині. Автори представили аналіз, що зосереджений на динаміці захворювання в часі та просторі в безперервній часовій області. В результаті було підтверджено існуючу теорію щодо боротьби зі сказом лисиць на основі використання антирабічних вакцин для пероральної вакцинації, підкреслено потенційний ризик для міських районів і необхідність контролю ефективності вакцинації проти сказу свійських тварин [155].

Враховуючи широке впровадження національних програм з ерадикації сказу в європейських країнах з використанням пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, застосування для доскональної оцінки цього заходу та нагляду за поширенням інфекції геоінформаційного просторово-часового аналізу є обгрунтованим. Авторами вивчено прояв сказу в Європі зважаючи на те, що за останні чотири десятиліття було використано більше 10 різних пероральних вакцин проти сказу [308, 433].

З використанням ГІС можливо провести доскональний аналіз поширення сказу у випадках, коли резервуаром збудника виступають кілька видів тварин, як в США, а також встановити основні території та фактори, що сприяють передачі вірусу до людини [107, 196, 344, 445].

Крім цього також просторово-часовий аналіз використовується в молекулярній біології. Так дослідники з метою планування заходів прямого контролю на острові Гренладія отримали знання про еволюцію ізолятів вірусу сказу на молекулярному рівні. А шляхом дослідження просторово-часового аналізу визначено генетичного різноманіття арктичних варіатів вірусу сказу та їх резервуарного хазяїна (песця). Аналіз високої роздільної здатності дозволив розрізнити сім географічно відмінних субкластерів, причому два субклади містили віруси з Гренландії та Канади. Результати показали дрібномасштабну просторову структуру популяції песців Гренландії на основі мітохондріальних

послідовностей, але не дали доказів незалежного ізольованого еволюційного розвитку вірусу сказу серед різних ліній песців [203].

Інше поєднання результатів ретроспективного аналізу молекулярно-біологічних і просторово-часових досліджень європейських ліссавірусів кажанів дало змогу встановити, що нинішня лінія EBLV-1 виникла в Європі близько 600 років тому, і цей вірус еволюціонував із приблизною середньою швидкістю заміщення $4,19 \times 10^{-5}$ суб-сайт/рік, що є одним із найнижчих показників, зареєстрованих для РНК вірусів [416].

Просторово-часовий аналіз може включати також багато інших факторів, які можуть впливати на прояв та поширення інфекції. Зокрема було встановлено, що кліматичні та соціально-економічні фактори мають значний вплив на поширення сказу в Китаї, оскільки вони постійно впливають на середовище проживання людей і тварин, що критично впливає на те, наскільки своєчасно місцеві жителі можуть отримати доступ до постконтактних профілактичних послуг. Крім того, шляхом порівняння між традиційними регресійними моделями та агрегаційною моделлю, яка враховує неоднорідність і просторові ефекти, було продемонстровано достовірність і перевагу агрегаційної моделі. Це перевершило існуючі моделі та зменшило похибку оцінки, спричинену пропуском ефектів просторової неоднорідності та просторової залежності [200].

Отже, широке впровадження ГІС, з використанням різних варіантів просторово-часового аналізу, в епідеміологію сказу відкрило нові можливості для здійснення оцінки прояву інфекції, його кластеризації та формулювання, на основі отриманих результатів, пропозицій щодо покращення існуючої системи боротьби та профілактики цієї летальної хвороби.

1.2. Протиепізоотичні антирабічні заходи

Заходи з боротьби зі сказом тварин в Україні регламентовані Законом України «Про ветеринарну медицину», Інструкцією «Про заходи щодо боротьби зі сказом тварин», а також щорічними Планами протиепізоотичних заходів з профілактики основних інфекційних та інвазійних хвороб тварин в Україні [6, 62].

Проведення протиепізоотичних антирабічних заходів регламентується Інструкцією «Про заходи щодо боротьби зі сказом тварин» (затверджена Головним управлінням ветеринарної медицини з Держветінспекцією Мінсільгосппроду України, наказ від 15 березня 1994 р.) [64].

В інструкції усі заходи розділено на дві групи:

- заходи щодо профілактики сказу;
- заходи щодо ліквідації вогнищ захворювання тварин на сказ.

Заходи щодо профілактики сказу проводяться з метою своєчасного виявлення і недопущення захворювання тварин на сказ. В цьому пункті визначено: необхідність проведення обстеження угідь; підтримання оптимальних розмірів популяції лисиць; проведення боротьби з бродячими собаками та котами в мисливських угіддях; дотримання діючих правил тримання собак, котів і хижих тварин у населених пунктах України; проведення клінічного огляду і профілактичного щеплення проти сказу собак і котів; принципи карантинування тварин, які нанесли покуси людям; умови продажу, купівлі та вивезення собак, котів, а також диких тварин в інші населені пункти тощо.

Заходи щодо ліквідації вогнищ захворювання тварин на сказ проводяться з метою обмеження вогнища інфекції і недопущення поширення збудника сказу на інші сприйнятливі організми. В цьому пункті визначено: принципи постановки діагнозу; способи і методи доставки проб біологічного матеріалу до діагностичної лабораторії; порядок інформування державних органів при виявленні збудника сказу в патологічному матеріалі; основи проведення епізоотичного обстеження, визначення меж неблагополучного пункту та

розробки плану комплексних заходів щодо ліквідації сказу в неблагополучному пункті (щеплення, виявлення хворих та підозрілих на зараження сказом), порядок заборони проведення виставок, виводок собак, вивезення за межі неблагополучного пункту собак, котів і диких тварин; заходи щодо зниження чисельності лисиць та єнотовидних собак; проведення пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин; встановлення постійного ветеринарного нагляду за тваринами неблагополучної ферми, гурту, отари, табуну; умови використання одержаних продуктів забою та молока від тварин неблагополучної щодо сказу ферми, гурту, отари, табуну; заходи щодо дезінфекції; заходи щодо роз'яснювальної роботи серед населення; порядок та умови скасування карантинних обмежень [64].

Звичайно, стратегія боротьби зі сказом в Україні базується на впровадженні визначеного комплексу антирабічних заходів, направлених на профілактику та ліквідацію сказу серед основних резервуарів (дикі й свійські м'ясоїдні тварин) цього захворювання і включає в себе: парентеральну і пероральну імунізацію та епізоотологічний моніторинг [6, 8, 11, 12, 13, 35, 47, 66].

Базовим ветеринарно-санітарним заходом направленим на профілактику та ліквідацію сказу серед тварин-компаньйонів (собаки, коти) і сільськогосподарських тварин є парентеральна імунізація (вакцинація).

В Україні для парентеральної вакцинації свійських тварин (закупляється за кошти державного бюджету через офіційний майданчик електронної системи публічних закупівель ProZorro) застосовується вакцина антирабічна рідка інактивована для імунізації тварин «RabiStar» та «RabiStar red». Головною перевагою цих вакцин є здатність формувати захисний рівень антитіл до вірусу сказу після одноразового введення [6]. Крім цього використовується приватними лікарнями ветеринарної медицини широкий спектр моно- та полівалентних антирабічних вакцин для собак і котів [13, 35, 38, 40].

Враховуючи те, що планові показники формуються відповідно до статистичних даних, а також беручи до уваги відсутність ідентифікації свійських тварин, зокрема собак і котів, існує вірогідність неповного охоплення

вакцинацією поголів'я, в першу чергу це стосується безпритульних собак та котів [6, 8, 35].

Нині, для досягнення епідемічного благополуччя щодо сказу принципово важливо, щоб в рамках зареєстрованих спалахів собаки і коти не брали участі в циркуляції вірусу, що можливо досягти шляхом формування імунітету в популяціях епізоотично важливих видів (лисиць, собак, котів). Аналіз літератури свідчить, що для переривання епізоотичного ланцюга необхідно, щоб відсоток імунних до вірусу сказу тварин становив 50–85% [263, 362, 413].

Максимальне охоплення вакцинацією собак є ваговою частиною стратегії контролю сказу, а найважливішим питанням сказу людини є вакцинація людей та свійських тварин [13, 88]. Сказ серед людей зустрічається більш ніж у 150 країнах [84, 448, 449]. Щороку у світі від сказу собак гине 59 000 людей та 8,6 мільярдів доларів економічних витрат [346, 386]. В Україні, протягом останніх 10 років було витрачено близько 3 мільйонів доларів через сказ ВРХ, близько 1 мільйона доларів через вартість вакцини для людей, а також значні витрати на фінансування кампаній вакцинації проти сказу диких та свійських м'ясоїдних тварин [1, 73, 387]. Щорічно понад 100 000 звернень людей до медичних закладів з покусами тварин і до 23 000 осіб отримували вакцинацію проти сказу [1, 33]. Це свідчить, що боротьба зі сказом є економічним тягарем для держав, особливо для тих, що розвиваються.

Іншим, але фактично основним елементом системи боротьби зі сказом тварин є пероральна вакцинація диких м'ясоїдних проти сказу [79, 84, 285, 362, 395].

Нозоареал сказу в світі має глобальний характер, проте роль окремих видів тварин в цьому нозоареалі неоднозначна. В Європі у 84% країн головну роль як джерело і резервуар інфекції відіграють дикі м'ясоїдні, головним чином лисиці. Вогнища, які підтримуються лисицями (сформувалися після 1940-х років на території Східної Пруссії та дельти Волги і незважаючи на обмежуючі заходи), просуваючись зі швидкістю 30-60 км в рік, до кінця 1960-х років сказ лисиць охопив територію від Польщі до Франції. Одночасно поширення цієї інфекції

відбувалось і на території України з боку як Пруського, так і Астраханського реліктових вогнищ сказу [8, 12, 33, 35, 84, 128].

На сьогодні, лисиця залишається головним джерелом збудника сказу (більше 90 % діагностованих випадків у диких тварин) і є активним учасником синантропізації (наближення місць мешкання лисиць до населених пунктів) і контактів з безпритульними собаками та котами, що обумовлює загрозову ситуацію щодо сказу [8, 33]. Саме наявність резервуару збудника інфекції в популяції лисиць визначає важливість і актуальність проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу [6, 53].

Тільки завдяки впровадженню широкомасштабних кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу з використанням повітряного транспорту для розповсюдження принад з вакциною дало змогу провести ерадикацію захворювання майже в усіх країнах західної і центральної Європи [79, 117, 128, 285, 309, 380, 395].

В Україні також активно реалізуються кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Широкомасштабні розпочалися з 2006 року [285]. Протягом багатьох років в Україні цей протиепізоотичний захід проводився один раз в рік (восени), хоча класична модель кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу є дворазовий захід, який проводять весною і восени [84, 198, 285]. Дворазова система дистрибуції вакцини була використана в усіх європейських програмах з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, продемонструвала свою ефективність, незалежно від щільності популяції лисиць, та призвела до ліквідації сказу в багатьох країнах Європи [83, 128, 136, 285, 308, 309, 361, 395, 424].

Отже, на сьогодні в Україні наявні усі необхідні науково-обґрунтовані і перевірені часом в багатьох країнах протиепізоотичні антирабійні заходи із чітко визначеним механізмом їхньої реалізації та контролю ефективності. Належне впровадження комплексу ветеринарно-санітарних і

протиєпізоотичних заходів стане запорукою елімінації сказу серед тварин в майбутньому [6, 8, 35].

1.3. Лабораторна діагностика сказу

На сьогодні діагностика сказу проводиться на основі комплексу епізоотологічних, клінічних, патологоанатомічних і лабораторних досліджень. У випадку сказу немає чітких патогномонічних уражень, а також специфічних і постійних клінічних ознак захворювання, тому заключний діагноз можна поставити лише в лабораторії [64]. Лабораторні методи переважно застосовують на тканинах центральної нервової системи (Амонів ріг, таламус, кора головного мозку, мозочок і довгастий мозок). Враховуючи летальність цього захворювання діагностичні лабораторії повинні дотримуватися відповідних умов біобезпеки та біозахисту.

Відповідно до «Керівництва з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин ідентифікація збудника проводиться за допомогою первинних діагностичних тестів, таких як реакція прямої імунофлуоресценції (РПІФ, або DFA тест), прямий швидкий імуногістохімічний тест (dRIT) або полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР, або PCR). Тести DFA, dRIT і PCR дають надійний діагноз у 98-100 % випадків для будь-яких штамів ліссавірусів, якщо використовується відповідний кон'югат або праймер/зонд. Для великої кількості зразків більш доцільно застосування PCR у режимі реального часу (табл. 1.1) [286].

Гістологічний метод (світлова мікроскопія), такий як виявлення тілець Бабеша-Негрі, незважаючи на його експресність, володіє низькою достовірністю: близько 30 % позитивних результатів порівняно з біологічною пробою. Тільця Бабеша-Негрі не завжди знаходять у тварин навіть на стадії явних клінічних ознак хвороби [84]. Слід зазначити, що при чумі собак, вірусному гепатиті м'ясоїдних, вірусному енцефаліті виявляють тільця-включення подібні до тілець Бабеша-Негрі, що може призвести до помилково

діагнозу [72, 402]. Враховуючи це, він не рекомендується для лабораторної діагностики сказу.

Таблиця 1.1

Методи діагностики сказу (відповідно Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, twelfth edition 2023. Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses), WOAH, 2023)

Метод	Призначення			
	Вільна від інфекції	Сприяння викоріненню	Підтвердження випадків	Нагляд
DFA - Direct Fluorescent Antibody (виявлення антигену)	+++	+++	+++	+++
dRIT - Direct Rapid Immunohistochemical Test (виявлення антигену)	+++	+++	+++	+++
ELISA - Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (виявлення антигену)	+	+	+	+
RTCIT - Rabies Tissue Culture Infection Test (ізоляція вірусу)	+	+++	+++	+++
MIT - Mouse Inoculation Test (ізоляція вірусу)	н/з	+	+	+
Conventional RT-PCR - Polymerase Chain Reaction (виявлення РНК)	+++	+++	+++	+++
Real-time RT-PCR - Real-time Polymerase Chain Reaction (виявлення РНК)	+++	+++	+++	+++

Примітка: н/з – не застосовується.

Реакція дифузної преципітації також в минулому використовувалася для прямого виявлення антигену вірусу сказу. Однак, як і гістологічний метод, так і реакція дифузної приципітації, володіє низькою чутливістю, що робить неможливим виявлення антигену вірусу сказу в патологічному матеріалі у разі низьких титрів вірусу [267, 286, 359, 360, 423].

У випадках непереконливих результатів отриманих при застосуванні первинних діагностичних тестів (DFA тест, dRIT або PCR) рекомендуються подальші підтверджуючі тести (молекулярні тести, виділення вірусу в клітинних культурах або біологічна проба) для цього зразку. Виділення вірусу в культурі клітин (RTCIT) повинно з часом замінити тест БП [286, 359, 360].

Всебічну характеристику вірусу можливо проводити тільки в спеціалізованих лабораторіях з використанням моноклональних антитіл, часткового та повного секвенування геному з подальшим філогенетичним аналізом. Такі методи дозволяють диференціювати польові та вакцинні штами вірусу сказу (при здійсненні кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу з використанням живих атенуєваних антирабійних вакцин) та визначити географічне походження ізолятів [286].

Принцип постановки dRIT полягає у використанні суміші з висококонцентрованими й очищеними біотинільованими моноклональними антитілами, специфічними для нуклеопротейну, кон'югованого з ферментативною міткою з подальшою візуалізацією за допомогою субстрату 3-аміно-9-етилкарбазол.

Були проведені порівняльні дослідження, під час яких гомогенати головного мозку підозрілих на сказ тварин (n=250), людей (n=16) і клінічні зразки, такі як слина (n=16) і спинномозкова рідина (спинномозкова рідина, n=16) були нанесені на планшети для ELISA, вкриті антинуклеопротейновими антитілами проти вірусу сказу та абсорбований антиген нуклеопротейну вірусу сказу був виявлений за допомогою біотиніл-антинуклеопротейнового антитіла з подальшою обробкою кон'югатом стрептавідинпероксидазою та відповідним проявом кольору. Результати цього тестування оцінювали за допомогою реакції

прямої імунофлуоресценції – РПФ (для зразків мозку) та біологічної проби на мишах (для зразків слини та спинномозкової рідини). Відповідність між РПФ та розробленим тестом становила 98,4%. Специфічність тесту виявилася 100%. Тому автори зробили висновок, що розроблений тест є чутливим, специфічним і швидким для посмертної діагностики сказу у тварин і людей [279, 420].

В інших порівняльних дослідженнях dRIT проводився паралельно зі стандартною РПФ з використанням 400 зразків мозку різних тварин і людей. Вірусу сказу виглядав під світловим мікроскопом у вигляді червонувато-коричневих частинок на світло-блакитному фоні. Була встановлена 100 % кореляція між результатами, отриманими двома тестами. Крім того, інтерпретація результатів за допомогою dRIT була простішою та потребувала лише світлового мікроскопа [280]. Враховуючи це розроблена методика dRIT є простим, економічно ефективним інструментом діагностики сказу та матиме застосування в польових умовах [131, 280].

dRIT можна використовувати як альтернативу тесту DFA у рутинній діагностиці сказу, оскільки він має подібну чутливість та специфічність [265]. Принцип постановки схожий на DFA тест, за винятком того, що dRIT використовує для фарбування стрептавідин-біотин пероксидазою. Цей тест можна використовувати в лабораторіях, які не мають люмінесцентного мікроскопу. Основною вимогою для впровадження в лабораторну діагностику цього тесту є перевірка первинних антитіл на предмет специфічності й чутливості з урахуванням регіонального різноманіття ізолятів ліссавірусів [358, 363].

Тест-системи для імуноферментного аналізу (ELISA), якими виявляють антиген вірусу сказу, можуть бути корисними лише для великих епідеміологічних обстежень [398].

Імуноферментний аналіз на основі моноклональних антитіл (MAb) був розроблений для діагностики підозрюваних на сказ зразків з використанням прототипів вірусів з різних генотипів *Lyssavirus* та з різного географічного походження та філогенетичних ліній. Дослідження включали панель із 1660

зразків, отриманих для діагностичного тестування на сказ, і був визнаний високоспецифічним (99,9 %) і чутливим (97,0 %) у порівнянні з іншими рекомендованими методами діагностики сказу [455, 456].

Для усіх рекомендованих тестів лабораторної діагностики сказу щорічно в референс-лабораторіях ВООЗТ (МЕБ) організовуються міжлабораторні раунди підтвердження кваліфікації, що рекомендується для забезпечення якості. На національному рівні міжлабораторні порівняльні дослідження та раунди організовуються для регіональних лабораторій Держпродспоживслужби України Референс-центром з діагностики заразних хвороб тварин ДНДІЛДВСЕ.

Отже, з розроблених і наведених в «Керівництві з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин» методів лабораторної діагностики сказу в Україні прямий швидкий імуногістохімічний тест (dRIT) та імуноферментний аналіз (ELISA) в рутинній діагностиці сказу не застосовується [5, 286].

1.3.1. Метод флуоресціюючих антитіл

Сказ є основним серед зоонозів, для якого діагностичні методи були стандартизовані на міжнародному рівні [286, 359, 360, 448].

Нині РППФ, в основі якої використано метод флуоресціюючих антитіл (МФА), є базовим методом, найбільш швидким і доступним в діагностиці сказу, який використовується в 96 % країн світу, в т. ч. і в Україні [286, 359, 360].

МФА визнано ВООЗ як «золотий стандарт» в діагностиці сказу. Метод базується на мікроскопічному дослідженні зрізів або мазків мозкової тканини після інкубації з антирабічним поліклональним глобуліном або моноклональними антитілами, кон'югованими з флуоресцеїнізотіоціанатом [286, 359]. Вперше цю методику для діагностики сказу застосували Goldwasser R. і Kissling R. ще в 1958 році. З того часу розроблено велику кількість модифікацій для постановки реакції імунофлуоресценції, однак, прямий метод є найбільш практичним, і, на сьогодні, це найбільш широко застосований метод діагностики сказу в світі [189, 286, 358, 359, 360].

Доцільність використання МФА для виявлення антигену вірусу сказу була доведена багатьма дослідниками [95, 191, 235, 269, 376, 414]. При цьому важлива, в першу чергу, специфічність методу. Було з'ясовано, що нетипові для сказу включення у клітинах гангліїв перехресно не зафарбовуються антирабічною поміченою сироваткою [354]. У той же час, у ряді випадків можлива імітація флуоресціюючих антигенів вірусу сказу. Так, при дослідженні значної кількості препаратів з головного мозку кішок, було з'ясовано, що у 74 випадках в амоновому розі були виявлені тільця Луцані та в 84 випадках включення Левентала. В препаратах з головного мозку у старих тварин були встановлені гранули яскравої флуоресценції, які представляють собою гліколіпіди схожі на ліпофусцин [358].

На результат МФА суттєво впливає температурний режим зберігання мозку, тоді як індивідуальні особливості штамів не впливають на кількість та розміри включень. Встановлено, що при короткій інкубації, низькому вмісту вірусу в мозку тварин та, особливо, при екстраневральному зараженні спостерігаються дрібні флуоресціюючі гранули, інколи в обмеженій кількості [354].

МФА – це швидкий, чутливий, специфічний метод для діагностики сказу у тварин і людей, який дозволяє отримати результат уже через декілька годин [189, 286, 358, 359, 387]. Однак, точність тесту залежить і від таких факторів як досвід дослідника, якість антирабічного кон'югату і основного обладнання (флуоресцентного мікроскопа). Не менш важливим фактором є визначення робочого розведення мічених антитіл [353].

Також точність імунофлуоресцентної діагностики залежить від ділянки мозку, яка вибрана для постановки реакції та якості розподілу зразка на мазку-відбитку. Sylvia G. Whitfield et al. (2001) експериментально дослідили, що розподіл вірусу сказу у мозковій тканині залежить від кількох факторів, а саме: штаму вірусу, його дози і місця введення [437].

Невеликі відхилення від стандартних вимог до постановки МФА можуть мати різкі наслідки для чутливості. На думку дослідників, МФА можна

застосовувати як для свіжих, так і для фіксованих в формаліні зразків, ідентичні результати були визначені в більш ніж 99,8% випадків [437]. Dean D.J. & Abelseth M.K. (1973) стверджують, що чутливість методу з використанням фіксованих у формаліні зразків складає 90-100% порівняно з дослідженням свіжих зразків. Однак, незважаючи на такі високі показники, рекомендовано використовувати свіжі зразки, коли це можливо [140].

Якщо зразок був збережений в розчині формаліну, МФА може бути використаний тільки після того, як зразок був оброблений протеолітичними ферментами. Тим не менш, імунофлуоресцентна діагностика на зразках фіксованих формаліном завжди менш надійна і більш громіздка, ніж при використанні свіжої тканини [140, 437].

Terpsumethanon V. et al. (1997) відмітили, що при дослідженні методом імунофлуоресценції 8987 проб головного мозку собак, котів, людей та інших ссавців не було жодного хибного негативного результату. Дослідники стверджують, що за умови постановки МФА без затримки та при отриманні негативного результату, немає необхідності призначення постекспозиційного лікування людям, які постраждали від укусів тварин [408].

Використання МФА для діагностики сказу також має ряд недоліків. Протипоказано застосовувати метод імунофлуоресценції для діагностики сказу тварин, які були щеплені антирабічною вакциною – протягом трьох місяців після щеплення (наявність в нервовій тканині антигену вакцинного вірусу), а також застосовувати цей метод для знаходження антигену вірусу сказу в патологічному матеріалі який піддався автолізу, адже можливе неспецифічне світіння автолізованої тканини. Також не підлягають дослідженню тканини, які фіксовані етиловим спиртом чи іншими засобами і методами, що викликають денатурацію і коагуляцію антигенів або створюють додатковий фон світіння. До недоліків слід віднести неможливість застосування методу для великої кількості зразків і значні витрати на обладнання для імунофлуоресцентної діагностики [111, 359, 360].

До переваг МФА слід віднести можливість прижиттєвої діагностики сказу. Так був розроблений метод корнеальної проби, який базується на люмінесцентній мікроскопії відбитків епітеліальних клітин рогівки ока на предметному склі [249].

У експериментально заражених мишей антиген вірусу сказу знаходили за 1 – 5 діб до початку прояву клінічних ознак хвороби, а наявність антигену в рогівці ока повністю корелювала з наявністю антигену вірусу сказу в слинних залозах [462]. Корнеальна проба підтвердилась також і в експериментах на кроликах і вівцях [261, 290].

В медичній практиці у складних випадках корнеальна проба буває вирішальною. Відомий випадок, коли пацієнту був поставлений діагноз – гострий енцефаліт невідомої етіології. При комплексному дослідженні на різні бактеріальні та вірусні агенти, дослідження цереброспинальної рідини, сироватки, біоптату шкіри та зразків слини результат виявився негативний. Тоді була проведена корнеальна проба, під час якої було поставлено діагноз на сказ [84].

В Україні для лабораторної діагностики сказу широко використовується метод флуоресціюючих антитіл. Така ситуація вимагає розробки ефективної вітчизняної діагностичної тест-системи для імунофлуоресцентної діагностики сказу.

1.3.2. Методи виявлення вірусу сказу

Методи виявлення інфекційного вірусу сказу передбачають застосування живих систем *in vivo* та/або *in vitro*.

Метод біологічної проби на білих мишах вперше запропонований Webster L.T. в 1936 році, і до сьогодні є одним із основних і обов'язкових референс-тестів при постановці діагнозу на сказ [433]. Використання цього методу також передбачене і широко застосовується в лабораторній діагностиці сказу в Україні [16, 65]. При постановці біологічної проби віддають перевагу

новонародженим мишам (2–3 доби) в зв'язку з їхньою високою чутливістю до різних штамів вірусу сказу [134, 242].

Фактично метод біологічної проби на білих мишах був першим діагностичним тестом в лабораторній діагностиці сказу, що з часом стало основою для подальших порівняльних досліджень цього методу із новими розробленими методами діагностики сказу [91, 94, 103, 106, 133, 233, 390].

Не дивлячись на те, що біологічна проба є високочутливим методом діагностики сказу, він володіє суттєвими недоліками: необхідною умовою є дослідження свіжого матеріалу, потрібна велика кількість тварин, тривалий період проведення тесту (інкубаційний період при зараженні вуличним вірусом сказу коливається від 7 до 28 діб), що обумовлює пізню відповідь про наявність або відсутність захворювання. Недоліками біологічної проби як методу виділення вірусу сказу є потенційна можливість виносу збудника за межі лабораторії. Робота з дорослими мишами небезпечна, тому що зараження нерідко викликає буйну форму, тварини виділяють вірус з витоками із носа і рота [390]. Крім того, проведення біопроб не економічне, вимагає обладнаного окремого приміщення, великої кількості тварин, кормів, та обслуговуючого персоналу, який потрібно вакцинувати проти сказу.

Виділення вірусу в культурі клітин є більш перспективним ніж БП і дозволяє виділити вірус через 24–48 годин, замість 7–28 діб. Найбільш чутливою культурою клітин для виділення вуличного вірусу сказу є нейробластома миші (C-1300, клон NA), яка не потребує адаптації вуличних ізолятів вірусу сказу в зв'язку із її невральним походженням [91].

Науковці при пошуку оптимальної культури клітин для виділення вірусу сказу використовували кілька клітинних ліній, і виявилось, що лінія клітин нейробластоми миші Neuro-2a є найбільш чутливою. Відомо, що лінія клітин нирки ембріона людини НЕК-293 експресує декілька нейронних білків і має нейронне походження, тому було припущення, що ця лінія клітин може бути чутливою до вірусу сказу. Була встановлена 100% кореляція між РПФ, виділенням вірусу в клітинах Neuro-2a та НЕК-293 та біологічною пробою на

мишах. Виділення вірусу в клітинах ВНК-21 становило лише 28% порівняно з іншими лініями клітин. Чутливість НЕК-293 до штаму вірусу CVS була подібною до чутливості Neuro-2a [324].

При дослідженні 93 зразків мозку (48 негативних і 45 позитивних) на наявність вірусу сказу, попередньо протестовані за допомогою РПФ, RT-PCR і RTCIT у Neuro-2a. З позитивних зразків 43 були позитивними в традиційному RTCIT з використанням Neuro-2a. Було протестовано два протоколи з лінією клітин НЕК-293 в RTCIT (з адсорбцією вірусу та без неї) з різним часом інкубації: 24, 48 та 72 години. Найвищий показник позитивних результатів у НЕК-293 (41 позитивний зразок) був результатом протоколу адсорбції з 72-годинним інкубаційним періодом, на відміну від 43 позитивних зразків із традиційним RTCIT з Neuro-2a [463].

В інших дослідженнях порівнювали чутливість клітин ВНК-21 (С-13) і мишиної нейробластоми (С-1300, клон NA) до виділення невеликих кількостей вуличного штаму вірусу сказу. Було встановлено, що клітини нейробластоми більш чутливі до вуличного вірусу сказу, ніж клітини ВНК-21. Виділення вірусу сказу в клітинах мишиної нейробластоми, біопроба на білих мишах і РПФ показали аналогічну чутливість [352].

Науковцями була вивчена можливість застосування культури клітин гліоми щура С6 (клон ССL-107) для культивування як фіксованого вірусу сказу (штам PV), так і вуличного. Встановлено, що при порівняльному інфікуванні вірусом сказу культури клітин С6, відбувається накопичення аналогічно, як і в культурах клітин ВНК-21 та С-1300, клон NA. При порівняльному дослідженні 102 зразків патологоанатомічних матеріалів встановлена повна кореляція результатів біопроб на мишах і в культурі клітин невриноми гасерового вузла щура [108].

Зважаючи на швидкість отримання результатів (24 – 48 годин), достовірність і економічну ефективність, ізоляція вірусу сказу в культурі клітин повинна замінити інтрацеребральне зараження мишей [91, 286, 355, 450].

Поряд з усіма перевагами, метод виділення вірусу сказу в культурі клітин не може застосовуватись в кожній лабораторії, так як потребує дорогого обладнання та реактивів, в зв'язку з чим інтрацеребральне зараження мишей надалі залишається важливим референс-тестом в лабораторній діагностиці сказу.

1.3.3. Методи аналізу геному вірусу сказу

Для ідентифікації вірусу сказу все ширше застосовуються методи аналізу геному збудників хвороб, а саме дот-гібридизація і полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [92, 102, 110, 168, 169, 207, 208, 295, 312, 332, 367, 392, 436].

Гібридизація. Метод молекулярної гібридизації заснований на індикації РНК вірусу з використання специфічних ДНК-зондів. Перші дослідники використовували мічений P^{32} фаг M_{13} , (200 – 400 п.о.), комплементарні різним генам вакцинного штаму PV або рекомбіновану плазмиду, що містить 96 % кодуючої послідовності нуклеопротеїну вірусу сказу, штам ERA [159].

У подальшому для виявлення РНК вірусу сказу *in situ* в гістологічних зрізах головного мозку використовували метод дот-гібридизації *in situ* і виявлення специфічного антигену вірусу сказу імунопероксидазним методом [231, 229].

Важливим моментом застосування гібридизації *in situ* є можливість її використання для ретроспективної діагностики [229, 230, 427].

Таким чином, гібридизація *in situ* може застосовуватися у випадках, коли виявлення специфічного антигену не дає чітких результатів і неможливо виділити вірус у культурі клітин або на лабораторних тваринах. Крім того, фіксовані формаліном зразки тканин можуть зберігатися протягом багатьох років [339, 427].

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). У 1983 р. американський біохімік Кері Мюлліс із співробітниками розробили метод ампліфікації (збільшення копій) фрагментів ДНК, який дістав назву полімеразна ланцюгова реакція –

ПЛР (*PCR – polymerase chain reaction*), за що у 1993 р. був удостоєний Нобелівської премії [310].

Метод ПЛР чи специфічної ампліфікації ДНК дає можливість вибірково синтезувати *in vitro* відносно невеликі ділянки ДНК довжиною від декількох десятків до декількох сотень пар нуклеотидів, зрідка – до 1000–2000 пн, використовуючи як матрицю будь-які проби ДНК – геномну ДНК окремих індивідуумів, різних видів про- та еукаріот, ДНК, виділену із культур клітин, бактеріальних клонів, бібліотек генів чи інших джерел. Кількість копій обраної ділянки ДНК у ході ПЛР може бути збільшена у 10^8 – 10^9 разів, що уможливорює її візуалізацію [77].

Полімеразну ланцюгову реакцію використовують для отримання численних копій однієї молекули ДНК у циклічному ферментативному процесі. Одним із основних складників реакції ампліфікації є праймери – синтетичні короткі, зазвичай одноланцюгові фрагменти ДНК (олігонуклеотиди) розміром 18–30 основ (п.о. – пар олігонуклеотидів). Ці фрагменти комплементарні спеціальним ділянкам на досліджуваній ДНК, так званим «сайтам», до яких будуть приєднуватись праймери під час процедури «випалювання» (гібридизації нуклеїнових кислот). Праймери орієнтують таким чином, що після випалювання на матриці вони своїми 3'-кінцями розташовуються один проти одного. Праймери в ПЛР слугують початковими пунктами синтезу ДНК термостабільною ДНК-полімеразою, яка у присутності іонів Mg^{2+} каталізує синтез нового ланцюга ДНК із дезоксирибонуклеотидтрифосфатів (дНТФ – А, Г, Т, Ц або dNTP – A, G, T, C) у напрямі 5'→3' [211].

Добір праймерів є основним фактором, який визначає кінцеву специфічність реакції, тому необхідним є знання нуклеотидної послідовності геному не лише даного організму, але й організмів, близьких за походженням [211].

Крім праймерів, для проведення реакції необхідним є фермент ДНК-полімераза. З огляду на те, що проведення реакції пов'язано з високими температурами (72 °C – 94 °C), використовують спеціальний фермент *Taq*-

полімерази. Його виділено із термостабільної бактерії *Thermus aquaticus*, яка мешкає у гарячих джерелах, характеризується високою стабільністю і зберігає активність до кінця процесу ампліфікації [310].

ПЛР складається із повторюваних циклів ензиматичної ампліфікації ДНК, кожен з яких включає в себе три кроки: денатурацію; гібридизацію нуклеїнових кислот (застосовують термін «випалювання», що є дослівним перекладом англійського *annealing*); синтез нового ланцюга ДНК [268].

Підготовчим етапом ПЛР є процес виділення ДНК із біологічного матеріалу.

1 крок циклу ПЛР – *денатурація* – відбувається за температури 92–95°C, двохланцюгова молекула ДНК розділяється на два одинарні ланцюги.

2 крок – *випалювання* – у розчин додають праймери двох типів. Одні з них комплементарні початку одного ланцюга ДНК, інші – кінцю другого. Для випалювання праймерів з одноланцюговою матрицею температуру знижують, щоб праймери могли гібридизуватись з комплементарними їм ділянками матриці.

3 крок – *синтез нового ланцюга ДНК* відбувається за участю *Taq*-полімерази за температури 72 °C, яка добудовує слідом за кожним праймером другий ланцюг у напрямі 5'→3'. Таким чином, утворюються вже дві двохланцюгові молекули ДНК. Третій крок зупиняється за підвищення температури і денатурації нової синтезованої ДНК. У суміші накопичуються специфічні короткі синтезовані фрагменти ДНК, кінцями яких виступають 5'-кінці олігонуклеотидних праймерів – амплікони [77, 310].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводять у програмованому термостаті – термоциклері (ампліфікаторі), у якому автоматично змінюється температурний режим. Такий прилад дає змогу задавати необхідну кількість циклів і вибирати оптимальні часові й температурні параметри для кожної процедури циклу. Один цикл триває більш як 3 хвилини, за весь період відбувається 30–50 циклів, внаслідок чого кількість копій може збільшуватися до мільярда [238, 310].

Наступний етап ПЛР – детекція ампліфікованої ДНК. Отриману суміш фрагментів ДНК наносять на електрофоретичну пластинку і розділяють у електричному полі. Електрофорез найчастіше проводять в агарозному чи поліакриламідному гелі за додавання бромистого етидію або за фарбування гелю після проведення електрофорезу [141].

Електрофоретичні блоки поміщають під ультрафіолетові промені й відмічають місце розташування фрагментів ДНК у вигляді червоної смуги. Маркерами можуть слугувати зразки дослідженої ДНК або інші види ДНК, молекулярна маса яких відома. Можлива ідентифікація ампліфікованої ДНК шляхом блот-гібридизації зі специфічними нуклеотидними зондами або ж за додавання у реакційну суміш мічених тринуклеотидфосфатів [211, 217].

Хоча ПЛР за чутливістю значно переважає всі існуючі діагностичні методи, етап електрофорезу в гелі ампліфікованої ДНК збільшує тривалість і трудомісткість цього аналізу. Тому нині вже розроблено методи, які уможливають оцінювання результатів без процедури електрофорезу або з використанням його швидкісних і механізованих варіантів. Відсутність етапу електрофорезу не лише скорочує тривалість процедури, але й дає змогу механізувати чи автоматизувати проведення аналізів, що важливо у разі масових обстежень. Цьому сприяє і використання ліофілізованих сумішей реагентів [257, 340, 442].

Останні 20-30 років спостерігається широке використання ПЛР як діагностичного молекулярно-епізоотологічного інструменту для штамової диференціації вірусу сказу. Так, Nadin-Davis S.A. et al. (1998, 2009) провели успішну диференціацію ізолятів вірусу сказу єнотів від ізолятів, циркулюючих в інших видів тварин в Онтаріо, що дозволило розробити ефективну систему превенції [312, 314].

Завдяки використанню ПЛР проведено молекулярно-генетичне типкування ізолятів вірусу сказу, виділених з популяції койотів і лисиць, особливо в областях, де резервуаром вірусу є смугасті скунси [350].

За допомогою ПЛР були досліджені проби в носоглоткових змивах кажанів колонії *Eptesicus serotinus* та встановлено, що 15 з 71 змивів виявилися позитивними на сказ. Цей факт вказує на можливість проведення моніторингу сказу в популяціях кажанів з більшою ефективністю, ніж класичні методи [307, 374, 375].

Рядом авторів показана можливість застосування ПЛР для прижиттєвого виявлення вірусної РНК у слині інфікованих тварин, в біоптаті слинної залози і в цереброспінальній рідині за дві доби до появи симптомів [71, 234, 241].

Крім традиційного методу ПЛР, розроблений варіант ПЛР, що представляє собою виявлення ПЛР продуктів дот-гібридизацією з використанням 2-х зондів, мічених біотином. Продукт, що зв'язався ПЛР, проявляли авідином, кон'югованим з ПХ, і проводили фотометричний облік, аналогічно ТФ-ІФА [436].

Одним з варіантів постановки реакції є тест з використанням гніздових праймерів. Сумарну РНК виділяли екстрацією фенол-хлороформу з використанням гуанідину тіоціонату. Для ампліфікації використовували гніздові праймери, які фланкували ген нуклеопротеїну вірусу сказу. Для дослідження використовували проби мозку 95 собак і 3 людей, для яких діагноз був підтверджений методами МФА і біопробою. Чутливість методу становила 8 пікограм РНК вірусу сказу, що було запропоновано для застосування в діагностичних центрах зі сказу замість МФА [331].

Методом ПЛР було проведено генотипування ліссавірусів, поширених на більшості континентів світу [96, 116, 158, 177, 216, 324, 331, 332, 435].

Так, Heaton P.R. et al. (1997) описали чутливий і швидкий метод ЗТ-ПЛР для визначення сказу та споріднених сказу вірусів. Шістдесят ізолятів, що належать до 6 генотипів ліссавірусів, були успішно визначені за допомогою ЗТ-ПЛР і Саузерн-блот гібридизації. Порівняння результатів, отриманих за допомогою стандартного методу флуоресцентних антитіл (МФА) і ЗТ-ПЛР показало, що МФА не виявляє вірусний антиген у тканинах мозку після 72

годин зберігання його при 37⁰С, в той час як ЗТ-ПЛР виявляє вірусну РНК навіть через 360 годин інкубації мозку при тій же температурі [207].

Таким чином, з наведених повідомлень можна зробити висновок, що метод полімеразної ланцюгової реакції є чутливим, високоспецифічним і швидким. Він незамінний у важких випадках діагностики і дозволяє проводити диференційну діагностику та типування штамів та ізолятів.

Ще однією з переваг ПЛР, поряд з високою чутливістю, є можливість визначення РНК вірусу сказу в матеріалах, які піддались автолізу і які містять низький рівень фрагментованої специфічної вірусної РНК [229].

Недоліком методу є те, що детекція продуктів ампліфікації ЗТ-ПЛР за допомогою тест-систем, і особливо при використанні напівгніздової ЗТ-ПЛР, створює ризик перехресної контамінації, і не дозволяє точно в кількісному вираженні підрахувати копії геному, і при цьому не включає в себе тест на специфічність. Хоча гніздова ЗТ-ПЛР і є найбільш чутливим діагностичним методом, але може давати псевдопозитивні результати, які підтверджуються після прямого секвенування [11, 331].

Широке впровадження методу ПЛР не тільки в наукові дослідження, а й також у лабораторну діагностику сказу в багатьох лабораторіях світу (в тому числі референс-лабораторіях ВООЗТ) стало основою для того, щоб з 2018 року цей метод включений як діагностичний тест в Керівництві діагностичних тестів МЕБ (ВООЗТ) [286].

1.3.4. Філогенетичний аналіз послідовностей нуклеїнових кислот

В системі діагностики інфекційних захворювань тварин визначальна частка належить методам точного дослідження функціональної структури нуклеїнових кислот. До цих методів належить секвенування – визначення нуклеотидної послідовності в нуклеїнових кислотах. Цей метод був розроблений у 70-х рр. минулого сторіччя для визначення нуклеотидної послідовності ДНК. Sanger F. et al. запропонували метод прямого ферментного

секвенування [368]. Maxam A.M. & Gilbert W. для секвенування запропонували специфічну хімічну деградацію фрагмента [291].

На сьогоднішній день широко використовується метод застосування «кольорових термінаторів», який лежить в основі «автоматичного секвенування». Суть методу полягає в тому, що фрагмент, який секвенується, вступає до реакції з міченими різними барвниками дідезоксинуклеозид-трифосфатними термінаторами [143].

В наслідок реакції хімічного секвенування в присутності праймерів (пробу секвенують з прямого та зворотного праймера) в окремих пробірках, полімерази, нуклеотидів і термінаторів проводять реакцію, що має цикли подібні до ПЛР, але утворюються продукти різної довжини від 1–2 до n п.о. [97].

При цьому ланцюг закінчується термінатором. У подальшому, при електрофоретичному обліку реакції за допомогою автоматичного аналізатора (секвенатора), ці продукти піддаються капілярному електрофорезу та виявляються фотометрично від коротшого до найдовшого, та одночасно перетворюючи його в кольоровий пік, що відповідає тому чи іншому нуклеотиду. Сукупність детектованих піків дає карту послідовності та називається хроматограмою секвенування [192].

З метою дослідження отриманих хроматограм проводять коригування послідовностей. Суть корегування полягає у вилученні нерозпізнаних ділянок та послідовностей. Отримані за допомогою секвенування послідовності застосовують з метою аналізу їхньої відповідності до видоспецифічних локусів. Такі дослідження ґрунтуються на застосуванні методів філогенетичного аналізу [153, 313, 330].

Дослідження молекулярна еволюція організмів включає в себе два напрямки. Її метою є вивчення закономірностей зміни спадкової інформації в живих системах, включаючи доклітинні і клітинні форми життя, вивчення історії розвитку життя на Землі, встановлення спорідненості між формами життя, їх генетичним матеріалом – філогенії форм життя. Тому, перший

напрямок досліджень включає в себе вивчення частоти та інших характеристик еволюційних змін в макромолекулах – нуклеїнових кислотах та білках, а також механізмів та причин, які визначають ці зміни. Друга область досліджень молекулярної еволюції направлена на реконструкцію еволюційного процесу розвитку форм життя на Землі, встановлення родинних зв'язків між формами життя та створення їх еволюційної класифікації, має назву молекулярної філогенетики [149, 377, 391].

Перші спроби встановлення філогенії за молекулярними даними були зроблені ще на початку ХХ століття. Види, близькоспоріднені за даними класичної біології, виявилися близькими і за імунологічними даними [397].

Починаючи з 1950 року кількість філогенетичних реконструкцій на основі молекулярних даних різко збільшилося. Основними початковими даними стають дані про первинні структури біополімерів. Наслідком популярності даного підходу стала розробка різноманітних методів побудови філогеній і методів оцінки еволюційної відстані між макромолекулами білка або ДНК/РНК [114, 219, 421, 447].

Мінімальний варіант реконструкції філогенезу може бути представлений у вигляді філогенетичного дерева. Переваги філогенетичних дерев полягають в тому, що ці схеми є корисними для зведення таксономічних даних і наочно ілюструють уявлення автора про еволюційну історію даної групи [109, 239].

Вирівнювання послідовностей. В процесі еволюції генетичних послідовностей виникають як заміни нуклеотидів, так і їх вставки та делеції. Першим етапом філогенетичного аналізу є ідентифікація вставок і делецій, які мали місце в еволюційній історії групи послідовностей, які аналізуються. Цю процедуру називають вирівнюванням (alignment) послідовностей. Вирівнювання послідовностей направлене на виявлення гомологічних (тобто таких, які мають загальне еволюційне походження) позицій послідовностей, які аналізуються, встановлення найбільш вірогідного, тобто найменшого числа еволюційних подій [75, 144].

Процедуру вирівнювання слід розуміти як встановлення гомологічних ділянок генетичних послідовностей. Базовим принципом вирівнювання послідовностей є встановлення найбільш вірогідного сценарію їх еволюції, тобто такого сценарію, який потребує мінімального числа еволюційних подій: мінімального числа замін при мінімальному числі пробілів. Таким чином, метою вирівнювання є максимізація числа однакових нуклеотидів чи амінокислот в відповідних позиціях послідовностей при мінімізації числа необхідних для цього пробілів [75, 283].

З часом було розроблено декілька еволюційних моделей і методів визначення дистанції між нуклеотидними послідовностями (Модель Джукса-Кантора, Модель Кімури, Модель Таджими–Нея).

Модель Джукса-Кантора. Історично першою моделлю для розрахунку еволюційних дистанцій між послідовностями була запропонована у 1966 р. модель Джукса-Кантора (Jukes–Cantor model) [119]. Модель ґрунтується на тому, що вірогідність (частота) заміни будь-якого нуклеотиду на будь-який інший нуклеотид за одиницю часу є однаковою і складає α . Таким чином модель Джукса–Кантора є однопараметричною. Наприклад, якщо в аналізованій позиції послідовності знаходиться нуклеотид А, то за одиницю часу цей нуклеотид може бути замінений на нуклеотид Т, С чи G з однаковою частотою α . Таким чином, частота заміни А на будь-який інший нуклеотид за одиницю часу складає 3α [120].

Модель Кімури. Модель Кімури (Kimura model) ґрунтується на експериментальних даних про те, що частота транзицій, в загальному випадку, відрізняється від частоти трансверсій, що слід враховувати при розрахунку еволюційних дистанцій між послідовностями. Приймаючи до уваги різну частоту транзицій і трансверсій, модель Кімури припускає, що транзиція будь-якого нуклеотиду в розглядуваній позиції за одиницю часу відбувається з частотою α , а частота кожної з двох можливих трансверсій – β . Тобто, модель Кімури є двохпараметричною [247, 318].

Модель Таджими–Нея. Ця модель враховує неоднакову частоту зустрічаємості кожного з чотирьох нуклеотидів при розрахунку генетичних дистанцій між двома послідовностями. Модель Таджими і Нея ґрунтується на тому, що заміна будь-якого нуклеотиду на А відбувається з частотою α , будь-якого нуклеотиду на Т – з частотою β , будь-якого нуклеотиду на С – з частотою γ , і будь-якого нуклеотиду на G – з частотою δ [404].

Порівнянню різних методів розрахунку генетичних дистанцій та розробці статистичних підходів для вибору еволюційної моделі за допомогою комп'ютерних симуляцій присвячено велику кількість робіт [124, 195, 366, 403]. Вони використовуються в комп'ютерних програмах PAML, RAUP, MEGA [157, 259, 321, 364, 405].

Вибір моделі є критичною проблемою в молекулярній філогенетиці, він впливає на якість аналізів, у тому числі оцінки філогенії, рівня заміни, бутстреп-аналізу, тестів молекулярного годинника, а також оцінки ключових параметрів популяції, таких як генетична різноманітність, рекомбінації, ріст популяції та природний добір [124, 195, 364, 403]. Модель еволюції визначає зі статистичної точки зору ймовірність характеру змін в даних (нуклеотидних чи амінокислотних послідовностях) [157]. Так, для даних нуклеотидних послідовностей, наприклад, модель визначає ймовірність зміни А на Т, С, G або знов на А і аналогічно для інших нуклеотидів. Труднощі полягають у тому, що потрібно вибирати серед різноманітних моделей необхідну і оптимальну. Насправді, можливість вибору моделей в рамках суворої статистичної основи є однією з багатьох переваг [157]. Хоча існують загальні принципи при виборі оптимальної моделі, на практиці багато дослідників все ще покладаються на певні програми із замовчуванням значення параметрів і моделей, які використовуються для аналізу конкретної вибірки даних [270, 316], хоча численні дослідження показали, що філогенетичні методи менш точні або стають несумісними, якщо модель еволюції неадекватна поставленому завданню [182, 252, 316].

Філогенетичні дерева. Всі форми життя на Землі, як існуючі, так і викопні, мають спільне походження, і їхня еволюційна історія – це порядок їх дивергенцій від спільних предків. Чим менший час дві форми життя дивергували від загального предка, тим більш вони споріднені між собою. Завданням філогенетичного аналізу є встановлення, або реконструкція еволюційної історії – родинних зв'язків, відносин між формами життя - і датування еволюційних явищ, моментів дивергенцій. У філогенетичних дослідженнях еволюційні відносини між формами життя представляють у вигляді філогенетичних, або еволюційних дерев [109]. Філогенетичне дерево складається з внутрішніх та зовнішніх гілок, вузлів, і, якщо дослідником обрана відповідна опція, то й кореня. Порядок розташування всіх гілок дерева називають його топологією. Внутрішні гілки з'єднують внутрішні вузли, зовнішні гілки ведуть безпосередньо до об'єктів досліджень [109].

Об'єктами філогенетичного дослідження можуть бути гени або їх ділянки, нуклеотидні або амінокислотні послідовності, організми, популяції, індивідууми, штами вірусів, тощо. Такі об'єкти дослідження називають оперативними таксономічними одиницями, або OTU (operational taxonomic units) [105, 121, 311].

Дерева з коренем відображають напрямок еволюції, порядок брунькування, відгалуження різноманітних еволюційних ліній. Дерева без кореня показують родинні відносини між послідовностями, які аналізуються, але не напрямок еволюції. Напрямок від кореня до листків дерева є напрямок по низхідній лінії (аналогічно генеалогічному дереву, від предків до потомків). Напрямок від листків до кореня – висхідна лінія від потомків до предків [151, 306].

Внутрішній вузол представляє собою останнього загального предка для послідовностей, які відгалужуються від цього вузла. Внутрішні вузли відображають моменти дихотомії, біфуркації між двома еволюційними лініями, які знаходяться нижче: після цього моменту їх еволюція йшла незалежно одна від одної, виникла дивергенція двох еволюційних ліній (якщо аналізуються

біологічні види, то говорять про процес видоутворення). Чим менша сумарна довжина гілок, які поєднують дві послідовності і чим менше внутрішніх вузлів між ними, тим більш вони споріднені між собою. Корінь дерева є загальним предком для всіх послідовностей, які аналізуються [365].

Можливість одночасного розділення на три (або більше) лінії, тобто політомія, є предметом дискусії: чи дійсно ці лінії відділились одна від одної в один і той же момент часу, або ж це артефакт, наслідок того, що часовий проміжок між розділеннями цих ліній був невеликим. Існуючі інформаційні дані та сучасні аналітичні методи поки що не дозволяють розділити в часі ці події [109].

У філогенетичних деревах виділяють кластери, які об'єднують групи OTU, які мають загального предка. По-іншому таку групу називають кластер. При дослідженні молекулярно-генетичних характеристик ізолятів вірусу сказу в різних частинах світу дослідники часто в межах одного генотипу за ступеню гомології поділяють зразки на численні кластери [89, 110, 137, 170, 266, 332].

Комп'ютерні програми. Еволюційний аналіз проводиться за допомогою різних комп'ютерних програм. Зараз для вирішення різних питань еволюційного аналізу в світі розроблено сотні таких програм, але на практиці для роботи достатньо декількох.

Як правило, практична робота з генетичною інформацією являє собою отримання нових даних про генетичні послідовності, їх редагування та зберігання, порівняння з раніше отриманими в світі послідовностями, вирівнювання та філогенетичний аналіз. Така логіка практичної роботи відображена і в класифікації існуючих програм. У відповідності з поставленими задачами, комп'ютерні програми та бази даних можна класифікувати наступним чином:

- програми для зберігання і редагування послідовностей (наприклад BioEdit);
- бази даних, в яких зберігається міжнародна генетична інформація (наприклад GenBank, Entrez);

- програми для вирівнювання послідовностей (наприклад ClustalW);
- програми для філогенетичного аналізу послідовностей (наприклад PHYLIP, MEGA);
- програми для вирішення спеціальних завдань (наприклад RDP) [87, 93, 262, 282, 372, 411].

Області філогенетики і популяційної генетики пропонують широкий спектр інструментів для складного аналізу даних послідовностей вірусів. Обидва поля швидко розвиваються, розробляються нові і більш ефективні методи, які публікуються практично в кожному номері фахових журналів, що робить майже неможливим аналіз нових розробок в цих областях, а також у конкретних областях вірусології. Тому потрібно більш тісне співробітництво між вірусологами і біологами-еволюціоністами для опрацювання більшості з по-справжньому багатих наборів даних, що накопичилися на сьогоднішній день [373].

1.4. Антирабічний імунітет

Антитіла відіграють центральну роль в профілактиці багатьох захворювань інфекційної етіології, в тому числі й сказу. У той час як нейтралізація є основною функцією специфічних антитіл, то інші функції і комплемент-залежна активність цих багатофункціональних білків може мати вирішальне значення в забезпеченні захисту проти більшості вірусів [176, 132, 385].

Віріони вірусу сказу містить два основних антигени, які приймають участь у формуванні специфічного імунітету: глікопротеїн вірусної оболонки і внутрішній нуклеопротеїн. Встановлено, що вони спільно викликають утворення антирабічного імунітету, а рівень утворення віруснейтралізуючих антирабічних антитіл залежить від збереження трьохмірної структури глікопротеїну [458, 317, 150, 461, 181, 163].

Науковцями встановлено, що антитіла до внутрішнього нуклеопротеїну не в змозі нейтралізувати інфекційний вірус сказу, тому гуморальний антирабічний імунітет формується за рахунок антитіл до глікопротеїну вірусної

оболонки [276, 244]. Основна роль нуклеопротейну під час утворення специфічного імунітету до вірусу сказу полягає в активації Т-хелперів, які в свою чергу посилюють клітинну трансформацію для синтезу специфічних антитіл при потраплянні антигену вірусу сказу в макроорганізм. Через це нуклеопротейн у процесі формування антирабічного імунітету відіграє особливу роль. Крім того, на сьогодні є думки щодо перспективності використання нуклеопротейну для розробки антирабічних вакцин, так як його використання може забезпечити формування антирабічного імунітету до інших філогенетичних груп ліссавірусів [315]. Саме тому вченими проводяться дослідження щодо конструювання антирабічних вакцин на основі нуклеопротейну [315, 329, 180, 449, 425, 302].

Отже, фактично основним вірусним білком, який викликає в макроорганізмі утворення специфічних антирабічних віруснейтралізуючих антитіл є глікопротеїн [146, 186]. Саме тому багато наукових розробок були спрямовані на створення антирабічних вакцинних препаратів на основі глікопротеїну вірусу сказу [425, 292, 165, 161, 454, 243].

Сучасні вакцини проти сказу забезпечують необхідну кількість глікопротеїну сказу в місцях, багатих антигенпрезентуючими клітинами, щоб забезпечити індукцію виробництва достатньої кількості віруснейтралізуючих антитіл, а також активацію В- і Т-клітин пам'яті для попередження виникнення захворювання на сказ. Сучасне розуміння патогенезу вірусу сказу та засобів профілактики і контролю підтверджує важливість віруснейтралізуючих антитіл у захисті від цього захворювання [214, 406, 41].

В наш час достовірно встановлено, що основним критерієм напруженості імунітету до вірусу сказу є оцінка рівня специфічних антитіл у сироватках крові. Рівні віруснейтралізуючих антитіл, використовуються як доказ ефективності біологічних препаратів проти сказу та для спостереження за сказом [303]. Проведені різними авторами дослідження вказують на залежність ступеню захисту від рівня антирабічних віруснейтралізуючих антитіл [98, 82, 115, 452, 129, 453].

Титр антитіл (рівень) $0,5 \text{ MO/cm}^3$, який на сьогодні визнається в усьому світі як захисний, вперше згадується у восьмій доповіді Комітету експертів ВООЗ зі сказу (1992). Рівень в $0,5 \text{ MO/cm}^3$ був встановлений в якості показника достатньої імунної відповіді на введення вакцини у людей. У випадку зниження титру антирабічних віруснейтралізуючих антитіл нижче мінімально допустимого рівня, встановленого методом RFFIT, в осіб постійного або частого ризику зараження на сказ, необхідне введення бустерної дози вакцини [129, 419, 85].

В подальшому рівень $0,5 \text{ MO/cm}^3$ встановлено державними регулюючими органами в багатьох країнах світу (для країн Європейського Союзу Регламентом ЄС № 576/2013; в Україні Наказом МінАПК від 16.11.2018 № 553) для свійських тварин, як мінімально достатня відповідь на вакцинацію проти сказу [347, 347].

Велика кількість лабораторних експериментів і польових спостережень чітко демонструють, що коти і собаки, у яких виробляються антитіла після вакцинації та перед зараженням, мають дуже високу ймовірність пережити будь-яке зараження, незалежно від того, наскільки сильною була доза та який штам вірусу використовувався [80]. Саме тому, моніторинги популяційного імунітету після проведення антирабічної вакцинації людей і тварин базуються на результатах досліджень рівня гуморальної відповіді, тобто рівня специфічних антитіл до вірусу сказу в сироватках крові, для чого застосовують різні лабораторні методи [323, 465, 457, 104, 240, 245, 305, 126, 422, 190, 232].

1.4.1. Методи оцінки імунітету до вірусу сказу

На сьогоднішні відомо більше 15-ти методів *in vivo* й *in vitro*, за допомогою яких можна визначити наявність антитіл до вірусу сказу. Для будь-якого захворювання, при виборі відповідного аналізу оцінки титрів антитіл та інтерпретації значень можливі певні дискусії й протиріччя, але для летальної хвороби, такої як сказ, вони мають першорядне значення. Існуючі обмеження лабораторних досліджень для вимірювання рівнів антирабічних антитіл, а

також перевірка правильності і доцільності вибору методу, повинні ретельно розглядатися з точки зору усіх біологічних аспектів, проходити процес верифікації й валідації, особливо при інтерпретації результатів, з метою недопущення отримання сурогатних результатів захищеності від інфікування летальною дозою вірусу сказу [304, 303, 286].

Складність вимірювання рівнів антитіл до вірусу сказу часто ігнорується як фактор при дослідженні сказу, нагляді та оцінці вакцин/біологічних препаратів. Високий рівень смертності від сказу, унікальний патогенез вірусу, що дозволяє проводити вакцинацію як до, так і після контакту з вірусом, а також широкі можливості лабораторного тестування впливають на інтерпретацію серологічних досліджень. Проблеми виникають в очікуванні рівнів антитіл та їх значенні, відсутності розуміння характеристик ефективності методу, який використовується для отримання результатів, а також впливу типу зразка на результат. Рішення полягає в перегляді і перевірці методу, який визначає можливості та обмеження для досліджень. Точна інтерпретація результатів вимагає також чітко визначеної мети тестування, що, у свою чергу, спонукає до вибору методу на основі цих можливостей і обмежень. Не менш важливо розуміти, що характеристики аналізу є не тільки унікальними для методу, який розглядається, але також повинна бути доведена відповідність цим характерним параметрам в окремій лабораторії. Без методу та кваліфікації лабораторії, що визначається міжлабораторними порівняльними дослідженнями, не можна припустити ступінь точності, прецизійності, специфічності та чутливості. Ці принципи лабораторних досліджень жодним чином не є винятковими для серологічних досліджень на наявність антитіл до вірусу сказу, а є елементом загальної лабораторної практики. Проте перевірка імуногенної активності біологічних препаратів, визначення тривалості захисту та рівня гуморальної відповіді за допомогою вимірювання віруснейтралізуючих антитіл є критично важливими [41, 286, 449, 448].

Крім безпосереднього вибору методу досліджень існує ще один надзвичайно важливий критерій в системі оцінки антирабічного імунітету.

Визначення величини відсікання (тобто точки, яка свідчить про сероконверсію або напружений специфічний імунний захист після вакцинації) є специфічним для кожного методу і має вирішальне значення при інтерпретації результатів [286, 304, 80]. Але у рамках моніторингу кампаній вакцинації, єдиний пороговий рівень серопозитивності може бути відмінним для різних видів тварин і різних методів досліджень [303].

Першим розробленим методом визначення антитіл до вірусу сказу є реакція нейтралізації (РН) на мишах, розроблена L.T. Webster у 1935 р. [432]. Реакція володіє високою чутливістю і є одним із найточніших методів визначення антирабічних віруснейтралізуючих антитіл. На сьогодні цей метод застосовується в деяких країнах, в т. ч. в Україні, для визначення активності специфічних гіперімунних сироваток та антирабічного імуноглобуліну, хоча його можна застосовувати й для дослідження будь-яких сироваток на наявність антитіл до вірусу сказу.

Тест має ряд суттєвих недоліків, а саме: необхідність великої кількості тварин (для дослідження однієї сироватки необхідно близько 150 мишей), як наслідок великі фінансові витрати; значна тривалість дослідження (14–21 доба); використання інфекційного вірусу; використання референтного штаму CVS; досить значна варіабельність результатів. Враховуючи це, ще в 1973 р. Комітет експертів ВООЗ в своїх доповідях наголошував на необхідності розробки, удосконалення і впровадження у практику методів дослідження сироваток крові на наявність антирабічних антитіл *in vivo*. Звичайно, реакція нейтралізації *in vivo* відіграла свою надзвичайно важливу роль у системі боротьби зі сказом, так як була використана як еталонний тест при розробці й валідації методів *in vitro*, однак на сьогодні ВООЗ і МЕБ більше не рекомендують до застосування цю методику [286, 449, 448].

Альтернативою РН *in vivo* є методи оцінки антирабічного імунітету в культурі клітин *in vitro*. Існує два варіанти РН в культурі клітин, які найбільш широко використовуються: RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test), який розроблений в 1973 році J.S. Smith і FAVN (fluorescent antibody virus

neutralisation), розроблений в 1997 році F. Cliquet [175, 129, 218]. На сьогодні ці тести залишаються «золотими стандартами» серологічної оцінки антирабічної активності, так як ними визначаються рівні антирабічних віруснейтралізуючих антитіл.

Були проведені порівняльні тестування наявності антитіл проти вірусу сказу в трьох лабораторіях за допомогою РН на мишах і RFFIT. Використовували дві різні партії антирабічного імуноглобуліну, і кожен партію тестували в двох концентраціях. Результати цих досліджень показали, що РН на мишах і RFFIT можна використовувати як взаємозамінні для визначення рівнів антитіл до вірусу сказу, якщо результати виражати в МО відповідно до стандартної антирабічної сироватки [175].

Іншою групою дослідників було розроблено та оцінено мікротест під назвою FAVN, який є адаптацією оригінального швидкого тесту інгібування флуоресцентного фокусу (RFFIT). Специфічність оцінювали за допомогою 414 сироваток крові собак. Точність, визначена узгодженням між спостережуваними та очікуваними значеннями з використанням сироваток крові із відомими титрами, була задовільною. Зразки сироваток крові від невакцинованих і вакцинованих собак (з використанням сироваток крові з титрами близько $0,5 \text{ МО/см}^3$) аналізували на наявність антитіл проти сказу за допомогою тесту FAVN, RFFIT і РН на мишах: порівняльні результати, які отримані для тих же сироваток з трьома тестами показали добру відповідність. Крім того, відрізнити негативну сироватку від позитивної з низьким титром набагато легше за допомогою тесту FAVN, ніж за допомогою RFFIT [129].

Іншими тестами *in vitro*, які використовуються для оцінки антирабічних антитіл до вірусу сказу є тести на основі різних варіантів ELISA [430, 428, 130, 296].

На сьогодні кількість серологічних досліджень на наявність антитіл до вірусу сказу серед свійських тварин суттєво збільшилися, оскільки багато країн, вільних від сказу, змінили свої карантинні заходи та прийняли схему, яка вимагає вакцинації проти сказу з подальшим серологічним дослідженням. Для

цих досліджень рекомендовані тести віруснейтралізації (FAVN або RFFIT). Однак, ці діагностичні тести займають багато часу, відносно дорогі, вимагають висококваліфікованих спеціалістів, спеціалізованого обладнання та спеціальних лабораторних приміщень [430].

Крім того, оцінка ефективності кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу також вимагає проведення досліджень наявності специфічних антирабічних антитіл у цільових видів тварин. На жаль, більшість зразків сироваток крові лисиць насправді є «тілесними рідинами», взятими з трупів, і відсутність валідованого методу титрування цих сироваток низької якості унеможливила дослідження та порівняння ефективності різних протоколів пероральної вакцинації. Використовуючи просту та швидку методику ELISA для оцінки антирабічної активності сироваток крові диких лисиць, науковцями було отримане кількісне визначення антитіл, яке сильно корелювало з титрами віруснейтралізуючих антитіл, виміряними за допомогою FAVN-тест в культурі клітин. Було отримано результати дослідження лисячих сироваток крові з однаковим розподілом високих, середніх і низьких титрів у всіх категоріях якості сироваток (від високої до дуже низької якості) і тому був зроблений висновок, що тест-система на основі прямого варіанту ELISA (Bio Rad) дозволяє з високою точністю титрувати навіть забруднені рідини організму. Також було показано, що цей тест однаково здатний виявляти антитіла до вірусу сказу в зразках сироваток крові, взятих у лисиць, вакцинованих вірусом сказу (мутант SAG2 штаму SAD – Street Alabama Dufferin) або V-RG (рекомбінантним глікопротеїном вірусу сказу на основі вірусу коров'ячої віспи). Крім того, була продемонстрована кореляція між титрами, отриманими за допомогою цього набору ELISA (або FAVN-тест), і захистом від зараження лисиць польовим вірусом сказу. З огляду на отримані результати, автори цей простий і надійний тест пропонують для серологічних досліджень сироваток крові лисиць після кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу [130].

Інша біотехнологічна компанія розробила тест-систему для оцінки наявності антирабічних антитіл в сироватках крові тварин на основі непрямого блокуючого варіанту ELISA. Науковцями було оцінено специфічність, чутливість і надійність комерційної тест-системи ELISA виробництва компанії BioPro при тестуванні сироваток крові собак і котів. Специфічність, оцінена у 315 невакцинованих тварин, становила 100%. Відповідність 86,2% була отримана при порівнянні результатів з використанням тест-системи ELISA BioPro і FAVN-тесту у 701 зразку від вакцинованих собак і котів. Автори прийшли до висновку, що розроблена тест-система ELISA для виявлення антитіл до вірусу сказу в сироватка крові є цінним методом оцінки антитіл до сказу у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин, однак при поєднанні з тестами віруснейтралізації [430].

В інших дослідженнях тест-систему ELISA BioPro оцінювали та порівнювали з FAVN-тест і перевіреним іншим набором ELISA з використанням сироваток крові лисиць і єнотовидних собак, зібраних після кампаній пероральної вакцинації у Франції та Естонії. Специфічність досягала 100% у сироватці невакцинованих тварин. Висока відповідність (95 %) спостерігалася між BioPro ELISA та FAVN-тест, як для сироваток крові від лисиць, так і для сироваток крові від єнотовидних собак. Відповідність між BioPro ELISA та прямим варіантом ELISA досягла 96,5 % для сироваток крові від лисиць. Конкордантність була дещо нижчою для сироваток крові єнотовидних собак, зі значенням 82,8 % для BioPro ELISA та 78,4 % для FAVN-тест. Окремо варто зазначити, що антитіла до вірусу сказу були виявлені за допомогою тест-системи BioPro ELISA у тварин, вакцинованих різними типами вакцин, а також в сильно гемолізних сироватках крові. Тому автори роблять висновок, що набір BioPro ELISA є цінним тестом для оцінки ефективності пероральної вакцинації лисиць і єнотовидних собак проти сказу [428].

Отже, на сьогодні ВООЗТ, для серологічної оцінки антирабічного імунітету, рекомендує наступні тести: методи віруснейтралізації *in vitro* та ELISA [286].

1.4.2. Способи отримання та методи очистки гіперімунних антирабічних сироваток

Високоспецифічна антирабічна сироватка є складовим компонентом таких важливих методів діагностики сказу як РПФ, ІФА, FAVN тощо. Її отримують від тварин-продуцентів (морські свинки, білі миші, вівці, кролі, сірійські хом'яки, коні, віслюки, ВРХ), яких імунізують різноманітними антигенами вірусу сказу [45, 20, 236, 4, 429, 139, 205, 342].

Комітет експертів ВООЗ [449, 448] стверджує, що для виготовлення діагностичних антирабічних сироваток необхідно використовувати хом'яків та морських свинок. Підбираючи донорів слід враховувати, що від дрібних лабораторних тварин вдається отримати незначну кількість крові при затраті великої кількості тварин, техніка відбору ускладнена розмірами тварин. З іншого боку використання великих тварин обмежується високою їх вартістю та складнощами при утриманні. З цієї причини широко використовують кролів [45, 236]. Вперше кролячу антирабічну сироватку з високим титром віруснейтралізуючих антитіл приготував Habel у 1945 р. В Італії в період 1974-1975 рр. було виготовлено 14,8 л антирабічної сироватки крові кролів [84]. Отримані від кролів сироватки крові виявилися стабільними при зберіганні, мали виразні преципітуючі властивості, імуноглобулінова фракція їх легко піддавались очищенню. Такі антирабічні сироватки, маючи високу авідність і афінність, придатні для використання у чутливих імунологічних тестах [342].

Однією з головних вимог до майбутніх тварин-продуцентів гіперімунної антирабічної сироватки є їхня «неімунність», тобто відсутність контакту з іншими вакцинними антигенами до проведення антирабічної гіперімунізації. Для отримання кінського антирабічного імуноглобуліну відбирають коней, раніше не імунізованих іншими антигенами, оскільки вони мають більшу кількість α , β , γ - глобулінів при повній відсутності Т- (бета₂) компоненту [205].

Обрана схема імунізації безпосередньо впливає на якість отриманих сироваток. Так, у сироватках крові коней відбувалося збільшення рівня імуноглобулінів Ig G на перших циклах імунізації [440]. Ефективність

скорочених схем імунізації забезпечується проміжком між ґрундімунізацією та послідуєчими ін'єкціями вакцини. Проміжок має становити не менше 5-7 діб для забезпечення бустерного ефекту наступного введення антигену [441]. В той же час відомо, що клон імунологічної пам'яті, який здатний реагувати по вторинному типу, формується тільки на 30 добу після первинного введення антигену вірусу сказу, а оптимальним інтервалом між послідуєчими ін'єкціями є період не менш як 14 діб [382].

Відомий спосіб отримання гіперімунної антирабічної сироватки з крові вівці. Імунізацію тварин проводять п'ятикратно з інтервалом 14 днів, використовуючи внутрішньошкірне та внутрішньом'язове введення антигену вірусу сказу з ад'ювантами (ад'юванти Фрейнда та гідроокис алюмінію) в 3-4-2 точки, а виділені сироватки мають титр в тесті інгібіції фокусів флуоресценції 1:10240-20480, а в реакції дифузної преципітації – 1:16-32 [345].

Бабкін М.В. зі спів. використовували п'ятиразову імунізацію овець інактивованим 7% тканинним антигеном вірусу сказу (штам CVS), додатково застосовували інактивованим очищений культуральний штам "Щелково-51С". Імунізацію здійснювали в 5-4-5 точок тіла тварини з інтервалом введення 14 діб внутрішньошкірно та внутрішньом'язово, з використанням ад'ювантів та аеросилу [4].

Новіцька О.В. застосовувала у своїй роботі схему гіперімунізації кролів породи шиншила, яка включала п'ятиразове введення вакцини КоКАВ на 1-у, 3-ю, 7-у, 14-у і 30-у добу у дозі 1 см³ з додаванням 25 % ад'юванту (мінеральне масло Montanide ISA 25) на 1-у і 14-у добу, внутрішньом'язово у ділянку стегна. Рівень віруснейтралізуючих антитіл на 45 добу від початку імунізації антигеном з ад'ювантом складав $10,39 \pm 0,7 \log_2 \text{ЕД}_{50}$ [45].

До основних параметрів, від яких залежить ефективність імунізації, належить вид відібраних для імунізації тварин, спосіб імунізації, час отримання імунної сироватки, природа та доза імуногену [20]. Чужорідні антигени, які вводять лабораторній тварині або людині, суттєво відрізняються за здатністю викликати утворення антитіл. Одні з них індукують переважно специфічну

імунологічну ареактивність, тоді як інші можуть викликати процес утворення антитіл різної сили та тривалості за участю різних класів антитіл та формування імунологічної пам'яті, треті є практично недійовими. Для вирішення цієї проблеми застосовують ад'юванти. Застосування ад'ювантів дозволяє зменшити кількість введеного антигену та підвищити титр відповідних антитіл в сироватках тварин-донорів [171].

Відомо десятки речовин органічної та неорганічної природи, котрі здатні проявляти ад'ювантну дію. В якості ад'ювантів використовують мінеральні з'єднання (гелі гідроксиду і фосфату алюмінію), полімерні речовини, складні хімічні суміші (ліпополісахариди, білково-ліпополісахаридні комплекси, мураміддипептид і його похідні, та ін.), бактерії та компоненти бактерій, ліпіди і емульгатори (ланолін, арлацел), речовини, які викликають запальну реакцію (сапонін, скипидар) та багато інших [460, 326, 384, 467, 164, 258, 275].

Механізм дії ад'ювантів досить складний і до кінця не вивчений, проте більшість вчених виділяють два основних:

- дія на антиген через зміну властивостей самого антигену;
- дія на організм, шляхом стимуляції функції імунної системи [384, 258, 460].

Ад'юванти викликають на місці ін'єкції запальну реакцію з утворенням гранульоми, яка може зберігатися протягом тривалого часу. Внаслідок цього антиген зберігається, депонується на місці ін'єкції й повільно виводиться із «депо». Тривалий вихід антигенів створює більш виражену імунну відповідь та імунну пам'ять. Але при цьому головною умовою вважається стабільність антигену протягом всього цього часу [164].

Дія ад'ювантів на організм ґрунтується на неспецифічній імуностимулюючій дії. Вона зводиться до збільшення продукування клітинами організму відповідних цитокінів – медіаторів імунної відповіді. Також ад'юванти посилюють реакції зі сторони лімфатичних вузлів, активують систему комплементу, стимулюють проліферацію, диференціацію та функціональну активність Т- та В-клітин, посилюють синтез захисних білків

організму. Залежно від виду, ад'юванти можуть посилювати або клітинну, або ж гуморальну ланку імунітету. Є й такі, які посилюють обидва види імунітету, але незалежно від цього кожен ад'ювант має свої переваги та недоліки, усунути які – завдання для сучасної науки [142].

Одноразове щеплення собак антирабічною вакциною, яка містить $Al(OH)_3$ викликало утворення більш високих титрів віруснейтралізуючих антитіл, ніж у щеплених несорбованою вакциною [255]. Різні дослідники успішно використовують ад'ювант Фрейнда для отримання антирабічних сироваток, який у більшості видів тварин підсилює синтез антитіл класу Ig G [286, 396]. Так, Koutchoukali M.A. et al. (1985) успішно отримала антисироватку для постановки ELISA від кролів, імунізованих очищеним вірусом з повним ад'ювантом Фрейнда (ПАФ) [255]. Однак застосування ПАФ та НАФ (неповний ад'ювант Фрейнда) потребує ретельного контролю за компонентами ад'юванту та якістю емульсії. Практичне значення має застосування в якості ад'юванту при виробництві антирабічної вакцини феракрілу, який підвищує вірулецидну активність димеру етиленеміну та одночасно слугує стимулятором імуногенності, а також інозимплексу, який стимулює продукцію віруснейтралізуючих антитіл протягом першого тижня [70].

Дослідники використовували для порівняння схему гіперімунізації, яка включала антиген та класичний ад'ювант (ПАФ) та схему, в основі якої був антиген та імунокоректор тимоген. В результаті застосування схеми з ад'ювантом імунна відповідь розвивалась лише у 25–30 % імунізованих тварин, при цьому тривалість імунізації складала 2,5–3 місяці. Застосування схеми гіперімунізації з імунокорегуючим препаратом дозволило значно скоротити дозування антигенного матеріалу (із 7550 мкг до 450 мкг) та тривалість процесу імунізації (з 35 до 22 днів), при цьому збільшувався вихід цільового продукту за рахунок підвищення синтезу антитіл у тварин [125].

Результати різних груп науковців свідчать про стимуляцію цитокінами (інтерлейкіни (ІЛ), інтерферони (ІФ) α , β і γ , фактори некрозу пухлин α і β) імуногенної активності вакцини проти сказу [299, 464, 274, 369]. Найбільш

виражений захист спостерігали за застосування разом з вакциною комплексу рекомбінантних цитокінів, які збільшували виживаність експериментальних тварин в 7,3 рази [389].

Є, також, інформація про використання у якості ад'юванту структурних одиниць вірусу сказу [289, 179]. Після імунізації ДНК, сорбованої на золотих намистах, протективний імунітет триває понад 300 діб, що має велике практичне значення для лікувально-профілактичних заходів та отримання діагностичних сироваток [272].

Окремим перспективним методом отримання високоактивних специфічних сироваток та імуноглобулінів є використання Ig Y, виділеного з яєць птахів, оскільки Ig Y є домінуючим класом антитіл у сироватці крові, який продукується після Ig M за первинної гуморальної відповіді, і є головним ізотипом за вторинної імунної відповіді, що визначає його функціональну схожість з Ig G ссавців [370, 264]. Ig Y зустрічається у амфібій, птахів і рептилій, і є аналогом Ig G ссавців [468].

З Ig Y курячих яєць розроблені препарати для профілактики кишкового колибактеріозу, стафілококозу, рота- і коронавірусної інфекції у людей [469, 156, 254]. Суттєвою перевагою Ig Y порівняно з отриманням антитіл від ссавців є те, що постійна фізіологічна продукція яєць забезпечує потокове отримання імуноглобуліну без травмування при взятті крові або ж тотального обезкровлення тварин-продуцентів [260, 468].

Вченими з Японії було проведено отримання і маспектрометричні дослідження жовткових антитіл (Ig Y) до вірусу сказу. Було встановлено, що молекулярна маса важкого ланцюга Ig Y більша, ніж у його аналога у ссавців, тоді як молекулярна маса легкого ланцюга Ig Y – менша. Після розщеплення пепсином Ig Y до вірусу сказу розкладається до Fab, на відміну від Ig G ссавців, який розкладається до F(ab')₂ за тих самих умов. Однак, виявлені відмінності не знижують теоретичного діагностичного значення антирабічних Ig Y [399].

Таким чином, процес отримання якісної специфічної високоактивної сироватки крові залежить від багатьох факторів (вибір донора, схеми імунізації,

способу аплікації антигену, його кількості та чистоти), які слід обов'язково враховувати [286, 449].

Після отримання специфічної гіперімунної сироватки крові важливим етапом є виділення необхідної фракції білків – імуноглобулінів. Білки – це високомолекулярні азотовмісні органічні речовини, молекули яких побудовані із залишків амінокислот. Сироватка крові за своїми фізико-хімічними характеристиками є сумішшю різних білків, для фракціонування яких використовують різноманітні методи: висолювання, теплову денатурацію, осадження органічними розчинниками, хроматографію, електрофорез, розподіл в двофазних системах, кристалізацію тощо [167, 213, 303].

Розчинення білків у воді пов'язано з гідратацією кожної молекули, що призводить до утворення навколо білкової глобули водних (гідратних) оболонок, що складаються з орієнтованих в просторі в певній формі молекул води [167].

Вода, що входить до складу гідратної оболонки, за своїми хімічними і фізичними властивостями відрізняється від чистого розчинника. Так, наприклад, температура замерзання її становить мінус 40 °С. У такій воді гірше розчиняються цукри, солі та інші речовини. Розчини білків вкрай нестійкі, і під дією різноманітних факторів, що порушують гідратацію, білки легко випадають в осад, тому при додаванні до розчину білка будь-яких речовин, що відбирають воду (спирт, ацетон, концентровані розчини нейтральних солей лужних металів), а також під впливом фізичних факторів (нагрівання, опромінення і ін.) спостерігаються дегідратація молекул білка і їх випадання в осад [99].

Висолювання – метод, яким зазвичай користуються в клінічній практиці при аналізі білків сироватки крові та інших біологічних рідин, а також в ензимології для попереднього осадження і видалення баластних білків або виділення досліджуваного ферменту. Суть методу полягає в тому, що при додаванні розчинів солей лужних металів відбувається осадження білків з розчину. Зазвичай білок не втрачає здатності розчинятися знову в воді після видалення солей методами діалізу або гел'єхроматографії [204].

Різні білки висолюють з розчинів при різних концентраціях нейтральних розчинів сульфату амонію. Тому даний метод знайшов широке застосування в лабораторній практиці для поділу глобулінів (випадають в осад при 50% насиченні) і альбумінів (випадають при 100% насиченні) [193, 172].

На величину висолювання білків впливають не тільки природа і концентрація солі, але і рН середовища і температура. Головну роль при цьому відіграє валентність іонів [328].

Більш детальний поділ білків плазми крові на фракції досягається при використанні різних концентрацій етанолу при низькій температурі (від мінус 3 до мінус 5 °С). В таких умовах білки зберігають свої властивості [417].

Найбільшого поширення останнім часом отримали такі методи розділення білків, як хроматографічні та електрофоретичні [173, 202, 212, 327, 135, 185].

Хроматографія – метод, заснований на здатності пігментів (або будь-яких інших забарвлених і нефарбованих речовин) специфічно адсорбуватися на адсорбенті. В результаті відбувається поділ аналізованих речовин і їх концентрування в певному шарі адсорбенту. Потім через колонку пропускають відповідні елюенти, як послаблюють сили адсорбції і виносять зі струмом індивідуальні речовини розчину. Останні послідовно збирають в колекторі фракцій (принцип сорбції-десорбції) [444].

Ефективним способом фракціонування білків із суміші є колонкова хроматографія з гідроксилапатитом, різними іонообмінними смолами і похідними целюлози в якості носіїв [183, 288].

При виділенні і очищенні білків використовують чотири основних типи хроматографії: адсорбційну, розподільну, іонообмінну та афінну (хроматографія по спорідненості) – відповідно до різних фізичних і хімічних механізмів, що лежать в основі кожного з них [444].

Зараз хроматографія широко застосовується не тільки для виділення білків, але і для поділу безлічі інших органічних і неорганічних речовин, що входять до складу живих організмів [223].

Адсорбційна хроматографія – полягає в тому, що поділ компонентів суміші заснований на їх різному сорбуванні на твердому адсорбенті. Як адсорбенти використовують активоване деревне вугілля, гель фосфату кальцію, оксиди алюмінію або кремнію [78].

Адсорбент у вигляді суспензії з розчинником вносять в скляну вертикальну трубку (колонку) і рівномірно в ній «упаковують». Зразок в невеликій кількості розчинника наносять на колонку – компоненти суміші, що адсорбуються на адсорбенті. Після цього приступають до стадії звільнення – десорбції компонентів з колонки, застосовуючи відповідні елюенти. Збір фракцій здійснюють за допомогою автоматичного колектору фракцій [393, 123].

Розподільна хроматографія. В цьому різновиді хроматографії на відміну від адсорбційної, тверда фаза служить тільки опорою (основою) для стаціонарної рідкої фази. Здійснюється на колонках, так само як і адсорбційна хроматографія. Як стаціонарну фазу застосовують вологий крохмаль або силікагель. Зразок розчиняють у відповідному розчиннику, потім наносять на колонку. Речовини, що піддаються багаторазовому розподілу між нерухомою стаціонарною фазою (водний шар) і рухомою фазою органічного розчинника, з різною швидкістю переміщаються на дно колонки. За допомогою колектору фракції збирають проби, що містять одну речовину, потім з'єднують проби для виділення цієї речовини в чистому вигляді [434, 287].

Іонообмінна хроматографія – полягає в тому, що іонообмінні смоли є полімерними органічними сполуками, що містять функціональні групи, здатні залучатися до іонного обміну. При цьому розрізняють позитивно заряджені аніонообмінники, представлені органічними основами і амінами, і негативно заряджені катіонообмінники, що містять фенольні, сульфо- або карбоксильні групи. З сильно- і слабоосновних аніонообмінників частіше використовують похідні полістиролу і целюлози, що несуть функціональні групи [444, 183].

Афіна хроматографія (хроматографія по спорідненості) – заснована на принципі виборчої взаємодії білків (або інших макромолекул) з закріпленими

(імобілізованими) на носії специфічними речовинами – лігандами, якими можуть бути субстрати або коферменти (коли виділяють будь-який фермент), антигени (або антитіла), гормони або рецептори тощо [246].

Гель-хроматографія, або метод молекулярних сит, який широко використовують в препаративних цілях, особливо при очищенні білків від домішок. При обробці епіхлоргідрином полісахариду декстрану утворюються різного ступеня вираженості поперечні зв'язки, які призводять до формування великих гідрофільних зерен, нерозчинних у воді – сефадекси. Завдяки великій гідрофільності зерна сильно набухають у водному середовищі з утворенням гелю, яким заповнюють хроматографічну колонку. Поділ речовин цим методом ґрунтується на тому, що великі молекули не проникають у внутрішню водну фазу гелю, що є стаціонарною, і залишаються зовні, рухаючись разом з рухомою фазою вниз вздовж колонки. Невеликі ж молекули, навпаки, вільно дифундують всередині зерен, утворюючи рівноважну систему між рухомою і стаціонарною фазами, і, відповідно, з меншою швидкістю рухаються уздовж колонки. За допомогою сефадексу поділяють білки з різною молекулярною масою [223, 320, 152, 446, 76].

Таким чином, перераховані вище методи, при застосованні в певній послідовності, дозволяють отримати специфічний білок в очищеному стані. Однак такий білок все ж не позбавлений деяких домішок солей. Для того щоб повністю звільнити білок від низькомолекулярних домішок, в даний час використовують методи діалізу, гел'єхроматографії, кристалізації, ультрафільтрації [145, 438, 206, 154].

При діалізі застосовують напівпроникні мембрани – целофан, колодійну плівку, у яких діаметр пор варіює в широких межах. Через таку мембрану білки, як правило, не дифундують, а ось низькомолекулярні речовини легко проникають в навколишнє середовище [206]. При кристалізації білки досягають критичної точки початку осадження з розчину сульфату амонію при повільному підвищенні температури. Таким способом отримані вже сотні кристалічних білків. Але так як при одній і тій же концентрації розчину сульфату амонію

можуть кристалізуватися близькі за розмірами і масою різні білки, то не всякий кристалічний білок є гомогенним [193].

Слід визнати, що все-таки, кращі результати при звільненні білків від низькомолекулярних домішок, отримують за допомогою таких методів, як гельхроматографія і ультрафільтрація [152, 438].

При ультрафільтрації продавлюють розчини білка через спеціальні мембрани, що затримують білкові молекули, що дозволяє не тільки звільнити білкові розчини від низькомолекулярних домішок, але і контролювати їх [145].

Отже, все вищесказане свідчить про вагоме значення білків, що складають основу структури і функцій всіх живих організмів. Білки займають особливе місце в різноманітних перетвореннях речовин. Для вивчення хімічного складу і структури білків обов'язковою умовою є їхнє отримання з природних джерел в чистому стані, для чого розроблені ефективні методи фракціонування білкової суміші на індивідуальні білки.

1.4.3. Стандартизація і контроль антирабічного імуноглобуліну при визначенні гуморального імунітету за сказу тварин

Документи, в яких вперше була порушена проблема стандартних зразків, відносяться до 27-го засідання Ради ISO (International Organization for Standardization) в 1973 році у Вашингтоні, на якому була заснована спеціальна група для подальшого вивчення пропозицій по створенню Комітету зі стандартних зразків. Рішення про перетворення спеціальної робочої групи до Комітету Ради зі стандартних зразків – REMCO (референції Material Committee of ISO) відбулося у вересні 1975 р [349].

Вимоги до порядку атестації та статистичними принципам розрахунку метрологічних характеристик стандартних зразків сформульовані в Керівництвах ISO REMCO: ISO Guide 30, 31, 33, 34, 35, які в даний час оновлені [224, 225, 226, 227, 228, 409].

У Керівництві ISO 30 Терміни та визначення, що використовуються в області стандартних зразків (ISO Guide 30: 1992 Reference materials – Terms and

definitions used in connection with reference materials) наведені визначення стандартних зразків, їх класифікація (CRM, RM) та ієрархія (первинний, вторинний) [224].

Більш детально терміни та визначення, що застосовуються в області розробки стандартних зразків, наведені в Міжнародному словнику основних і загальних термінів по метрології (International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms, VIM) [225].

Важливим аспектом визначення антитіл до вірусу сказу є необхідність калібрування позитивних контрольних сироваток, які використовуються для рутинних досліджень [400, 383].

Найбільш поширеними методами таких досліджень є реакція нейтралізації (РН) на білих мишах, FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralisation) або ж RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) в культурі клітин [201, 129, 175, 218, 253, 256]. Суть цих методів полягає у нейтралізації постійної дози вірусу рядом послідовних розведень дослідної сироватки і порівняння результатів із стандартною (референтною) сироваткою [286].

Перший оригінальний міжнародний еталон антирабічної сироватки, яку отримали з вакцинованих коней, був створений в 1955 році на основі ліофілізованої маси продукту 86,6 мг в одній ампулі (1 см³). Враховуючи це, було призначено значення специфічної активності в 86,6 МО/см³ [256, 286, 278].

Вперше людський стандарт антирабічного імуноглобуліну ВООЗ отримала з об'єднаних проб сироваток крові від вакцинованих проти сказу людей. Активність останнього була визначена на підставі міжлабораторних випробувань проти стандартного імуноглобуліну з сироватки крові коня методом RFFIT в шести різних лабораторіях. Після статистичного аналізу в 1984 році, була призначена активність в 59 МО/см³ для Першого міжнародного стандарту імуноглобуліну людини. Аналогічним чином, другий пул сироваток від вакцинованих людей був випробуваний в 1993 році і йому присвоєно активність 30 МО/см³ [277, 174].

Відносна активність Першого і Другого стандартів антирабічного імуноглобуліну людини була оцінена в 1997 і 2006 роках. Порівняння показало зменшення відносної активності Першого Міжнародного стандарту відносно Другого на 2,5 % в 1997 році і на 14 % в 2006 році. Ці відмінності не вважалися статистично значущими, але вони ілюструють ефект використання різних еталонних стандартів у разі порівняння результатів антирабічної серологічної відповіді і важливість моніторингу контролю якості стандартів [304].

Отже, на сьогодні головним стандартом антирабічної сироватки, який придатний для досліджень титрів антирабічних антитіл методами *in vivo* та *in vitro*, є Другий міжнародний стандарт антирабічного імуноглобуліну людини (The 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human). Цей препарат (об'єднаний зразок сироваток крові вакцинованих людей) був вироблений і апробований в лабораторії біологічних стандартів SSI (Копенгаген, Данія) в 1993 році. Власником і розповсюджувачем міжнародних стандартів є Національний інститут біологічних стандартів і контролю (NIBSC, Великобританія). Випуск Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини, як й інших міжнародних стандартів антирабічних препаратів, досить обмежений, тому він не рекомендується для рутинного використання, а тільки для калібрування національних стандартів [450, 449].

Для прикладу, в Китаї розроблено вже шостий національний стандарт антирабічного імуноглобуліну з активністю 39 МО в кожній ампулі [383].

Лабораторії ВООЗТ (МЄБ) для проведення діагностичних досліджень розробили стандартну позитивну антирабічну сироватку крові собак, яку виготовила Європейська референс-лабораторія зі сказу ANSES (Франція). Цей стандартний біологічний препарат призначений для оцінки напруженості антирабічного імунітету методами *in vitro* у свійських тварин, а також для порівняння з національними робочими стандартами антирабічної сироватки .

Основне використання схвалених ВООЗТ міжнародних довідкових стандартів полягає в гармонізації серологічного тестування та сприянні взаємному визнанню результатів тестування для міжнародної торгівлі.

Перша партія еталонної сироватки МЕБ собачого походження була вироблена в 1991 році і широко використовувалася на міжнародному рівні. Її активність була визначена міжлабораторними порівняльними дослідженнями на рівні $6,7 \text{ MO/cm}^3$ [127].

Підготовка нової партії почалася в 2012 році і були відібрані три комерційні вакцини для імунізації собак відповідно до рекомендацій МЕБ. У 2013 році калібрування було завершено за допомогою міжлабораторного випробування за участю п'яти референс-лабораторій МЕБ зі сказу в порівнянні з Другим міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну людини, який використовувався як еталонний стандарт у цьому калібруванні. Після статистичного аналізу результатів консенсусний титр був встановлений як $5,59 \text{ MO/cm}^3$. У лютому 2014 року Комісія з біологічних стандартів МЕБ прийняла цю сироватку як стандартний реагент для проведення серологічних досліджень з визначення антитіл до вірусу сказу [429].

Широке використання стандарту антирабічного імуноглобуліну ВООЗТ є запорукою уніфікованого підходу до лабораторної практики в питаннях серологічного контролю напруженості імунітету до вірусу сказу. Впровадження стандартів та системи міжнародного нагляду шляхом періодичних професійних тестувань гарантує функціонування ефективного систему контролю сказу [431].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

Узагальнюючи огляд наукових джерел варто зазначити, що на сьогодні, у зв'язку із широким використанням GPS (global positioning systems) значно розширилися можливості для проведення епізоотологічної (епідеміологічної) оцінки прояву сказу. Просторово-часвий аналіз поширення сказу дає змогу вивчати і встановлювати специфічні угруповання (кластери) випадків сказу, прояв сказу на певних природно-географічних територіях і в екологічних нішах тварин-резервуарів збудника інфекції, регіональні молекулярно-біологічні характеристики ізолятів вірусу сказу на обмежених територіях і цілих континентах, їхню гостальну приналежність, еволюцію вірусу сказу на певній місцевості тощо [203, 418, 325, 221, 200, 196, 416, 344]. А також для оцінки ефективності проведених специфічних антирабічних заходів із формулюванням науково-обрунтованих висновків про можливість корегування або удосконалення проведення загальних та спеціальних ветеринарно-санітарних заходів [410, 184, 200].

Заходи з профілактики сказу серед тварин і ліквідації вогнищ інфекції в Україні досить чітко регламентовані [6, 62]. А стратегія боротьби зі сказом базується на впровадженні визначеного комплексу антирабічних заходів, направлених на профілактику та ліквідацію сказу серед основних резервуарів цього захворювання і включає в себе: парентеральну і пероральну імунізацію та епізоотологічний моніторинг [6, 11, 8, 35, 47, 66, 12, 13].

Доведено, що лисиця є резервуаром і головним джерелом збудника сказу (більше 90 % діагностованих випадків у диких тварин) і забезпечує контакти з собаками і котами, що обумовлює загрозливу епідемічну ситуацію щодо сказу [33, 8]. Саме тому аналіз існуючої системи боротьби зі сказом тварин і удосконалення системи профілактики сказу серед диких тварин є актуальним завданням.

Епізоотологічний моніторинг сказу базується на результатах лабораторних досліджень патологічного матеріалу від тварин. У випадку сказу немає чітких патогномонічних уражень, а також специфічних і постійних клінічних ознак

захворювання, тому заключний діагноз можна поставити лише в лабораторії [64].

На сьогодні розроблені і стандартизовані багато тестів для лабораторної діагностики сказу, які базуються на виділенні вірусу сказу, ідентифікації антигену вірусу сказу, або на дослідженні наявності генетичного матеріалу вірусу. Ідентифікація збудника проводиться за допомогою первинних діагностичних тестів, таких як реакція прямої імунофлуоресценції (РПФ, або DFA тест), прямий швидкий імуногістохімічний тест (dRIT) або полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР, або PCR). Тести DFA, dRIT і PCR дають надійний діагноз у 98-100 % випадків для будь-яких штамів ліссавірусів, якщо використовується відповідний кон'югат або праймер/зонд [286, 359, 360].

Однак, РПФ є базовою реакцією, яка найбільш швидка і доступна в діагностиці сказу. Ця реакція використовується в багатьох країнах світу, в т. ч. і в Україні [286, 359, 360]. Тому, така ситуація вимагає розробки ефективної вітчизняної діагностичної тест-системи для імунофлуоресцентної діагностики сказу.

Наявність різних методів лабораторної діагностики сказу вимагає удосконалення системи лабораторної діагностики цієї інфекції з врахуванням сучасних досягнень науки. Виділення вірусу в культурі клітин є більш перспективним ніж біологічна проба і дозволяє виділити вірус через 24–48 годин, замість 7–28 діб. Найбільш чутливою культурою для виділення вуличного вірусу сказу є нейробластома миші (С-1300, клон NA), яка не потребує адаптації вуличних ізолятів вірусу сказу в зв'язку із її невральним походженням [91]. Тому впровадження виділення вірусу сказу в культурі клітин може замінити біологічну пробу на білих мишах і доповнити систему лабораторної діагностики новим чутливим методом.

Для ідентифікації вірусу сказу все ширше застосовуються методи аналізу геному збудників хвороб, а саме дот-гібридизація і полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) [367, 312, 436, 207, 110, 208, 392, 102, 169, 168, 295, 92, 332].

Широке впровадження методу ПЛР не тільки в наукові дослідження, а й також у лабораторну діагностику сказу в багатьох лабораторіях світу стало основою для того, щоб з 2018 року цей метод включений як діагностичний тест в Керівництві діагностичних тестів МЕБ (ВООЗТ) [286]. Тому розробка протоколів реакції і впровадження в лабораторну практику методу виявлення геному вірусу сказу дасть змогу доповнити експрес-метод РПФ іншим експрес-методом – ПЛР.

Впровадження ПЛР в лабораторну практику може знайти наукове продовження при дослідженні молекулярно-генетичних властивостей ізолятів вірусу сказу в Україні. На сьогодні розроблено декілька еволюційних моделей і методів визначення дистанції між нуклеотидними послідовностями і апробовано статистичні підходи для вибору еволюційної моделі за допомогою комп'ютерних симуляцій [119, 120, 318, 247, 404, 124, 366, 403, 157, 321, 259].

Система лабораторної діагностики сказу не може бути повною без врахування методів оцінки специфічного гуморального антирабічного імунітету [286]. Велика кількість експериментів чітко демонструють, що свійські тварин, у яких виробляються антитіла після вакцинації, мають дуже високу ймовірність пережити будь-яке зараження, незалежно від того, наскільки сильною була доза вірусу [80]. Саме тому, моніторинги популяційного імунітету після проведення антирабічної вакцинації тварин базуються на результатах досліджень рівня гуморальної відповіді, тобто рівня специфічних антитіл до вірусу сказу в сироватках крові, для чого застосовують різні лабораторні методи [323, 465, 457, 104, 240, 245, 190, 232].

Дослідження антирабічного імунітету є етапом отримання антирабічних гіперімунних сироваток, яка є складовим компонентом таких важливих методів діагностики сказу як РПФ, ІФА, FAVN тощо. Її отримують від тварин-продуцентів (морські свинки, білі миші, вівці, кролі, сірійські хом'яки, коні, віслюки, ВРХ), яких імунізують різноманітними антигенами вірусу сказу [45, 20, 236, 4, 429, 139, 205, 342].

Дослідження напруженості антирабічного імунітету у тварин і людей регламентовані та уніфіковані на рівні ВООЗ і ВООЗТ [286, 449, 448, 359, 360]. Уніфікація досліджень антирабічного імунітету стала можливим після впровадження у лабораторну практику стандартів антирабічного імуноглобуліну. Впровадження стандартів та системи міжнародного нагляду шляхом періодичних професійних тестувань гарантує функціонування ефективної системи контролю сказу [431]. Однак, в зв'язку із обмеженими серіями стандартів антирабічного імуноглобуліну та стандартної антирабічної сироватки крові ВООЗ рекомендує розробляти відповідні національні стандарти для рутинного використання в лабораторних дослідженнях [450, 449].

Отже, враховуючи проаналізовані наукові тенденції в дослідженні сказу тварин варто зазначити, що просторово-часова характеристика прояву сказу та розробка засобів і методів лабораторної діагностики сказу на сьогодні є актуальними науковими завданнями.

РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ

Дисертаційна робота виконувалася на базі лабораторії нейроінфекцій та «Науково-дослідного центру з питань вивчення та профілактики сказу в Україні» Інституту ветеринарної медицини НААН (2013–2023 рр.) і науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (2018–2022 р.).

Окремі молекулярно-генетичні дослідження та секвенування виконано в National Veterinary Research Institute (м. Пулави, Польща) за науково-консультативної допомоги Prof. Jan F. Żmudziński, Dr. Hab. Marcin Smreczak та Dr. Anna Orłowska та в Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife (ANSES, Франція) за допомоги Emmanuelle Robardet.

Експерименти на тваринах проводили відповідно правил, прийнятих Європейською Конвенцією із захисту хребетних тварин, що використовують для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Відомості ВР, 2010 р.) [18, 147, 407].

2.1 Матеріали

Вірус сказу.

- Для отримання культурального антигену вірусу сказу використовували вакцинний штам Щолково-51 К, одержаний в лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН та задепонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) 23.05.2002 р. (реєстраційний номер 206), 64 пасаж у культурі клітин ВНК-21, інфекційна активність 6,0-6,3 lg МЛД₅₀/см³. Вакцинний штам вірусу сказу зберігали у ліофілізованому стані за температури +4-8 °С.

- Для постановки реакції нейтралізації на білих мишах використовували вірус сказу, референс-штам CVS (20%-а суспензія інфікованого мозку мишей), задепонований 25.02.2002 р. в депозитарії ДНКІБШМ під реєстраційним номером 205, вірулентний для білих мишей, кролів, морських свинок і хом'яків при введенні у мозок. Інфекційний титр 7,0-7,8 lg МЛД₅₀/см³. Вірус сказу референс-штаму CVS підтримувався в лабораторних умовах шляхом пасажування на білих мишах, зберігали у вигляді замороженої (мінус 20 °С) вірусомісної суспензії.

- Для постановки реакції FAVN–тест, підготовки контрольних позитивних зразків (мазків-відбитків) та гіперімунізації перепілок використовували вірус сказу, референс-штам CVS-11 (ATCC VR 959), отриманий з Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife (ANSES, Франція). Вірус сказу референс-штаму CVS-11 підтримувався в лабораторних умовах шляхом пасажування в культурі клітин ВНК–21 С13 (ATCC CCL-10), зберігали у вигляді замороженої (мінус 196 °С) вірусомісної суспензії в умовах рідкого азоту.

- Для порівняння фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної діагностики сказу використано 65 (від котів – 17, від собак – 16, 5 від куниць, 3 від борсуків, 14 від лисиць, 6 від єнотовидних собак, 2 від вовків та по одному від лося та рисі) зразків головного мозку тварин із колекції патологічних матеріалів лабораторії нейроінфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН. Всі патологічні матеріали зберігалися за температури мінус 18±2 °С.

- Для порівняння методів лабораторної діагностики сказу (РПФ, біологічна проба, вірусовиділення в культурі клітин та ЗТ-ПЛР) використали 100 зразків головного мозку тварин із колекції патологічних матеріалів лабораторії нейроінфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН вірусу сказу. Всі патологічні матеріали зберігалися за температури мінус 18±2 °С. Детальна характеристика обраних патологічних матеріалів представлена в Додатку В1.

- Для вивчення біологічних і молекулярно-генетичних властивостей вірусу сказу використано 82 ізоляти вірусу, які були виділені від 12 видів тварин і людини з 19-ти областей України: Вінницької (№ 484 – борсук, № 486 – куниця, № 692 – куниця, № 1152 – собака, № 1215 – кіт, № 1217 – лисиця, № 1220 – борсук), Дніпропетровської (№ 144 – єнотовидний собака), Донецької (№ 844 – вовк), Житомирської (№ 106 – собака, № 834 – собака), Запорізької (№ 313 – лисиця, № 317 – собака), Івано-Франківської (№ 71 – собака, № 328 – кіт, № 1319 – щур, № 1322 – кіт, № 1325 – куниця, № 1327 – ВРХ, № 1328 – куниця), Закарпатської (№ 849 – куниця), Київської (№ 1235 – куниця, № 1269 – людина, № 1309 – кіт, № 1310 – собака, № 1311 – кіт, № 1315 – кіт, № 1324 – кіт), Львівської (№ 173 – людина, № 726 – собака, № 1232 – собака), Миколаївської (№ 248 – кіт, № 249 – кіт, № 250 – кіт, № 482 – єнотовидний собака), Луганської (№ 895 – вовк), Рівненської (№ 119 – лисиця, № 1229 – лисиця, № 1230 – лисиця, № 1231 – кіт), Тернопільської (№ 739 – кіт, № 914 – лисиця, № 915 – лисиця, № 917 – кіт), Харківської (№ 652 – кіт, № 684 – кажан, № 888 – лось, № 952 – єнотовидний собака, № 963 – єнотовидний собака, № 1242 – єнотовидний собака), Херсонської (№ 111 – ВРХ, № 112 – ВРХ, № 200 – єнотовидний собака), Хмельницької (№ 81 – собака, № 82 – собака, № 83 – лисиця, № 84 – собака, № 85 – кіт, № 86 – собака, № 87 – лисиця, № 575 – кіт, № 577 – собака, № 578 – ВРХ, № 585 – ВРХ), Черкаської (№ 299 – кіт, № 1206 – куниця, № 1207 – куниця, № 1208 – борсук), Чернігівської (№ 1234 – рись), Чернівецької (№ 515 – куниця, № 517 – лисиця, № 518 – лисиця, № 519 – собака, № 522 – собака) та АР Крим (№ 488 – кіт, № 490 – лисиця, № 493 – лисиця, № 495 – лисиця, № 497 – кіт, № 500 – куниця, № 503 – ВРХ, № 504 – собака). Зразки були заморожені у вигляді 20 % мозкової суспензії за температури мінус 70 ± 2 °С.

- Для порівняльного філогенетичного дослідження використано шість ізолятів вірусу сказу з Вінницької (# RV_03_Vinnytska_Cat_Ukr_2021; # RV_04_Vinnytska_Fox_Ukr_2021; # RV_05_Vinnytska_Fox_Ukr_2021), Кіровоградської (# RV_06_Kirovohradska_Dog_Ukr_2021) та Рівненської

(# RV_08_Rivnenska_Cat_Ukr_2021; # RV_09_Rivnenska_Cat_Ukr_2021) областей.

- Для порівняння чутливості різних систем *in vitro* та *in vivo* для виділення вуличних ізолятів вірусу сказу використано 11 ізолятів вірусу сказу (09D58 – Донецька область, собака; 08C39 – Харківська область, кіт; 09D71 – Івано-Франківська область, собака; 09C66 – Одеська область, кіт; 09F94 – Сумська область, лисиця; 09C92 – Сумська область, кіт; 09D84 – Хмельницька область, собака; 09F108 – Житомирська область, лисиця; 09CO111 – Херсонська область, корова; 09CO103 – Одеська область, корова; 09D121 – Черкаська область, собака).

Культури клітин.

- Для виготовлення культурального антигену вірусу сказу використовували перещеплювану лінію культури клітин ВНК–21 С13 (АТСС ССL-10).

- Для проведення виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу в системі *in vitro* для використовували перещеплювану лінію клітин нейробластоми миші (N2a – ССL-131).

- Для проведення порівняння чутливості різних систем *in vitro* для виділення вуличних ізолятів вірусу сказу використовували перещеплювану лінію клітин нирки сайги.

Аліквоти з концентрованими клітинами зберігали за температури мінус 196 °С в умовах рідкого азоту.

Поживні середовища і реактиви.

Середовище для культури клітин Dulbecco MED W/O NA PYR highglucose (Gibco); фетальна сироватка теляти – FBS (Gibco); Antibiotic-Antimicotic 100x (Gibco), Plasmocin® Treatment (InvivoGen); трипсин-етилен-діамін-тетраоцтова кислота (Trypsin-EDTA (0,5%), nonphenol red); фосфатно-буферний розчин (ФБР) рН 7,2 без іонів Ca²⁺ і Mg²⁺ (PBS, Dulbeccos W/O CA, MG (1X); рідина для

фіксування клітин (ацетон ЧДА за ГОСТ 2603-79, 80 %); β -пропіолактон (Serva, Німеччина); нормальна сироватка крові коня S0910 (Biowest, Франція), поліетиленгліколь ПЕГ-6000 (АТК, Україна); карбонатно-бікарбонатний буфер (рН 9,6); алерген-компонент казеїн f78 (Thermo Fisher Scientific, США); козячі антитіла проти курячих Ig G мічених пероксидазою хрому (Goat anti chicken FC (HRP) (AbD Serotec, США); хромоген ТМБ – тетраметилбензидин та стоп-розчин – 0,2 М H_2SO_4 (Thermo Fisher Scientific, США); некон'югований розчин флуоресцеїнізотиоціонату (1 мг/см^3) – Fluorescein/Oregon Green Polyclonal Antibody (Thermo Fisher Scientific, США); диметилсульфоксид – DMSO (Sigma, США); реактиви вітчизняного виробництва марки х.ч. або ч.д.а.: калій фосфорнокислий однозаміщений (KH_2PO_4); натрій фосфорнокислий двоаміщений ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); карбонат натрію однозаміщений (Na_2CO_3); хлорид натрію (NaCl); 2,5 М розчин сечовини; сульфат амонію; сахароза, желатин, глюкоза 40%, гліцин, крохмаль картопляний.

Концентрацію водневих іонів (рН) у середовищі визначали за допомогою рН-іонометра і коригували шляхом додавання розчину карбонату натрію (Na_2CO_3).

Лабораторні тварини.

Для постановки біологічної проби, визначення інфекційної активності вірусу сказу, імуногенної активності отриманого антигену, постановки реакції нейтралізації, отримання мозкового вірусомісного матеріалу, одержання тестових і гіперімунних сироваток крові використовували клінічно здорових тварин: білі миші, кролі, перепілки, мурчаки, чорнобурі лисиці.

Тварин отримували із віварію Інституту ветеринарної медицини НААН.

Дослідження щодо оцінки ефективності різних антирабічних вакцин для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в контрольованому експерименті проводили на базі господарства ТзОВ «Галичхутро» (Львівська область).

Імуностимулюючі препарати.

Для дослідження в якості імунологічних ад'ювантів використовували препарати:

- Фоспреніл (Мікро-Плюс, Україна) – 0,4% колоїдний розчин фосфатів поліпренолів хвої. Досліджувані дози препарату 2, 4 і 8 мкл/гол.
- РБС (Ербіс, Україна) – комплекс біологічно активних речовин тваринної тканини (0,002 см³/гол).
- Ронколейкін (Біофарма, Україна) – рекомбінантний ІЛ-2 (100 та 200 МО/гол).
- Повний (Freund's Complete Adjuvant – FCA) і неповний (Freund's Incomplete Adjuvant – FIA) ад'ювант Фрейнда (Imject, США).

Міжнародні стандартні зразки антирабічного імуноглобуліну.

- Для постановки реакції нейтралізації на білих мишах та калібрування Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну використовували Другий міжнародний стандарт імуноглобуліну людини (The 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human). Активність імуноглобуліну 30 МО/см³.
- Для постановки реакції FAVN–тест використовували стандартну позитивну антирабічну сироватку ВООЗТ з активністю 6,7 МО/см³, виробництва Європейської референс-лабораторії зі сказу ANSES (Франція).

Антирабічні вакцини, антигени та імуноглобуліни.

- При визначенні імуногенної активності отриманого антигену вірусу сказу в якості стандартного зразку антирабічної вакцини застосовували рідку інактивовану антирабічну вакцину «Рабістар», яка виготовлена зі штаму G 52 Wistar (Укрветпромпостач, Україна). Серія: №060614, імуногенна активність 6,96 МО/см³.

- Для виготовлення антигенного препарату для гіперімунізації перепілок використовували вакцину IndiRab (Bharat Biotech International Limited, Індія), яка виготовлена на основі штаму вірусу сказу G 52 Wistar. Серія 62AN10032, імуногенна активність 5,2 МО/см³.

- Для перевірки очищених антирабічних Ig Y в ІФА в якості позитивного контролю використовували некон'югований рекомбінантний химерний білок вірусу сказу G:N (Chimeric Rabies Virus Glycoprotein Fragment – RVG-9R) з молекулярною масою 4843.7 кДа (Peptides, ЄС). В якості негативного контролю використовували жовткові антитіла DS1802 (Thermo Fisher Scientific, США).

- Для проведення контрольованого експерименту з визначення ефективності антирабічних вакцин для пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу використовували вакцини «Орісвак» і «Броварабіс V-RG», виробництва ТОВ «Укрветпромстач».

Діагностичні набори.

- Набір Platelia Rabies Kit II для визначення вмісту антитіл до вірусу сказу методом ІФА (BIO RAD, США).

- Тест-система для виявлення антитіл до вірусу сказу методом ІФА BioPro Rabies Elisa Ab (BioPro, Чехія).

- FITC Anti-Rabies Globulin Kit – ФІТЦ антирабічний кон'югат (Fujirebio Diagnostics Inc., США).

- Флуоресціюючий антирабічний глобулін «Рабітест-РІФ» (ТОВ Біотестлабораторія, Україна).

- Набір для виділення РНК з патологічного матеріалу QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Великобританія).

Специфічні олігонуклеотидні праймери.

Для постановки ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР в режимі реального часу та гніздового варіанту ПЛР використовували олігонуклеотидні праймери:

JW6DPL (CAATTCGCACATTTTGTG), позиція 660-641;

JW12 (ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG), позиція 55-73;

N165 GTCATTAGAGTATGGTGTTС, позиція 165–146;

JW10P GTCATTAGAGTATGGTGTTС;

RabGT1 TACAATGGATGCCGACAAGA;

LysGT1 CAAATC TTTGATGGCAGGGTA, позиція 81–109;

LysGT5 GATCCCGATTTGAAAACAGC;

LysGT6 AGACCATGGCTCCAGCTAAA, позиція 81–109.

Сироватки крові.

На наявність антитіл до вірусу сказу досліджували сироватки крові від різних тварин: морських свинок, білих мишей, собак, котів, кролів, чорнобурих і диких лисиць.

В процесі виробничої характеристики спеціалізованих параметрів реакції віруснейтралізації в культурі клітин для виявлення антитіл до вірусу сказу (FAVN-тест) та оцінки антирабічного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин досліджено 29732 сироватки крові від собак і котів, що надходили на дослідження з лікарень ветеринарної медицини до науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ протягом 2019-2022 рр.

Для характеристики антирабічного імунітету в диких м'ясоїдних тварин після кампаній з пероральної вакцинації в 2018-2021 рр. досліджено 32314 сироваток крові диких м'ясоїдних тварин, що надходили на дослідження до науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ протягом 2018-2022 рр.

Філогенетичний аналіз.

Для здійснення філогенетичного аналізу використано послідовності ізолятів вірусу сказу з території України, які отримали при проведенні секвенування, та послідовності ізолятів вірусу сказу та вакцинних штамів, які взято із GenBank:

- Для здійснення генетичної кластеризації ізолятів вірусу сказу обрано послідовності вакцинних штамів: PV IX276550, SAD B19 EF206709, SAD Bern EF206708.

- Для філогенетичного аналізу ліссавірусів кажанів обрано послідовності типових представників 1-ої філогрупи ліссавірусів тварин: European bat lyssavirus 1 isolate RV9 (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), Duvenhage virus isolate 94286SA (генотип DUVV), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Australian bat lyssavirus (генотип ABLV), Rabies virus isolate 9704ARG (генотип RABV), Rabies virus strain Shimoni bat virus 18 (генотип SHBRV), Rabies virus strain SAD B19 (генотип RABV), Rabies virus (генотип RABV) та двома зразками, які належать до другої філогрупи ліссавірусів тварин – Lagos bat virus isolate 8619NGA (генотип LBV), Lagos bat virus isolate 0406SEN (генотип LBV).

- Для визначення генотипу вуличного ізоляту вірусу сказу від кажана використано наступні послідовності: European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate RV9 (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate YULI (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Rabies virus strain SAD B19 (RABV) та Rabies virus (RABV).

- При проведенні аналізу результатів секвенування двох ізолятів вірусу сказу, що були виділені від людей, використано послідовності: Rabies virus strain SAD B19 (генотип RABV), Rabies virus strain SAD Bern (генотип RABV), Rabies virus strain PV-2061 (генотип RABV), Rabies virus strain CVS-N2c (генотип RABV), fox 9147FRA (генотип RABV), Homo sapiens NNV-RAB-H

(генотип RABV), HUMAN (генотип RABV), HUMAN 1983. 8743THA (генотип RABV), HUMAN 1983. 8764THA (генотип RABV), Bat 9704ARG (генотип RABV), dog 9001FRA (генотип RABV), Rabies virus strain Shimoni bat virus 18 (генотип SHBRV), Lagos bat virus isolate 8619NGA (генотип LBV), Lagos bat virus isolate 0406SEN (генотип LBV), rodent 86101RCA (генотип MOKV), G3 (генотип MOKV), shrew 86100CAM (генотип MOKV), Homo sapiens (генотип ABLV), A. Bat lyssavirus (генотип ABLV), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Homo sapiens RV 1333 (генотип EBLV-2), Miniopterus 94286 SA (генотип DUVV), Homo sapiens 86132 SA (генотип DUVV), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 9395GER (генотип EBLV-1), UKR E Bat (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 22.07.10 (генотип EBLV-1).

- Для вивчення гостальної належності вуличних ізолятів, що були виділені від людей, використано наступні послідовності: Rabies virus strain SAD B19, Rabies virus strain SAD Bern, Rabies virus strain PV-2061, Rabies virus strain CVS-N2c, dog Rw10-29, cat RW10-01, marten Rw 10-08, stray dog Rw 10-14, fox Rw 10-09, stray dog Rw 10-33, cat Rw 08-22, dog Rw 10-04, fox Rw 02-16, fox Rw 02-13, polecat Rw 10-20, stray dog Rw 10-18, fox Rw 10-31, cat Rw 09-06 та European bat lyssavirus 1 isolate YULI (генотип EBLV-1).

- Для порівняння амінокислотних послідовностей секвенованих зразків з території України із амінокислотними послідовностями виділеними на території сусідніх країн використано зразки JN596904 (лисиця), JN190393 (лисиця), JN190395 (лисиця), JN190392 (енотовидний собака), N596895 (енотовидний собака), GU086619 (лисиця).

- Для філогенетичного дослідження вірусу сказу, випадки якого виявлені в Європейському Союзі протягом 2021 – січня 2023 р., використано послідовності 105 ізолятів з 11 країн. Перелік наведено в Додатоку В2.

Обладнання.

При проведенні дослідних робіт використовували наступне обладнання: шафи біологічної безпеки з ламінарним вертикальним потоком стерильного повітря типу S2010 1,5 ENGE (Holten EU, Нідерланди); Heraeus (Heraeus Group, Німеччина), Steriel-VBH (Fisher Scientific, UK), CO₂-інкубатор IGO150 (Jouan, Франція) та CO₂-інкубатор Midi 40 (Thermo Fisher Scientific, США); обладнання для хроматографії FPLC (Pharmacia-LKB, Швеція); комплекти багатоканальних (1-, 4-, 8-, 12-канальних) автоматичних та електронних мікропіпеток з діапазоном об'ємів 3-1000 мкл виробництва Eppendorf (Німеччина) і Gilson (Франція); камера Нейбора (Китай) та камера Горяєва (Україна), пластикові матраси для культур клітин 50, 250 см³ з поверхнею для культивування 25 та 75 см² відповідно і пластикові піпетки 2-10 см³ (Sarstedt, Німеччина), пластикові пробірки об'ємом 1,5-2,0 см³ (Eppendorf, Німеччина); центрифуга Heraeus (Heraeus Group, Німеччина); мікроскоп інвертований люмінесцентний Leica DMIL (Німеччина); мікроскоп люмінесцентний інвертований AXIOVERT 25CA та світловий інвертований AXIOVERT 40MAT (ZEISS, Німеччина), посудини Дьюара, рН-іонометр тип рН level 2p (Inolab, Чехія); промивач мікропланшетів Biorad PW 40 (Франція); термошейкер для планшетів Biosan PST-60HL-4 (Латвія); імуноферментний аналізатор Sunrise фірми Tecan (Австрія), PR 2100 (Sanofi Pasteur, Франція) та спектрофотометр для планшетів Numareader Plus (Human, Німеччина); баня водяна лабораторна Julabo TW 20 (Франція); ваги електронні Axis AD 100 3 клас (Польща); термостат сухоповітряний ГП-80 (Україна); побутові холодильники і морозильні камери Nord (Україна) і Ardo (Італія), ліофільна сушарка Alpha 1-4 фірми Martin Christ GmbH (Німеччина); рН-іонометр тип рН level 2p (Inolab, Чехія);

Для проведення боксових робіт використовували комплект посуду, який включає колби мірні, стакани, піпетки 0,2-10 см³, чашки Петрі, циліндри мірні, флакони об'єму 10-500 см³, покривні і предметні скельця.

Діагностичні дослідження, з використанням ЗТ-ПЛР, проводили в три етапи в окремих приміщеннях (зонах), які були оснащені необхідними матеріалами та обладнанням.

Зона 1. Підготовка проб досліджуваного матеріалу: центрифуга з охолодженням (Z 216-МК); шафа біологічної безпеки 2 клас (ESCO); центрифуга-міні вортекс (FVL-2400N); холодильник побутовий з камерами на плюс 2 – 8° С та мінус 16 – 20° С (Атлант); млин ножовий (блендер) лабораторний (Grindomix GM 200); терези лабораторні (електронні AXIS A500); опромінювач бактерицидний настінний (ОБН-150М); окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму (Eppendorf Research plus); одноразові наконечники на 100 мкл і 1000 мкл з аерозольним бар'єром (Eppendorf, Labcon); одноразові пробірки на 1,5 см³ (Eppendorf); штативи для мікропробірок та наконечників(Ахуген); окремий халат та одноразові гумові рукавички; контейнер для збору та інактивації біологічного матеріалу; контейнер для збору використаних наконечників; серветки безворсові; дезінфекційні розчини (70 %-ий розчин етилового спирту, 10% розчин хлорного вапна, або 5%-ний розчин хлораміну, 0,5 % р-н віросану тощо).

Зона 2. Для екстракції РНК/ДНК з досліджуваного матеріалу: ламінарний бокс 2-го класу біологічної безпеки (ESCO); твердотільний термостат для пробірок типу Eppendorf 25 – 100 °С; вакуумний аспіратор з колбою-пасткою (FTA-1); мікроцентрифуга для мікропробірок типу Eppendorf до 14,5 тис об/хв – (Eppendorf); вортекс–центрифуга (FVL-2400N); опромінювач бактерицидний настінний (ОБН-150М); холодильник побутовий з камерами на плюс 2 – 8° С та мінус 16 – 20° С (Атлант); окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму (Eppendorf Research plus); одноразові наконечники на 100 мкл і 1000 мкл з аерозольним бар'єром (Eppendorf); одноразові пробірки на 0,6 та 1,5 см³ (Eppendorf); штативи для мікропробірок та наконечників(Ахуген); окремий халат та одноразові гумові рукавички; контейнер для збору та інактивації біологічного матеріалу; контейнер для збору використаних наконечників; серветки безворсові; дезінфекційні розчини: для обробки використаних

матеріалів (10% розчин хлорного вапна, або 5 %-ний розчин хлораміну, 0,5 % р-н віросану тощо) та робочого місця (70 %-ий розчин етилового спирту або засіб для видалення ДНК/РНК Ultra Clean Lab Cleaner).

Зона 3. Для проведення ампліфікації РНК/ДНК: ампліфікатор (Rotor Gene Q (QIAGEN), ABI Prism (Applied Biosystems), iQCyler (BioRad); комп'ютер з програмним забезпеченням до ампліфікатора; джерело безперебійного живлення (BNT-1000AP); ПЛР-бокс (ESCO); окремий набір автоматичних піпеток змінного об'єму (Eppendorf Research plus); одноразові наконечники для дозаторів змінного об'єму з аерозольним бар'єром до 10, 20, 200 мкл (Axygen); одноразові пробірки для ПЛР об'ємом 0,2 та 0,5 см³ (Axygen); штативи для наконечників (Axygen) і мікропробірок; окремий халат і одноразові рукавички; контейнер для збору використаних наконечників; дезрозчини: для обробки використаних матеріалів (10% розчин хлорного вапна, або 5 %-й розчин хлораміну, 0,5 % р-н віросану тощо) та робочого місця (70 %-й розчин етилового спирту або засіб для видалення ДНК/РНК Ultra Clean Lab Cleaner).

2.2 Методи

Методи епізоотологічних досліджень.

Епізоотологічний моніторинг захворюваності на сказ в Україні виконували із використанням описово-статистичного методу. Для аналізу використовували матеріали офіційної звітності Державної служби безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи в період часу з 1999 по 2022 рр. та Центру громадського здоров'я МОЗ України (1999-2017 рр.). Формування на графіках ліній тренду та обрахунок коефіцієнтів достовірності апроксимації розрахований з використанням програми MS Excel.

Методика якісної оцінки ризику.

На запит Управління здоров'я та благополуччя тварин Департаменту безпечності харчових продуктів та ветеринарної медицини робочою групою експертів під координацією Сектору оцінки ризиків Держпродспоживслужби та за технічної підтримки експертів Проєкту ЄС «Вдосконалення законодавства, контролю та поінформованості у сфері безпечності харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в Україні» з 19 листопада по 29 грудня 2020 року було проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних тварин, а з 01 квітня по 30 вересня 2021 року було проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед свійських і сільськогосподарських тварин.

Оцінка ризиків проводилася з метою отримання науково-обґрунтованої оцінки факторів, які впливають на поширення сказу серед диких, свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та формування рекомендацій щодо її удосконалення.

Оцінка ризику проводилась відповідно до методології МЕБ спочатку шляхом розробки шляхів ризику, потім – збору та накопичення необхідних даних, і на фінальному етапі, залучення експертів для здійснення незалежної експертної якісної оцінки кожного кроку шляхів ризику. Методологія, яка використовувалася для оцінки ризику, є адаптованою версією Настанов МЕБ щодо аналізу ризиків при імпорті [222]. Методологія ґрунтується на рекомендаціях Розділу 2 Кодексу наземних тварин МЕБ щодо проведення якісної оцінки.

Методи характеристики прояву сказу на території Чернігівської області.

Інформаційна база даних була створена в форматі Microsoft Office Excel 2010. До бази увійшли 463 записи про спалахи сказу на території Чернігівської області в 2011-2016 рр. Кожен запис уміщував наступну інформацію: район і населений пункт, в якому лабораторно встановлено випадок сказу, вид тварини та географічні координати довготи і широти населеного пункту. Кожен випадок

сказу був географічно прив'язаний до центроїду найближчого населеного пункту, в якому був зареєстрований випадок сказу. Географічні координати населених пунктів отримували із сервісу GeoHack – модифікованої версії джерел мап з розширенням Egil Kvaleberg's.

Дослідження просторово часових змін поширення сказу на території Чернігівської області впродовж 2011-2016 рр. проводили з використання пакету інструментів комп'ютерної програми ESRI ArcMap 10.3.

Для здійснення опису зміни просторового тренду розповсюдження випадків сказу в Чернігівській області по роках з 2011 по 2016 побудовано еліпси стандартних відхилень для кожного року. Для визначення видових відмінностей прояву сказу побудовано еліпси стандартних відхилень за 2011-2016 рр. окремо для випадків серед свійських і диких тварин.

Для визначення географічних територій з високою концентрацією випадків сказу (хотспоти – hot spots) застосовано метод ядерної оцінки щільності (Kernel density estimation – KDE), завдяки якому перетворені точкові дані в непереривну поверхню із відображенням щільності випадків сказу серед тварин. В розрахунках цієї методики використано «ядерну функцію», або «функцію ядра» (функція щільності вірогідності). Методика входить до набору інструментів Spatial Analyst для ESRI ArcMap 10.3, в якому вона реалізована з використанням квадратичної функції ядра, описаній формулою B.W. Silverman (1986) [388].

$$f(x) = \frac{1}{nh} \sum_{i=1}^n K\left(\frac{x - X_i}{h}\right), \text{ де}$$

h – радіус сусідства навколо локації, де встановлено випадок сказу;

$x - X_i$ – відстань до кожної локації;

K – квадратична ядерна функція;

n – кількість локацій із випадками сказу.

На силу згладжування результативної поверхні впливає величина радіуса сусідства h , яку було розраховано за формулою Fotheringham et al. (2000) [178].

$$h_{opt} = \left[\frac{2}{3n} \right]^{\left(\frac{1}{4}\right)} \sigma$$

, де

n – кількість локацій із випадками сказу;

σ – стандартна відстань, величина дисперсії навколо просторового середнього місця розташування випадків сказу, розраховано інструментом з набору Spatial Statistics для програми ArcMap 10.3.

Для просторово-часової характеристики епізоотичної ситуації зі сказу на території Чернігівської області було використано методика – Emerging Hotspot Analysis. Цим методом точки об'єднували в просторово-часові комірки, які склалися в тривимірний куб, де однією з осей є t (час), що представляє тривалість обраного для досліджень періоду. В наших дослідженнях географічна величина комірки (грані x та y були однаковими) становила 14 км, що є середньою загрозовою зоною поширення сказу. Середню загрозову зону обраховано сумою добутків частки різних видів тварин у видовій структурі захворюваності на сказ в Чернігівській області за 2002-2016 рр. і загрозової зони поширення сказу для кожного виду тварин. Часовим проміжком обрано період в 2 місяці – це середній інкубаційний період при інфікуванні вірусом сказу, крім того це законодавчо визначений в Україні період зняття карантинних обмежень після виявлення випадку сказу серед тварин. Тобто, враховуючи що для аналізу обрано 6 років (2011-2016 рр.), то в дослідженнях використано 36 часових проміжків по 2 місяці. В якості вхідного файлу був створений просторово-часовий куб NetCDF за допомогою інструмента Create Space Time Cube tool. Далі, з використанням розрахунку статистики Getis-Ord G_i^* були обраховані статистично достовірні географічні кластери, достовірність яких оцінена за допомогою тесту Mann-Kendall [336].

Методи характеристики прояву сказу на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей.

Дані щодо випадків сказу серед диких та свійських тварин в областях були зібрані за період 2012-2016 рр. Державними регіональними лабораторіями ветеринарної медицини. Під час цього дослідження лабораторії отримали загалом 10556 проб, в 427 був підтверджений сказ. Найбільша частина (94,74%) даних про лисиць була зібрана за допомогою активного моніторингу. Зразки від інших видів тварин були отримані за допомогою пасивного нагляду за сказом, тобто направлені до обласних лабораторій працівниками державної ветеринарної служби.

Випадки сказу були географічно прив'язані до центрів найближчого населеного пункту, в якому був зареєстрований випадок сказу. Географічні координати населених пунктів отримували із сервісу GeoHack – модифікованої версії джерел мап з розширенням Egil Kvaleberg's.

Випадки сказу були розділені на чотири групи: лисиці, свійські м'ясоїдні (тобто коти та собаки), інші дикі тварини (в тому числі козуля, куниця, тхір, щур, єнотовидний собака, кажан і вовк) та інші свійські тварини (тобто корова, коза, кінь і морська свинка). Дані про лисиць були відокремлені від інших видів, так як лисиці, вважаються основним резервуаром сказу в Європі. Подібним чином собаки та коти були згруповані разом, так як вони вважаються основним джерелом вірусу сказу для людини в Україні.

Відсоток позитивних проб розраховували як кількість позитивних проб поділена на загальну кількість зразків, проаналізовані в групі з усієї досліджуваної території або від кожної з областей. Точні біноміальні довірчі інтервали (BCI) у відсотках були розраховані за допомогою пакета EpiTools [412].

Відсоткова різниця позитивних результатів у кожній групі на всій досліджуваній території була оцінена за допомогою тесту Пірсона χ^2 в R (χ^2). Статистично значущий поріг був встановити значення $p < 0,05$. Цей тест

не проводився в групах 3 та 4 (інші дикі тварини та інші свійські тварини) за рахунок обмеженої кількості випадків захворювання на сказ.

Епідемічні криві захворюваності на сказ лисиць, котів та собак було нанесено на графік, що показує щомісячну захворюваність для всіх областей.

Щоб оцінити динаміку та розповсюдження випадків сказу на досліджуваній території, ми розраховали, наскільки ознака (тобто позитивні випадки) зосереджені або розосереджені навколо середньгеометричного центру. Аналіз проводився за допомогою інструменту Standard Distance, реалізованого в ArcGIS 10.3. Цей метод малює кола, що дорівнюють стандартним відхиленням розподілу подій навколо їх середнього геометричного центру [160].

Для порівняння зміни ступеню поширення випадків сказу серед лисиць, котів і собак на щорічній основі, ми оцінювали зміни протягом років у середньому геометричному центрі випадків сказу в цих групах. Розмір кола стандартної відстані був стандартним значенням 1 стандартне відхилення.

Щоб дослідити зміни щільності випадків сказу серед лисиць, котів і собак у досліджуваних областях на щорічній основі, проведено оцінку щільності ядра (KDE) з набору інструментів Spatial Analyst в ArcGis 10.3. KDE забезпечило просторово плавну оцінку локальної інтенсивності подій – спалахів сказу серед тварин. Ми розраховали радіус пошуку для згладжування відповідно формули Fotheringham A.S. [178]:

$$h_{opt} = \left[\frac{2}{3n} \right]^{(1/4)} \sigma$$

, де

n – кількість локацій із випадками сказу;

σ – стандартна відстань, величина дисперсії навколо просторового середнього місця розташування випадків сказу, розраховано інструментом з набору Spatial Statistics для програми ArcMap 10.3.

Для порівняння щільності випадків захворювання на сказ на річній основі ми використовували усереднений стрибок за всі роки. Для усіх вихідних растрів було обрано просторову роздільну здатність 1000 м/піксель. Це округлення стандартного значення, запропонованого для наших даних інструментом KDE в ArcGIS. Просторова роздільна здатність впливала на візуальну привабливість вихідного растру KDE з вищою роздільною здатністю [122].

Для оцінки територій, де оцінка щільності ядра випадків сказу серед лисиць, котів і собак залишалася >0 протягом усіх років спостережень було застосовано до растрів KDE у растровому калькуляторі з набору інструментів Spatial Analyst ESRI ArcGis 10.3.

Щоб виявити просторово-часові кластери випадків сказу, ми використали модель просторово-часової перестановки, реалізовану в SatScan. Для цієї моделі не потрібна інформація про розподіл основної популяції, лише дані про випадки захворювання. Оскільки модель припускає, що просторовий розподіл залишається стабільним протягом усього періоду дослідження, ми проводили аналіз окремо для кожного року. Для аналізу були обрані наступні параметри: максимальний просторовий розмір кластера – 50 % популяції групи ризику; максимальний часовий розмір кластера – 50 % періоду дослідження; точність часу – доба; сканування областей з високими показниками; агрегування часу – одна доба; значення p для виявлених кластерів — за замовчуванням 999 реплікацій за методом Монте-Карло; відсутність географічного перекриття.

Для визначення кластерів випадків серед лисиць і свійських м'ясоїдних тварин застосовано два підходи: використання консолідованих даних всіх груп в аналізі та аналіз групи лисиць і свійських м'ясоїдних тварин окремо.

Усі карти були створені в ESRI ArcGis 10.3. Використано векторні шари кордонів країн та адміністративних одиниць GADM (<http://gadm.org/>) [335].

Методи характеристики прояву сказу на території України в 2018-2022 рр.

Аналіз випадків сказу проводився на усій території України, окрім тимчасово окупованих територій (Автономна республіка Крим та південно-східні частини Донецької та Луганської областей), на яких влада України не має змоги проводити профілактичні антирабічні заходи та не контролює поширення сказу. Площа цієї території близько 43 300 квадратних кілометрів, що становить близько 7 % території України. Крім того, в зв'язку із широкомасштабним неспровокованим військовим вторгненням Росії в Україну в 2022 році, окупацією частини території України та руйнуванням лабораторій Держпродспоживслужби, в аналізі відсутні дані щодо випадків сказу серед тварин з Донецької, Луганської та Херсонської областей в 2022 році.

Інформація про випадки сказу серед тварин в Україні в 2018-2022 рр. зібрано з Державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби. Усі проби головного мозку тварин в лабораторіях досліджувалися на наявність антигену вірусу сказу методом РПФ, частина негативних (у разі контакту тварини з людиною) у РПФ проб була досліджена біологічною пробюю на білих мишах. Протягом 2018-2022 рр. до Державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби для дослідження на наявність антигену вірусу сказу надійшло 75691 проба головного мозку тварин. Найбільше зразків (57085) були від лисиць.

Основна частина зразків від лисиць (53860 проб головного мозку, або 94,35 %) до лабораторій надходила внаслідок активного моніторингу (відстрілу лисиць), як елементу контролю ефективності кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу. Решта проб головного мозку від диких і свійських тварин (21831) були отримані шляхом пасивного нагляду за сказом, тобто направлені до регіональних лабораторій ветеринарними працівниками.

Всього за цей період 5846 проб головного мозку визнано позитивними на сказ в РПФ (2018 – 1847; 2019 – 1421; 2020 – 1226; 2021 – 767; 2022 – 585). Крім цього, в аналізі не представлені 40 випадків сказу, що виявлені різними

регіональними лабораторіями протягом 2018-2022 років, однак їхню географічну локалізацію не вдалося встановити.

Інформація для статистичного і просторово-часового аналізу про випадки сказу включала вид тварин, адміністративна область виявлення випадку, координати центру населеного пункту (або точні координати якщо була наявна інформація за адресою, де була виявлена хвора на сказ тварина), з якого було отримано зразок, і дату прийняття на дослідження лабораторією зразка головного мозку.

Відсоток позитивних проб розраховували як кількість позитивних проб поділена на загальну кількість зразків, проаналізовані в групі з усієї досліджуваної території. Точні біноміальні довірчі інтервали (BCI) у відсотках були розраховані за допомогою пакета EpiTools. Різниця у відсотках позитивних результатів у кожній групі була оцінена за допомогою тесту Пірсона χ^2 в R (χ^2).

Для того щоб оцінити зміни в просторовому розповсюдженні випадків сказу впродовж 2018-2022 років застосовано інструмент Emerging hot spot analysis з пакету інструментів Space Time Pattern Mining Tools в програмному забезпеченні ESRI ArcMap 10.4. Для проведення аналізу дані по випадкам захворювання були згруповані в комірки обраного розміру (bins), які просторово покривали досліджувану територію, а разом із часовим компонентом даних складали просторово-часовий куб. Ми обрали просторовий розмір сторони комірки рівним 14 кілометрів – середня відстань загрози сказу, яку обраховано виходячи із потенційної загрози поширення сказу епідемічно значущих видів тварин (лисиці, собаки, коти, єнотовидні собаки, вовки, куницеві) та їхньої частки в структурі захворюваності на сказ. Часовий розмір комірки обрано рівним 2 місяці – середня тривалість інкубаційного періоду сказу. Групування в часі робили в напрямку від останньої (2022-12-31) до першої дати (2018-01-01) досліджуваного періоду – параметр Time step alignment. Таким чином створений куб мав 30 часових кроків – кожен з п'яти років поділено на шість двомісячних кроків [160].

Для виявлення статистично значимого групування явищ у просторі-часі – кластерів високих і низьких значень (hotspots and coldspots) інструмент використовував просторово-часову реалізацію статистики Getis-Ord G^* (Гетіс-Орд Джи стар). Статистика Getis-Ord G^* розглядала кожен комірок у контексті сусідніх комірок. Локальне середнє значення комірки та її сусідів порівнювали із середнім всіх комірок куба; коли ця різниця занадто велика, щоб бути результатом випадковості, результат був статистично значущим. Для цього дослідження ми не вказували відстань сусідства, а поклалися на внутрішні розрахунки інструменту, які він робить виходячи з даних і екстенду дослідження. В нашому дослідженні ця відстань склала 67,7 км. Сусідство в часі ми обрали рівним п'яти часовим інтервалам. Так як кожна комірка в часі дорівнює двом місяцям, кожен такий інтервал дорівнює 2 місяці +5*2 попередні місяці = 12 місяців. Ми визначали, як під час проведення кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу відбувалася кластеризація випадків впродовж 2018-2022 років.

Результати статистики Getis-Ord G^* оцінювали за допомогою тренд-тесту Mann-Kendall на наявність статистично значимого часового тренду кластеризації випадків захворювань [336]. За результатами виконання цих розрахунків інструмент Emerging hot spot analysis відніс кожен локацію до однієї з 10 категорій (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Інтерпретація легенди Emerging hot spot analysis

Позначення кластера	Назва	Характеристика
	No Pattern Detected	Не підпадає під жодну з моделей гарячих або холодних точок, визначених нижче.
	Persistent Hot Spot	Розташування, яке було статистично значущою гарячою точкою протягом 90 відсотків часових інтервалів без помітної тенденції в інтенсивності кластеризації з часом.
	Diminishing Hot Spot	Розташування, яке було статистично значущою гарячою точкою протягом 90 відсотків інтервалів часового кроку, включаючи останній часовий крок. Крім того, інтенсивність кластеризації на кожному часовому етапі в цілому статистично зменшується.
	Sporadic Hot Spot	Статистично значуща гаряча точка для останнього інтервалу кроку часу з історією того, що вона також була гарячою точкою ввімкнення та вимкнення. Менше 90 відсотків інтервалів часових кроків були статистично значущими гарячими точками, і жоден з інтервалів часових кроків не був статистично значущою холодною точкою.
	Oscillating Hot Spot	Статистично значуща гаряча точка для останнього інтервалу кроку часу, яка також була статистично значущою холодною точкою протягом попереднього кроку часу. Менше 90 відсотків інтервалів кроків у часі були статистично значущими гарячими точками.
	Historical Hot Spot	Останній період часу не є гарячим, але принаймні 90 відсотків інтервалів часу були статистично значущими гарячими точками.
	New Cold Spot	Місце, яке є статистично значущою холодною точкою для останнього часового кроку і ніколи раніше не було статистично значущою холодною точкою.
	Consecutive Cold Spot	Розташування з одним безперервним прогоном принаймні двох статистично значущих холодних точок у кінцевих інтервалах часу. Це місце ніколи не було статистично значущою холодною точкою до останнього запуску холодної точки, і менше 90 відсотків усіх бункерів є статистично значущими холодними точками.
	Sporadic Cold Spot	Статистично значуща холодна точка для останнього інтервалу кроку в часі з історією також холодної точки ввімкнення та вимкнення. Менше 90 відсотків інтервалів часових кроків були статистично значущими холодними точками, і жоден з інтервалів часових кроків не був статистично значущими гарячими точками.
	Oscillating Cold Spot	Статистично значуща холодна точка для останнього інтервалу кроку часу, яка в історії також була статистично значущою гарячою точкою протягом попереднього кроку часу. Менше 90 відсотків інтервалів кроків у часі були статистично значущими холодними точками.

Крім стандартної візуалізації результатів Emerging hot spot analysis ми візуалізували результати у вигляді серії 2 місячних часових кроків, що складають часовий розмір комірки просторово-часового куба. Для цього ми скористались інструментом Visualize Space Time Cube in 3D в ESRI ArcMap 10.4. Отриманий шейп файл використали для візуалізації в R за допомогою бібліотеки ggplot2 [160].

Методика дослідження ефективності різних антирабічних вакцин для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в контрольованому експерименті.

Чорно-бурим лисицям (49 голів, які були розділені на дві групи: I група – 25 голів, II група – 24 голови) згодовували по одній дозі вакцини «Орісвак» (I група) і «Броварабіс V-RG» (II група). Через 30 днів проведено відбір крові й отримані сироватки крові. Дослідження антирабічної активності сироваток крові проведені методом блокуючого ІФА з використанням тест-системи BioPro Rabies ELISA AbKit. Окремо, для визначення антирабічної віруснейтралізуючої активності сироваток крові, проведено дослідження методом FAVN-тест [286].

Дослідження зубів лисиць на наявність тетрациклінового маркера після проведення кампанії з пероральної вакцинації.

Дослідження в 2018 та 2019 роках проводилися на базі науково-дослідного патоморфологічного відділу ДНДІЛДВСЕ та Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області (м. Полтава). В 2020 і 2021 дослідження проводилися на базі науково-дослідного патоморфологічного відділу ДНДІЛДВСЕ.

Наявність біомаркеру визначали дослідженням гістологічних зрізів в ультрафіолетовому спектрі під люмінесцентним мікроскопом Micros Austria MS 300 (Австрія). Матеріалом для дослідження були гістологічні зрізи ікол, які були відібрані від відстріляних тварин у мисливських угіддях не менше ніж через 30 днів після завершення кампанії з пероральної вакцинації диких

м'ясоїдних проти сказу. Спили робили за допомогою прецензійної пилки ISOMET та отримували зрізи товщиною від 0,2 до 0,6 мм. Зразок містив пульпарну порожнину, дентин, цемент та деякі шматочки кістки.

Тетрациклінові лінії виглядали, як жовті лінії на блакитному фоні. Надалі, характеризували різні елементи: якість зрізу, наявність тетрацикліну, кількість ліній тетрацикліну .

При наявності тетрацикліну в гістологічному зрізі при люмінісценції спостерігали свічення у вигляді жовтувато-зеленого кольору, так звана тетрациклінова мітка (позитивний результат). При відсутності тетрациклінової мітки – результат негативний [53, 59].

Дослідження сироваток крові лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу після проведення кампанії з пероральної вакцинації.

Дослідження в 2018 та 2019 роках проводилися на базі науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ та Регіональної державної лабораторії Держпродспоживслужби в Полтавській області (м. Полтава). В 2020 і 2021 дослідження проводилися тільки на базі науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ.

Сироватки на наявність антитіл до вірусу сказу досліджували методом ELISA. Для цього використовували діагностичні набори BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad (згідно інструкції виробника). У разі використання тест-системи BioPro Rabies Elisa Ab позитивними вважалися сироватки з пороговим значенням ≥ 70 % блокування. Сироватки крові лисиць при дослідженні тест-системою Platelia Rabies II BioRad вважалися позитивними за наявності сероконверсії $\geq 0,125$ МО/см³ [53, 59].

Методика вирощування клітин in vitro.

Клітини ВНК–21 С13 (АТСС ССL-10), N2а (АТСС ССL-131) та нирки сайги (НС), які використовували для постановки реакції FAVN–тест, а також для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу, трипсинізували з

моношару, який вже сформований (клітини знаходяться в експоненціальній фазі їх кінетичного росту – 2-3 добовий моношар). В клітинній суспензії не повинно бути клітинних агрегатів для чого проводили піпетування клітинної суспензії. Клітини збирали в об'ємі 16-20 см³ (для матрасу 75 см²) та 4-6 см³ (для матрасу 25 см²) середовища з додаванням 10 % (для клітин ВНК–21 С13 та НС) і 5 % (для клітин N2a) інактивованої FBS.

Для визначення посівної концентрації, проводили підрахунок кількості клітин в камері Горяєва.

Число клітин в 1 см³ визначали за формулою:

$$X = \frac{A \times 1000 \times K}{0,9}, \text{ де}$$

X – число клітин в см³; A – середнє число клітин в одній сітці; 1000 – число мм³ в см³; K – коефіцієнт розведення суспензії; 0,9 – об'єм камери Горяєва в мм³.

Потім, враховуючи концентрацію клітин в 1 см³, робили розведення суспензії шляхом додавання ростового середовища до отримання посівної концентрації клітин (1-1,2x10⁵ в см³).

Культуру клітин вирощували у 75 см³ та 25 см³ пластикових матрасах стаціонарним методом впродовж 48-72 год за температури 37±0,5 °С, 5 % CO₂, 95 % вологості до сформування моношару в умовах CO₂-інкубатора Jouan IGO150.

Методика відновлення інфекційної активності вірусу сказу штаму Щолково-51 К та отримання культуральної вірусомісної суспензії.

Відновлення ліофілізованого вакцинного штаму Щолково-51 К вірусу сказу проводили шляхом шестикратного пасажування в культурі перещеплюваних клітин ВНК–21 С13 (ATCC CCL-10).

Для відновлення було відібрано три флакони ліофілізованого вірусу сказу, штаму Щолково-51 К, вміст яких розчиняли ФСБ до об'єму 1 см^3 і об'єднували в загальний пул.

Зараження культури клітин вірусом сказу проводили попередньо видаливши ростове середовище. Розрахунок множинності зараження проводили за формулою:

$$ID = \frac{IT}{10^5}, \text{ де}$$

ID – множинність зараження в МЛД₅₀/клітину; IT – інфекційний титр вірусної суспензії в МЛД₅₀/см³; 10^5 – число клітин в см³.

Для отримання необхідної множинності зараження культури клітин використовували 2-х, 5-ти, або 10-ти кратні розведення вірусомісної суспензії.

Після адсорбції вірусу (впродовж 60 хв) у культуральні матраси вносили підтримуюче середовище та продовжували культивування у визначених умовах (за температури $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO₂, 95 % вологості).

Культуральний матеріал відбирали на 5-ту добу культивування, його піддавали двократному заморожуванню-відтаюванню, об'єднували вміст матрасів в загальний пул та відбирали проби культуральної вірусомісної рідини для перевірки на відсутність бактеріальної та грибової контамінації, а також для визначення титру інфекційної активності шляхом титрування вірусу на білих мишах.

Отримання вірусу сказу, референс-штаму CVS-11.

Клітини ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10) трипсинізували з моношару, який вже сформований (клітини знаходилися в експоненціальній фазі їх кінетичного росту). Загальний об'єм клітин 2×10^7 клітин використовували для матрасу площею 75 см^2 . Клітини збирали в об'ємі $10\text{--}15 \text{ см}^3$ середовища з додаванням 10 % інактивованої FBS. Далі додавали вірус сказу (штам CVS-11). Розрахункова інфікуюча доза (кількість інфекційних частинок в перерахунку на

клітину) вірусу сказу становила 0,1 TCID₅₀/кл. Флакони, в які вносили суспензію вірус + клітина, інкубували 60 хв за температури + 36,5–37,5 °С.

Після інкубування інфіковану клітинну суспензію осаджували шляхом центрифугування при 800–1000 g впродовж 15 хв. Осад ресуспендували поживним середовищем із вмістом 10 % інактивованої FBS. Потім інфіковану культуру клітин вносили в культуральний матрас та інкубували в CO₂-інкубаторі за температури + 35,5–37,0 °С з 5 % CO₂ протягом 48 годин.

Після закінчення терміну інкубування інфіковану культуру клітин заморожували за температури мінус 18±2 °С. Далі вірусомісну суспензію розморожували та центрифугували при 800–1000 g протягом 15 хв за температури +4 °С. Потім аліквотували та заморожували за температури мінус 80 °С [286].

Визначення інфекційної активності вірусу сказу CVS-11 in vitro.

Титрування вірусу в TCID₅₀ (50 % культурально-клітинна інфекційна доза). Для титрування використовують культуру клітин ВНК-21 С13 (ATCC CCL-10) вирощену в 96-лункових мікропанелях. Етапи титрування:

- зараження 24-годинного моношару клітин;
- 10-ти кратні розведення готуються, використовуючи 0,9 см³ розчинника і 0,1 см³ суспензії вірусу;
- використовувати по 6 дублікатів кожного розведення;
- інкубація протягом 72 годин;
- якісний облік реакції (за наявності флуоресценції – лунка позитивна, відсутність флуоресценції – негативна);
- кожний раз при дослідженні сироваток крові проводити контроль титру серії вірусу;
- розрахунок титру здійснювати графічним методом пробіт-аналізу (neoprobit graphic), або методом Спермена-Кербера (Spearman–Kärber).

1. Суспензія клітин.

Напередодні титрування, суспензія клітин, яка містить 10^5 кл/см³, готується на поживному середовищі з 10 % інактивованої FBS. В кожну лунку 96-ти лункової мікропанелі вносять по 200 мкл суспензії. Інкубацію проводять 24 години за температури 35,5-37 0 С з 5% CO₂ .

2. Розведення вірусу.

Серійні розведення виконуються в окремих пробірках. Для розведення використовують поживне середовище без FBS. Крок розведення дорівнює 10 (0,9 см³ розчинника + 0,1 см³ переднього розведення). Робляться розведення від 10-1 до 10-12.

3. Зараження клітин.

Поживне середовище з мікропанелі, де вирощені клітини, видалається з лунок за допомогою аспіраційної системи. Потім по 50 мкл кожного розведення вірусу вносять в лунки, на кожне розведення використовують 6 лунок.

Мікропанель інкубується протягом 60 хв. за температури 35,5–37С⁰ з 5% CO₂. Після інкубації в кожну лунку додається по 200 мкл поживного середовища для культур клітин, яке містить 5 % FBS.

4. Інкубація.

Плашки інкубуються 72 години за температури +35,5 – 37 С⁰ з 5% CO₂.

5. Фарбування і розрахунок титру.

Процедура фарбування – по методу флуоресціюючих антитіл, якісний облік реакції (за наявності флуоресценції – лунка позитивна, відсутність флуоресценції – негативна). Розрахунок титру проводиться графічним методом пробіт-аналізу (neoprobit graphic), або методом Spearman–Kärber [286]:

$$\lg \text{TCID}_{50} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r_i}{n_i} \right) , \text{ де}$$

x_0 = - (log10 найменшого розведення, де всі лунки позитивні);

d = log10 кроку розведення;

n_i = кількість повторів;

r_i = кількість позитивних лунок.

Визначення інфекційної активності вірусу сказу in vivo.

Інфекційну активність вірусомісної суспензії *in vivo* визначали шляхом титрування на білих мишах за методом Н. Koprowski [148]. Для цього готували 10-ти кратні розведення вірусу на ізотонічному розчині натрію хлориду та інокулювали інтрацеребрально мишам по 0,03 см³. Для отримання достовірних результатів на кожне розведення матеріалу брали не менше 5 тварин. Облік результатів проводили з 5-ї по 14 добу. Титр вірусу розраховували за методом Spearman–Kärber:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = - \left(x_0 - \frac{d}{2} + d \sum \frac{r^i}{n^i} \right), \text{ де}$$

x_0 – логарифм оберненого найменшого розведення, при якому спостерігається 100 % загибель тварин;

d – логарифм кратності розведення;

n^i – кількість тварин, які використані на кожне розведення (після виключення випадків неспецифічної загибелі);

r^i – кількість позитивних (загиблих) тварин серед n^i .

Методика отримання мозкової суспензії вірусу сказу.

Мозкову суспензію вірусу сказу отримували з патологічного матеріалу (фрагментів мозку), який зберігали за температури мінус 70±2 °С в морозильній камері. Матеріал поміщали у стерильний поліпропіленовий флакон і визначали вагу мозку шляхом обрахування різниці між вагою флакону з мозком та вагою порожнього флакону. Додавали 0,85 % розчин NaCl, із вмістом 2 % сироватки крові коня, в кількості, необхідній для отримання 20 % суспензії. Потім проводили трикратне заморожування-відтаювання із енергійним струшуванням при відтаюванні флакону із вірусомісною суспензією. Кінцевим етапом було видалення тканинного детриту, для чого суспензію центрифугували при 2 тис. обертів протягом 15 хвилин [36].

Постановка біологічної проби.

Постановку біологічної проби проводили відповідно ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу» шляхом інтрацеребрального інфікування мишей 20 %-ою суспензією патологічного матеріалу (мозку). Спостереження за мишами вели протягом 31 доби. Специфічною вважали гибель мишей та з 5-ї по 31 добу [148].

Концентрування культурального антигену вірусу сказу.

Очищення інактивованої вірусомісної суспензії здійснювали центрифугуванням впродовж 30 хвилин за 3000 об/хв, надосадову рідину відбирали (елюат 1), а осад ресуспендували в мінімальному об'ємі ФСБ і піддавали заморожуванню-відтаюванню для остаточного вивільнення внутрішньоклітинного вірусу. Повторне центрифугування осаду проводили в аналогічному режимі. Далі, отриману в результаті центрифугування надосадову рідину, змішували з елюатом 1 і проводили визначення інфекційної активності на білих мишах.

Концентрування вірусомісної суспензії здійснювали ПЕГ-6000 до 6-и % в кінцевій концентрації, інкубували за температури 4 ± 2 °С впродовж 24 годин із наступним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Після цього відбирали осад, проводили його ресуспендування 0,02М ФСБ та оцінку інфекційної активності шляхом титрування на білих мишах.

Інактивація вірусу сказу.

Отриману в результаті концентрування вірусомісну суспензію інактивували β -пропіолактоном виробництва Serva (Німеччина) із ступенем очистки 98,5 % в кінцевій концентрації 1:4000. Інактивацію проводили впродовж 24 годин за температури 4°С. Повноту інактивації визначали шляхом інтрацеребральної інокуляції отриманого матеріалу в об'ємі 0,03см³/гол 10-и білим мишам вагою 9–11 грам. Якщо загибель тварин не відмічали впродовж 14 днів, вважали вірусомісну суспензію повністю інактивованою.

Методика визначення імуногенної активності інактивованих антигенів вірусу сказу та антирабічних вакцин методом НИН.

Для інокуляції мишей, як дослідним вакцинним препаратом, так і референс-вакциною, проводили розведення наступним чином: готували чотири п'ятикратні розведення (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) на ФСБ, рН 7,3-7,6.

По 0,5 см³ кожного розведення дослідної та референс-вакцини вводили інтраперитоніально 20 мишам, вагою 9-11 г, в задню частину черевної порожнини тварини, зміщуючи голку вправо або вліво від середньої лінії, використовували одноразову голку розміром 0,5Ч16 мм. Через 7 днів проводили повторну (бустерну) імунізацію.

Через 14 днів після першої імунізації проводили інтрацеребральне зараження мишей. З розведеного супернатанту референс-штаму CVS-11 (робочого розведення) готували три десятикратні розведення (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). Зберігали усі розведення вірусу на холодівому агенті, як до, так і під час дослідження для запобігання втрати інфекційної активності. Вакцинованим мишам інтрацеребрально вводили по 0,03 см³ робочого розведення вірусу, що містить від 12 до 50 LD₅₀/голову. Далі робоче розведення вірусу вводили для 10-и голів контрольних мишей. Після чого вводили інтрацеребрально по 0,03 см³ кожного десятикратного розведення робочого вірусу контрольним мишам.

За мишами спостерігали впродовж 14 днів. Відмічали усіх загиблих, однак вважали специфічною гибель будь-якої миші з ознаками перебігу паралітичної форми сказу (парези, паралічі, судоми) з 6-го до 14-го дня. Тест вважали дійсним, коли отримані результати після випробування на імунізованих мишах показували, що розведення еталонної вакцини охоплює 50 % кінцевого розведення – тобто, принаймні 70 % мишей, що отримували низьке розведення (висока доза) вакцини виживають і принаймні 70 % мишей, які отримували високе розведення (низька доза) вмирають. Титр робочого вірусу знаходився в межах 12-50 LD₅₀ [148].

Розрахунок 50% ефективної дози (ED_{50}) здійснювали за формулою Spearman-Kärber. Визначення імуногенності вакцинного препарату, що досліджується здійснювали за формулою:

$$II = \frac{\text{антиlg}(ED_{50})_{ДВ}}{\text{антиlg}(ED_{50})_{РВ}} \times IA(РВ), \text{ де}$$

II – індекс імуногенності (МО);

ДВ – дослідна вакцина;

РВ – референс-вакцина;

IA – імуногенність референс-вакцини згідно паспорту.

Отримання сироваток крові.

Пробірки з кров'ю закривали ватною пробкою і ставили у термостат за температури 37°C на 1-2 години, або ж залишали при кімнатній температурі ($20-26^{\circ}\text{C}$) на 5-6 годин. Після цього згусток крові, у кожній пробірці, обводили нержавіючою металевією паличкою та поміщали в камеру побутового холодильника ($4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) на 12 годин. Після ретракції згустку сироватку відбирали піпеткою у чисту пробірку та зберігали до дослідження у замороженому стані (мінус $18\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Методика одержання гіперімунної антирабічної сироватки.

В якості тварин-продуцентів обрано дорослих кролів (маса 2,4-2,7 кг). Для імунізації використовували отриманий нами концентрований та інактивований антиген вірусу сказу, штаму Щолково-51 К, з імуногенною активністю $4,2 \text{ МО/см}^3$. Інокуляцію здійснювали шляхом чотирикратного комбінованого введення кроликам внутрішньошкірно в п'ять точок по $0,1 \text{ см}^3$ і внутрішньом'язово в одну точку $0,5 \text{ см}^3$ культурального антигену вірусу сказу з імуностимулюючим препаратом «Фоспреніл» в дозі 125 мкл/гол.

Для ґрундімунізації здійснювали введення антигену та імуностимулятора на 0 та 21 добу, після чого на 28 добу досліду проводили відбір крові для

визначення рівня антитіл до вірусу сказу. За результатами дослідження для подальшої імунізації відбирали кролів з титрами вище 20 MO/cm^3 .

Третю імунізацію здійснювали на 35-у добу досліду без «Фоспренілу», четверту на 49-у добу з імуностимулюючим препаратом. Відбір крові та отримання специфічної сироватки проводили на 63-ю добу.

Визначення активності сироватки крові в реакції нейтралізації.

Віруснейтралізуючу активність гіперімунної сироватки визначали в реакції нейтралізації на білих мишах [148]. Для цього, до імуноглобулінів у різних розведеннях (від 1:250 до 1:8000) додавали робоче розведення вірусу сказу референс-штаму CVS. Інкубацію, для з'єднання комплексів антиген – антитіло, проводили у термостаті за температури $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ впродовж 90 хвилин. Отриманий матеріал інокулювали лабораторним тваринам інтрацеребрально (і/ц) в дозі $0,03 \text{ cm}^3$ і спостерігали за ними протягом 14 діб, специфічну загибель відмічали починаючи з 5 доби досліду. В якості стандарту імуноглобуліну використовували Другий міжнародний стандарт антирабічного імуноглобуліну людини з активністю 30 MO/cm^3 . Статистичну обробку результатів проводили за формулою Spearman-Kärber. Результати реакції виражали в MO/cm^3 .

Методика постановки реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ).

Приготовлені мазки або відбитки висушували на повітрі, фіксацію здійснювали двома способами: в охолодженому ацетоні при 4°C протягом 4-х годин або при мінус 20°C – 60 хвилин та миттєво, шляхом висушування двократним проведенням скельця з обох боків над полум'ям спиртівки.

Мазки або відбитки поміщали у вологу камеру: чашку Петрі або кювет із зволеним дном. Наносили флуоресціюючий антирабічний глобулін (ФАГ) у робочому розведенні рівномірно на всю поверхню мазка (відбитка) по $0,1 \pm 0,02 \text{ cm}^3$ на один препарат, закривали камеру з препаратами, ставили в термостат при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ та інкубували 30 хвилин. Паралельно аналогічним чином ФАГ наносили на контрольні (позитивні і негативні) препарати.

Після цього препарати споліскували дистильованою водою і відмивали протягом 30 хвилин 0,01 М ФБР (рН 7,2-7,4), змінюючи розчин кожні 10 хвилин. Далі препарати споліскували дистильованою водою і висушували на повітрі у вертикальному положенні протягом 30-60 хвилин у темному місці.

Люмінесцентну мікроскопію проводили в день фарбування мазків мікроскопами Leica або ZEISS за збільшення $\times 10 - 40$ та $\times 100$ під імерсійною системою

Оцінку результатів проводили за інтенсивністю світіння, результати виражали в хрестах:

- ++++ - яскраве, сяюче жовто-зелене світіння;
- +++ - чітко виражене яскраве жовто-зелене світіння;
- ++ - неяскраве, нечітко виражене жовто-зелене світіння;
- + - слабе світіння, яке знаходять тільки у великих включеннях зелено-сірого кольору;
- - відсутність специфічного світіння.

Результат дослідження на сказ вважали позитивним при наявності в досліджуваних і контрольних позитивних препаратах специфічного світіння інтенсивністю 3-4 хрести.

Методика отримання контрольних зразків для проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу.

Було відібрано 10 голів білих мишей у дослідну та 6 голів у контрольну групу, віком 3–4 тижні з вагою 9–12 г. Інокуляцію тваринам дослідної групи проводили інтрацеребрально титрованою дозою вірусу сказу CVS-11 у дозі $0,03 \text{ см}^3$ /голову. В подальшому проводили щоденні спостереження впродовж 14 діб. Специфічною вважали загибель мишей на 5 добу після інфікування за наявності специфічних клінічних ознак сказу.

В мишей дослідної групи після прояву специфічних ознак у стадії агонії відбирали головний мозок. Отримували загальний пул з усіх 10 голів, готували 20 % гомогенну суспензію та готували мазки-відбитки.

Паралельно готували мазки-відбитки з мозку здорових мишей для виготовлення негативного контролю [5]. Отримані мазки-відбитки висушували на повітрі та фіксували в ацетоні за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом 60 хв., після чого висушували на повітрі.

Характеризацію виготовлених мазків-відбитків із закодованими значеннями позитивних чи негативних контролів здійснювали одночасно три фахівці. Стабільність визначали в довільно обраних трьох контрольних зразків (2 позитивних та 1 негативний) після приготування та через десять днів зберігання за різних температурних режимів.

Концентрування антирабічної гіперімунної сироватки.

Концентрування проводили шляхом висолювання специфічних білків насиченим розчином сульфату амонію. Для цього до об'єднаної суміші сироваток, при постійному перемішуванні на магнітній мішалці, краплями додавали насичений розчин сірчаноокислого амонію протягом 20-30 хвилин у співвідношенні 1:1. Через 24 години інкубації за температури $2-4\text{ }^{\circ}\text{C}$, відбирали осад і розчиняли його у мінімальному об'ємі ізотонічного розчину NaCl. Далі діалізували проти ФСБ для видалення сірчаноокислого амонію, для чого використовують діалізні трубки фірми Serva. Вміст білку визначали за методом Lowry O.H. [273].

Методика отримання дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну.

Для мічення використовували концентрований антирабічний імуноглобулін із сироватки крові гіперімунізованих кролів, вміст білку в якому становив $28,2\text{ мг/см}^3$ та ФІТЦ із розрахунку 1; 1,5 і 2 мг на 100 мг білку. Необхідну кількість флуоресцентного барвника розчиняли в мінімальному об'ємі 0,05 М карбонатно-бікарбонатного буферу. В розчин імуноглобуліну поступово додавали отриманий розчин ФІТЦ. Після перемішування доводили рН до 9,0 за допомогою 0,5 М розчину карбонату натрію (Na_2CO_3). Кон'югацію

проводили за температури 4°C впродовж 18 год за постійного перемішування на магнітній мішалці.

Вимірювання рН розчину імуноглобулінів з ФІТЦ проводили рН-метром через 10 хв, 30 хв, 6 та 12 годин після початку мічення. Коригування концентрації водневих іонів здійснювали 0,5 М розчином карбонату натрію до 9,0. Очистку від незв'язаного флуорохрому проводили гель-фільтрацією на колонках із сефадексом G-25. Кількість розчину ФІТЦ-імуноглобулінів для гельфільтрації брали із розрахунку 15 – 25 % від об'єму колонки. Елюцію проводили стартовим буферним розчином (0,01 М ФБР, рН 7,2 – 7,4) зі швидкістю потоку 30 – 60 см³ на годину.

Активність зразків флуоресціюючого імуноглобуліну визначали в РПФ, для цього досліджували двократні розведення від 1:2 до 1:128. В якості контрольного діагностичного препарату застосовували Флуоресціюючий антирабічний глобулін «Рабітест-РІФ» (ТОВ Біотестлабораторія, Україна) в робочому розведенні 1:16.

Позитивним і негативним контролем в реакції були мазки-відбитки з головного мозку попередньо зараженої референс-штамом вірусу сказу CVS і здорової білої миші.

Люмінесцентну мікроскопію проводили за допомогою мікроскопу ZEISS Axio Lab.A1 за збільшення x10 – 40 та x100 під імерсійною системою.

Методика імунізації перепілки антигеном вірусу сказу.

Для виготовлення препарату для імунізації перепілки використовували наступні антигени вірусу сказу:

Зразок 1 – штам G 52 Wistar (вакцина IndiRab, серія 62AN10032, виробництва Bharat Biotech International Limited, Індія).

Зразок 2 – штам CVS-11 (отриманий у лабораторних умовах, титр вірусу 6,23±0,11 ТКІД₅₀/0,05 см³).

Для першої імунізації відбирали препарати по 0,5 см³ додавали рівний об'єм повного ад'юванту Фрейнда (Imject, США). Ретельно перемішували до

утворення однорідної емульсії білого кольору. Препарати антигену вводили внутрішньом'язово, в грудну частину в декілька точок.

На 10 і 20 день імунізацію повторювали, антигени готували аналогічно як і при першій імунізації, але з додаванням неповного ад'юванту Фрейнда (Imject, США).

З метою визначення титру імуноглобулінів специфічних до вірусу сказу у перепілок відбирали яйця з 45 доби після початку першої імунізації, виділяли жовткові антитіла та перевіряли у непрямому ІФА.

Виділення та очистка специфічних до вірусу сказу Ig Y з перепелиних яєць.

З метою отримання перепелиних Ig Y обережно відділяли жовток від білку. Жовток розводили дистильованою водою у співвідношенні 1:7 та доводили значення рН до 5,0. Отриману емульсію ретельно перемішували та заморожували при температурі мінус 20 °С протягом ночі. Наступного дня жовтково-водну емульсію розморожували і фільтрували через паперовий фільтр. Додавали хлористий натрій до кінцевої концентрації 9,0 %, після чого доводили рН до 4,0 та залишали на 2 години для преципітації Ig Y. Після чого суміш центрифугували при 3700 g протягом 20 хвилин. Осад глобулінів розчиняли у мінімальній кількості фосфатно-сольового буферу [459].

Перевірка очищених антирабічних Ig Y в ІФА.

Специфічні до вірусу сказу Ig Y перепелиних яєць перевіряли у непрямому варіанті ІФА. З цією метою лунки планшету сенсibiliзували антигенами вірусу сказу, які використовували для імунізації. Зразок 1 (G 52 Wistar) і зразок 2 (CVS-11) розводили 1:50 на карбонатно-бікарбонатному буфері (рН 9,6). Крім цього, як контроль, використовували рекомбінантний антиген вірусу сказу – химерний білок G:N (Chimeric Rabies Virus Glycoprotein Fragment – RVG-9R), який складається з двох нейтралізуючих пептидних епітопів вірусу сказу, в концентрації 10 мкг/см³.

Очищені жовткові антитіла розводили до концентрації 50 мкг/см^3 на фосфатно-сольовому буфері, що містив 0,5% казеїну і 2,5 М сечовини. Реципроктно вносили по $0,1 \text{ см}^3$ в сенсibiliзовані лунки планшету. Як негативний контроль використовували жовткові антитіла специфічні щодо інших антигенів DS1802 у аналогічній концентрації. Інкубували планшет за температури $37 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 60 хвилин. По закінченню інкубації видаляли вміст лунок та промивали чотири рази розчином для промивання планшету по $0,35 \text{ см}^3$. Як кон'югат використовували препарат козячих антитіл проти курячих Ig G – Goat anti chicken FC (AbD Serotec, США), мічені пероксидазою хрому, в робочому розведенні, який вносили по $0,1 \text{ см}^3$ в лунки планшету та інкубували при температурі $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 хвилин. Після чого видаляли вміст лунок і промивали шість разів розчином для промивання планшету по $0,35 \text{ см}^3$.

Вносили в лунки планшету по $0,1 \text{ см}^3$ розчину хромогену (ТМБ) та інкубували планшет при $18\text{-}25 \text{ }^\circ\text{C}$ в темному місці протягом 20 хвилин. Зупиняли кольорову реакцію внесенням у всі лунки по $0,05 \text{ см}^3$ розчину стоп-реагенту. Визначали оптичну густину розчину в лунках з використанням спектрофотометру для планшетів Humareader Plus (Human, Німеччина) при довжині хвилі світла $450/620 \text{ нм}$.

Отримання, перевірка активності та специфічності ФІТЦ-глобулінів.

Діагностичні флуоресціюючі препарати готували відповідно стандартної методики із застосуванням флуоресцеїнізотіоціонату Fluorescein/Oregon Green Polyclonal Antibody виробництва Thermo Fisher Scientific (США) [426].

Дослідження чутливості та специфічності дослідних зразків флуоресціюючого імуноглобуліну проводили в реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ), паралельно визначали робоче розведення кон'югатів (1:2, 1:4, 1:8, 1:16). Для цього, на попередньо підготовлених предметних скельцях, робили мазки-відбитки патологічного матеріалу: як позитивний контроль використовували мозок білої лабораторної миші, попередньо зараженої вірусом сказу (CVS), як негативний – мозок здорової

безпородної білої миші, раніше не вакцинованої проти сказу. Як контроль застосовували Флуоресціюючий антирабічний глобулін «Рабітест-РІФ» (ТОВ Біотестлабораторія, Україна).

Зразки фіксували над полум'ям спиртівки, плавно провівши скельце над полум'ям декілька разів з обох сторін. На зафіксовані зразки наносили по 2–3 краплі контрольного глобуліну (робоче розведення 1:16) і дослідних в усіх розведеннях.

Інкубацію проводили у вологій камері в термостаті за температури $37\pm 0,5$ °С впродовж 30 хв. Для відмивання зразків від незв'язаного ФІТЦ, готували 0,01 М фосфатно-буферний розчин (рН 7,2–7,4) та відмивали зразки тричі по 10 хв. Відмиті зразки поміщали в термостат до повного висихання.

Люмінесцентну мікроскопію проводили за допомогою мікроскопу ZEISS Axio Lab.A1 за збільшення $\times 10$ –40 та $\times 100$ під імерсійною системою.

Облік результатів проводили в хрестах за оцінкою інтенсивності світіння:

++++ – яскраве жовто-зелене світіння;

+++ – чітко виражене досить яскраве жовто-зелене світіння;

++ – неяскраве світіння жовто-зеленого кольору;

+ – слабе світіння, яке виявляється в крупних включеннях зелено-сірого кольору.

Пробу вважали позитивною, якщо в декількох полях зору мікроскопу виявляли типові гранули з інтенсивністю світіння 3–4 хрести.

Методика отримання ліофілізованого Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну.

В якості стабілізуючих кріопротекторних середовищ для ліофілізації імуноглобуліну використовували сахарозу, глюкозу, гліцин, желатину та крохмаль картопляний в різних варіаціях. Середовища готували на 0,01 М фосфатно-сольовому буферному розчині (ФСБ).

Концентрований антирабічний імуноглобулін розводили ФСБ в 10 разів, далі з'єднували розчин із захисним середовищем у співвідношенні 8:2 і фасували в скляні флакони по 1 см³ в асептичних умовах.

Флакони поміщали в касети, які потім ставили в низькотемпературний холодильник за температури мінус 80±0,5 °С на 10-12 годин. Після закінчення терміну заморожування, касети поміщали у вакуумну сушильну установку Alpha 1-4, виробництва фірми MartinChristGmbH (Німеччина) згідно рекомендацій виробника. Швидкість нагрівання на етапі досушування становить 4 – 6 °С/год. Кінцева температура матеріалу 25°С. Загальний час вакуумного зневоднення становить 20 год.

Після висушування флакони з ліофілізованим антирабічним імуноглобуліном під вакуумом закривали корками і ковпачками.

Після ліофілізації, в результаті візуального огляду отриманих зразків антирабічного імуноглобуліну, визначили, що незалежно від складу використаних в досліді захисних середовищ в усіх зразках була сформована «таблетка» (суха речовина із однорідною дрібнозернистою структурою світло-жовтого кольору). Залишкова вологість різних зразків імуноглобуліну була в межах 1,4 – 3 %, а вміст дослідних зразків повністю відновлювався дистильованою водою менше ніж за 60 секунд.

Далі, з метою оцінки застосованих в якості кріопротекторів середовищ, провели дослідження активності зразків антирабічного імуноглобуліну після ліофілізації. Визначення активності здійснювали в ТФ-ІФА відразу після ліофілізації та після витримування зразків за температури 37 °С протягом 7 днів (тест «швидкого старіння»), що відповідало 2 рокам зберігання за температури мінус 18±2 °С.

Калібрування отриманого ліофільно висушеного препарату здійснювали відносно Міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (The 2nd International Standard for anti-Rabies immunoglobulin human) – 30 МО/см³, в реакціях віруснейтралізації *in vivo* та *in vitro*.

Методика постановки FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralisation test) [129, 286].

Розведення сироваток крові.

1. 96-лункова мікропанель № 1 використовується для титрування референт-штаму вірусу сказу CVS-11 (1-4 ряд), для контролю стандартної позитивної ($0,5 \text{ MO/cm}^3$) і негативної сироватки крові, контролю вірусу і культури клітин, а також для однієї дослідної сироватки. Плашка № 2 та інші використовувалися для дослідження сироваток крові.

2. Поживне середовище із вмістом 10 % FBS додається в лунки: мікропанель №1 ряди з 1-го по 4-й і в лунки A9-A12 по 150 мкл; решта лунок, панель № 2 і інші мікропанелі по 100 мкл.

3. Досліджувані сироватки інактивуються при $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 хв. По 50 мкл кожної нерозведеної сироватки додають в 4 суміжні лунки.

4. Розведення сироваток проводяться наступним чином:

А). референс-сироватку і негативну сироватку: за допомогою 50-200 мкл багатоканальної піпетки змішують перше розведення як мінімум 8 разів і переносять по 50 мкл з одного ряду в наступний ряд до останнього, з останнього ряду видаляють 50 мкл.

Б). дослідні сироватки (всі мікропанелі) переносять по 50 мкл з 2-го ряду в наступний до розведення $10^{-2,91}$. Ця процедура може бути змінена для того, щоб досягти кінцевого розведення сироваток, але тоді повинні бути внесені зміни в розмітку мікропанелі.

Внесення референс-штаму вірусу сказу CVS-11.

1. Вірус сказу, штам CVS-11 зберігається в кріопробірках за температури $-800 \text{ }^\circ\text{C}$, або в рідкому азоті. Одна пробірка розморожується під проточною водою і поміщається в подрібнений лід.

2. Одне розведення з цієї пробірки готується для того, щоб отримати $100 \text{ TCID}_{50}/50$ мкл. По 50 мкл цього розведення додається в кожну лунку з сироватками. Для титрування вірусу 50 мкл вірусу додається в лунки з Н1 по Н4 в плашки №1, далі переносяться по 50 мкл з ряду в ряд (плашка №1 ряд 1-

4). Видаляється по 50 мкл з останнього ряду (плашка №1 лунки А1-А4). Вірус не додається в лунки А9-А12 плашки №1 (контроль культури клітин).

3. Мікроплашки інкубуються в вологому інкубаторі з 5% CO₂ за температури 37 °С 60 хвилин.

4. Додавання клітин: Клітини ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10) трипсинізуються з моношару, який вже сформований (клітини знаходяться в експоненціальній фазі їх кінетичного росту), ресуспендується суспензія клітин для отримання посівної дози 4x10⁵ клітин в 1 см³ в ДМЕМ з 10% інактивованої FBS. Додається в кожную лунку по 50 мкл суспензії клітин.

5. Інкубуються мікроплашки 48 годин за температури 37 °С з 5% CO₂.

Фіксація і фарбування.

1. Після періоду 48-годинної інкубації поживне середовище видаляється, мікропанелі споліскуються один раз фосфатно-буферний розчин (ФБР) (PBS, Dulbeccos W/O CA, MG (1X).

2. В подальшому мікропанелі з вирощеними клітинами споліскуються один раз 80 % ацетоном.

3. Потім фіксують 80 % ацетоном протягом 30 хвилин шляхом додавання його в кожную лунку по 160 мкл. Після фіксації мікропанелі висушуються при кімнатній температурі не менше 60 хвилин.

4. Після висушування додають 50 мкл антирабічного ФІТЦ-кон'югату в робочому розведенні в кожную лунку, струшують й інкубують за температури +37 °С 30 хв. Видаляють флуоресціюючий кон'югат і споліскують два рази ФБР. Залишки ФБР видаляють методом витрушуванням плашки по фільтрувальному паперу.

Облік і інтерпретація результатів.

1. Під люмінесцентним мікроскопом при збільшенні 100 оглядається вся поверхня кожної лунки. Оцінка та облік є якісними (+ або –).

2. Контролі (панель № 1) оцінюються першими. Для контролю клітин, титрування CVS, негативної та стандартної сироваток титри вираховуються по методу Spearman-Kärber або графічним методом.

3. Результати титрування вірусу сказу, штам CVS-11 (TCID₅₀), негативної сироватки (D₅₀-середня доза) і позитивного стандарту (D₅₀) відмічають в контрольній картці для кожного з цих 3-х контролів, результати контролів даного тесту зрівнюються з результатами контролів попередніх тестів. Тест вважається достовірним, якщо значення трьох контролів статистично не відрізняється від значення всіх контролів, отриманих в попередніх дослідженнях за цією методикою.

4. Розрахунок результатів. Результати тесту відповідають нейтралізованому вірусу після інкубації з референс-сироваткою та дослідною сироваткою. Ці титри вираховуються по графічному методу або по формулі Spearman-Kärber. Порівняння виміряного титру досліджуваної сироватки з відомим нейтралізуючим титром позитивної стандартної сироватки дає можливість визначити нейтралізуючий титр дослідної сироватки в МО/см³.

Для вираження активності сироваток в МО проводили розрахунок за формулою:

$$X = \frac{A}{B} ME_{co}, \text{ де}$$

X – відносна активність дослідної сироватки крові (МО);

A – титр дослідної сироватки крові (величина обернена розведенню);

B – титр стандартної сироватки крові (величина обернена розведенню);

ME_{co} – активність розведення стандарту антирабічної сироватки крові в МО.

Методика визначення активності антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання.

Зразки сироваток крові були відібрані від собак і котів, що надійшли на дослідження до науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ. Дослідження антирабічної віруснейтралізуючої активності сироваток крові проводилися методом FAVN–тест [129, 286].

Дослідні сироватки крові були розділенні за видом, віком тварин й величиною титру антитіл. Крім індивідуальних досліджень сформовано пули сироваток крові, які були розділенні на декілька аліквот. Окремо було відібрано моно-сироватки, з мінімальним захисним рівнем титру антитіл до вірусу сказу (0,50–0,87 МО/см³).

Сироватки крові від собак (D) і котів (C) були об'єднані в пули (p) і розділені:

- 1 – тварини від 3 до 12 міс.;
- 2 – від 1 до 5 років;
- 3 – старше 5 років.

Аналогічно відібрані моно (m) сироватки.

Аліквоти зберігали за температури $+4 \pm 0,5$ °C та замороженими ($-20 \pm 0,2$ °C). Аналіз сироваток проводили за допомогою FAVN–тесту в день досліджень та відбору аліквот, через 7, 14, 21 і 28 діб, а також на 56 та 84 добу. Окремі аліквоти піддавали 5-ти разовому розморожуванню-заморожуванні з визначенням титру антитіл до вірусу сказу.

Постановка зворотно-транскриптажної полімеразно-ланцюгової реакції.

Для постановки ЗТ-ПЛР використовували попередньо підготовлені зразки, з додаванням Мастер Мікс (12 mM Tris-HCl, 0,5 mM KCl, pH 8,3); 0,25 mM кожного дНТФ, 2,5 mM MgCl₂, по 10 пМ кожного з праймерів (JW6DPL, JW12,); Ензім-мікс (1 одиниць Taq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази). Вода для ПЛР 7 мкл. Реакція складалася з 35 циклів. Ампліфікацію виконували в ампліфікаторі PCR System Pro Flex згідно

інструкції для проведення роботи. В подальшому зразки поміщали в 1,5 % агарозний гель з лунками, із додаванням 0,004 % етидіум броміду, через який пропускали струм 110 V протягом 35 хвилин. Протокол постановки ЗТ-ПЛР представлений на рис. 2.1.

One Step RT-PCR (Invitrogen)			
	(μ l)		(μ l)
2 x reaction mix	12,5	15	187,5
JW6DPL (20uM)	1	15	15
JW12 (20uM)	1	15	15
Mix enzymów Superscript III/Platinum Taq	1	15	15
Woda PCR	7	15	105
	22,5		337,5

22,5 μ l miksu + 2,5 μ l RNA			
--------------------------------------	--	--	--

22	50	30 min
23	95	15 min
24	95	30 sc
26	49	30 sc
27	72	1 min
32	72	10 min
35		
37		
38		
43		
K + RNA (gt1)		
K. + RT-PCR		

Рис. 2.1 Протокол постановки ЗТ-ПЛР.

Для постановки ЗТ-ПЛР в режимі реального часу використовували попередньо підготовлені зразки, з додаванням Мастер Мікс (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3); 0,25 mM кожного дНТФ, 2,5 mM MgCl₂, по 10 пМ кожного з праймерів (JW12.); Ензім-мікс (1 одиниць Taq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази); вода для ПЛР 5,25 мкл (рис. 2.2).

		На 1-ту пробу	Кількість проб	Загальний об'єм	
		ul		ul	
Реагенти для ПЛР	Master Mix	12,5	8	100	
	JW12 (10 uM)	1	8	8	
	N165 (10 uM)	1	8	8	
	RV_N_F (10uM)	1	8	8	
	RV_N_R (10uM)	1	8	8	
genotyp 1	FAM	RabGT1 (5uM)	0,5	8	4
genotyp 1	FAM	LysGT1 (5 uM)	0,5	8	4
genotyp 5	HEX	LysGT5 (5 uM)	0,5	8	4
genotyp 6	CY5	Lys GT6 (5uM)	0,5	8	4
	Mix enzymow	0,25	8	2	
	PCR Water free	5,25	8	42	
	Разом	24		192	

$$24 \text{ ul mix} + 1 \text{ ul RNA} = 25 \text{ ul}$$

Цикли ПЛР	50	30 min	35 циклів
	95	15 min	
	95	15 sc	
	55	1 min	

Рис. 2.2 Протокол постановки ЗТ-ПЛР в режимі реального часу.

Контрольні зразки: 1. позитивний контрольний зразок (ПКЗ); 2. негативний контрольний зразок (НКЗ); 3. внутрішній контрольний зразок (ВКЗ); Зонд для детекції ампліфікації кДНК вірусів сказу в реальному часі мічений флуоресцентним барвником FAM на 5'кінці олігонуклеотиду та гасником флуоресценції HEX на 3'кінці, а для детекції внутрішнього контролю мічений флуоресцентним барвником CY5.

Для постановки гніздового варіанту ЗТ-ПЛР використовували попередньо підготовлені зразки, з додаванням Мастер Мікс (3,6 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8,3); 0,25 mM кожного дНТФ, 2,5 mM MgCl₂, по 0,25 пМ кожного з праймерів (JW12, JW10P); Ензім-мікс (1 одиниця Taq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази). Вода для ПЛР 14,65 мкл. Реакція складалася з 30 циклів. Ампліфікацію виконували в ампліфікаторі PCR System Pro Flex згідно інструкції для проведення роботи. В подальшому зразки

поміщали в 1,5 % агарозний гель з лунками, із додаванням 0,004 % етидіум броміду, через який пропускали струм 110 V протягом 35 хвилин. Протокол постановки представлений на рис. 2.3.

Hemi Nested PCR:		miks reagentów		
		Ilość (µl)	Ilość próbek	Ilość zbiorcza (µl)
	bufor	2,6	10	26
	dNTPs mix, 2 mM	1	10	10
	JW12 (10 uM)	0,25	10	2,5
	JW10P(10 uM)	0,25	10	2,5
	Polimeraza Q (Qiagen)	0,25	10	2,5
	Woda PCR	14,65	10	146,5
		19		190

19 µl miksu + 1 µl produktu PCR (1/100)				
---	--	--	--	--

Próbki:		Warunki PCR			
	18		94	5 min	30 cykli
	19		94	30 sc	
	24		55	30 sc	
	27		72	1 min	
	37		72	10 min	
	K + RNA				
	K + rtRT-PCR (gt5)				
	K. ujemna RNA				
	K. ujemna rtRT-PCR				

Рис. 2.3 Протокол постановки гніздового варіанту ЗТ-ПЛР.

Секвенування вуличних ізолятів вірусу сказу.

Секвенування зразків проводили з допомогою пари олігонуклеотидних праймерів (JW6DPL (CAATTCGCACATTTTGTG) позиція 660-641 та JW12 (ATGТААСАСС(С/Т)СТАСААТТG) позиція 55-73), яка використовувалася в ЗТ-ПЛР та секвенатора фірми HELICON «Applied Biosystems ABI PRISM».

Біостатистична обробка результатів.

Порядок роботи в програмі MEGA 6.06:

1. У програмі MEGA наявний вбудований WEB-браузер, за допомогою якого безпосередньо завантажували послідовності з GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) у форматі FASTA та одразу додавали їх до інших послідовностей для проведення вирівнювання. Також наявний вбудований WEB-браузер, за допомогою якого порівнювали послідовності з GenBank – програма BLAST. Для відкриття браузера у вікні **Web** знаходили **Query GenBank або Do BLAST search**.

2. Знайшовши у браузері програми необхідну послідовність натискали **Add to Alignment** для вилучення з бази послідовності та додавання її до вирівнювання.

3. Наявні файли з послідовностями у форматі GenBank, Phylip, .txt у меню **Alignment > Alignment Explorer/CLUSTAL** обирали пункт **Alignment Editor**, в контекстному меню якого є пункт **Retrieve sequences from a file**. Така процедура дозволила додавати послідовності до вирівнювання у вікні **Alignment Explorer**. Або обрати пункт **Create a new Alignment**.

4. Коли робота виконується з даними, отриманими після секвенування зразків ДНК (РНК), у вікні **Alignment Explorer** у меню **Sequencer** обрали **Edit Sequencer File**. Це експортувало дані секвенсів у форматі **.abi**.

5. Програма видавала діалогове вікно із запитанням, з яким типом даних працюємо, з нуклеотидними, чи з амінокислотними послідовностями.

6. У вікні **Alignment Explorer** вибирали в меню **Edit** пункт **Insert Sequence from File**. Це дозволяло додавати до вирівнювання необхідні послідовності у різних форматах (наприклад, FASTA, Phylip, MEGA, txt тощо). Примітка: вирівняні за допомогою інших програм (наприклад, CLUSTAL) послідовності можна експортувати у формат MEGA, використовуючи меню **File > Convert to MEGA Format**.

7. В меню **Edit** обирали пункт **Select All**, далі в меню **Alignment** пункт **Align by ClustalW**. Програма запитувала про необхідні параметри вирівнювання, після чого відбувалося вирівнювання.

8. Збереження вирівняні послідовності у форматі MEGA (**.meg**) зберігали за допомогою меню **Data > Export Alignment > MEGA Format**. При збереженні файлу програма задавала питання, чи є дані послідовності білок-кодуєчими. Якщо передбачалося додавати в подальшому до вирівнювання ще послідовності, зберігали його за допомогою команди **Save Session** у меню **Data** у вікні **Alignment Explorer**. Збережений файл з вирівнюванням мав розширення **.mas**.

9. Для побудови філогенетичних дерев у меню **File** основного контекстного меню програми обрали пункт **Open Data** та відкривали необхідний файл (**.meg**) для подальшої роботи.

10. У меню **Phylogeny > Construct Phylogeny** обрали метод побудови дерев – **Neighbor-Joining (NJ)**, **Minimum Evolution (ME)**, **Maximum Parsimony (MP)** або **UPGMA**.

11. У вікні **Analysis Preferences** обирали опцію бутстреп-аналізу для перевірки статистичної достовірності побудованих дерев. Для цього переходили на вкладку **Test of Phylogeny > Test of Inferred Phylogeny > Bootstrap**, обирали необхідну кількість реплік (Replications) (зазвичай, 1000 реплік для методу **NJ**) та довільне випадкове число (random seed, будь-яке непарне).

12. У попередньому вікні **Analysis Preferences** у меню **Options Summary** обирали тип видалення проміжків, що могли виникнути при вирівнюванні послідовностей (**gaps**). Для цього у рядку **>Gaps/Missing Data** обирали тип повне видалення (**Complete Deletion**) або парне видалення (**Pairwise Deletion**).

13. Для нуклеотидних замінів обрали модель, для цього в рядку **Model>** обрали необхідну модель замінів (р-відстань, кількість нуклеотидних замінів, модель Джукса-Кантора, 2-х параметрова модель Кімури, модель Тамури-Неї).

14. У рядку **Pattern Among Lineages** > вказали тип розподілу нуклеотидних замін по сайтах у послідовності – однаковий чи різний (**Same/Different**). Якщо розподіл замін у послідовності, що аналізувався, був нерівномірний, у наступному рядку **Rates Among Sites** > обрали, яким чином ці заміни розподілені у послідовності – однорідно (**Uniform rates**) чи за гамма-розподілом (**Different- Gamma Distributed**).

15. При виборі розподілу замін за гамма-розподілом вказали у рядку **Gamma Parameter** > α -параметр форми розподілу замін.

16. В подальшому натискали опцію **Compute** для побудови дерева. У вікні **Tree Explorer** з'являлося побудоване за обраними параметрами дерево.

17. У меню **Image** у вікні **Tree Explorer** копіювали побудоване дерево у буфер обміну або зберігали дерево у форматах **.TIFF** або **.EMF**.

Статистична обробка результатів.

В разі наукової доцільності отримані результати обробляли статистично з обрахуванням середніх арифметичних величин (M), середньої квадратичної похибки (m) і ступеня вірогідності різниці (p) між показниками. Цифрові результати досліджень обробляли загальноприйнятими методами варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2010. Відповідно критерію Стюдента вираховували три ступені вірогідності * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ [197, 443, 286, 359, 360, 426, 148].

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

РОЗДІЛ 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОЯВУ СКАЗУ В УКРАЇНІ

3.1. Описово-статистична характеристика прояву сказу в Україні протягом на початку ХХІ століття

Надійний контроль інфекційних хвороб передусім передбачає продуктивне реагування та спостереження за ними. Продуктивне реагування під час спалаху сказу – це виявлення джерела інфекції, швидка його ізоляція, забезпечення захисту тварин і людей, які були в контакті із хворими тваринами (щеплення), робота з населенням щодо підвищення знань про небезпеку цього захворювання, його профілактику й заходи боротьби. Система спостереження за цим захворюванням, як доволі небезпечним зоонозом має пріоритетний характер. Аналіз інформації про спалахи сказу на території України за період 1999–2018 рр. може бути використаний для формулювання пріоритетів контролю, планування протиепізоотичних заходів, поділу ресурсів, епізоотичного й епідемічного прогнозування та профілактики захворювання у тварин і людей.

За аналізований період сказ в Україні реєструвався серед свійських і диких тварин, майже щорічно реєстрували спорадичну захворюваність серед людей. Серед диких тварин хворобу реєстрували у ласок, видр, бобрів, щурів, тхорів, борсуків, косуль, диких звірів, куниць, білок, ондатр, рисей, шакалів, лисиць, вовків, єнотоподібних собак, лосів, диких свиней; серед свійських у котів, кролів, хутрових звірів, собак, фредок, хом'яків, коней, свиней, дрібної рогатої худоби, великої рогатої худоби (табл. 3.1, рис. 3.1).

Таким чином, за період що аналізується в Україні сказ зареєстровано серед 18 видів диких і 10 видів свійських тварин. Серед свійських тварин, які захворіли на сказ домінують коти – 8384 хворих тварин, або 42,6%, серед собак – 6375 захворілих тварин (32,4%). Значна кількість захворілих тварин реєструється серед великої рогатої худоби – 4311 тварин, або 21,89%. Останнє можна пояснити тим фактом, що ці тварини залежно від типу утримання

можуть випасаються, як наслідок – ставати жертвами хворих на сказ диких тварин, а також захворілих собак і котів.

Таблиця 3.1

Захворюваність тварин на сказ в Україні, 1999–2018 рр.

Вид тварин	Неблагополучних пунктів, %	Хворих тварин, голів %
Свійські тварини		
Коти	7388/45,34	8384/42,6
Собаки	5421/33,27	6375/32,4
Хутрові звірі	7/0,04	7/0,035
Кролі	6/0,036	6/0,03
Хом'яки	22/0,13	23/0,12
Коні	94/0,57	128/0,65
ДРХ	329/2,01	419/2,12
Свині	21/0,12	31/0,16
Фредки	–	3/0,015
ВРХ	3005/18,44	4311/21,89
Всього, свійських:	16293/100	19687/100
Дикі тварини		
Білки	1/0,08	2/0,014
Видри	7/0,06	7/0,05
Шакали	1/0,08	1/0,007
Ондатри	1/0,08	1/0,007
Рисі	2/0,16	3/0,021
Бобри	13/0,11	15/0,11
Щури	41/0,35	44/0,32
Тхори	59/0,5	67/0,5
Ласки	9/0,07	14/0,1
Борсуки	103/0,87	105/0,78
Косулі	14/0,12	16/0,12
Дикі свині	7/0,06	7/0,05
Лосі	8/0,07	8/0,06
Єнотовидні собаки	419/3,58	507/3,78
Куниці	334/2,85	363/2,7
Вовки	146/1,25	158/1,17
Лисиці	10345/88,3	12136/90,6
Інші дикі звірі	207/1,76	228/1,7
Всього, диких:	11717/100	13392/100
Разом:	28010	33079

Серед диких тварин найбільшу кількість захворілих зареєстровано серед лисиць – 12136 тварин, або 90,6% від усіх захворілих. В переліку захворілих за

аналізований період диких тварин з'явився аллохтонний для нашої території вид – шакал (2015 рік, 1 тварина). Хоча рисі (3 хворих тварини), ондатри (1), білки (2), видри (7 хворих тварин) є автохтонними видами проте, як бачимо, захворювання серед цих видів тварин реєструють не часто.

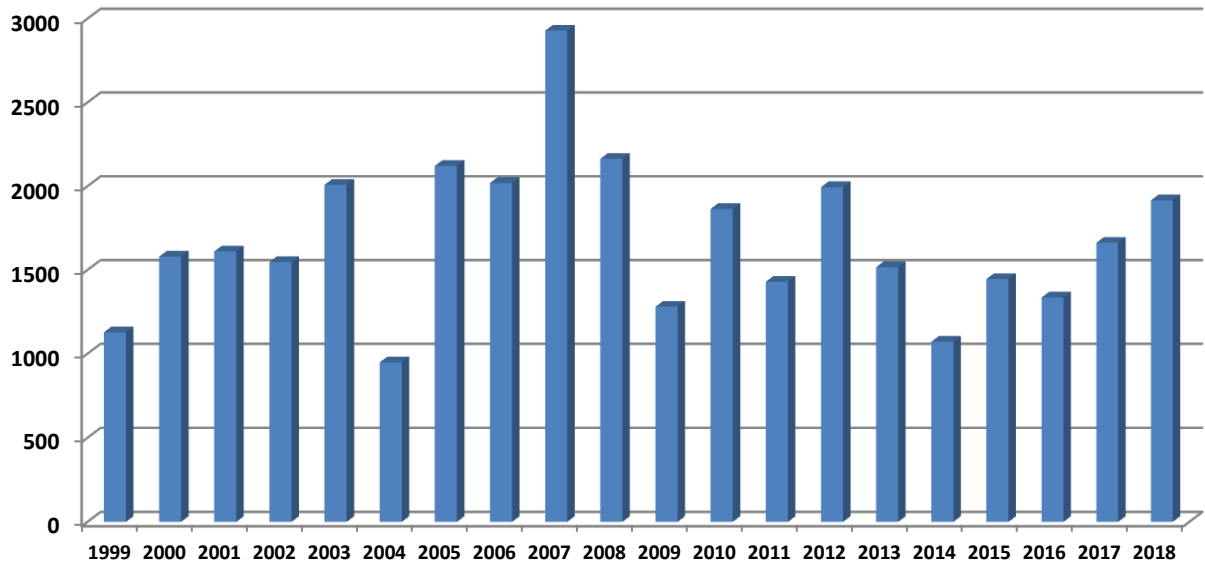


Рис. 3.1 Динаміка випадків сказу в Україні за період 1999–2018 рр.

Аналіз епізоотичної ситуації зі сказу за період 1999–2018 рр. показав, що загалом на сказ захворіло 33079 тварин, із них 19687 (59,5%) тварин – свійські, 13392 (40,5%) – дикі. Відсоток хворих тварин із найвищими показниками захворюваності від загальної кількості уражених становить: для котів – 25,3%, для собак – 19,3%, великої рогатої худоби – 13%, лисиць 36,7%. Хвороба реєструвалась у 10 видів свійських тварин і 18 видів диких (рис. 3.2).

Серед диких тварин найбільшу захворюваність зареєстровано в лисиць – 12136 тварин, або 90,6%. Високі показники захворюваності виявили в енотоподібних собак – 507, або 3,78%, куниць – 363, або 2,7%, вовків – 158 тварин, або 1,17%. Решта видів диких тварин хворіли у межах до 100 тварин або не більше 1%. Серед свійських тварин найвищі показники захворюваності виявили у котів – 8384 тварин або 42,6%, собак – 6375 або 32,4%, великої рогатої худоби – 4311 або 21,89, у дрібної рогатої худоби – 419 тварин або 2,12%. Решта видів свійських тварин хворіли в кількості біля 100 голів і менше

1%. Серед свійських тварин на один неблагополучний пункт припадало – 1,2 тварини, серед диких – 1,14.

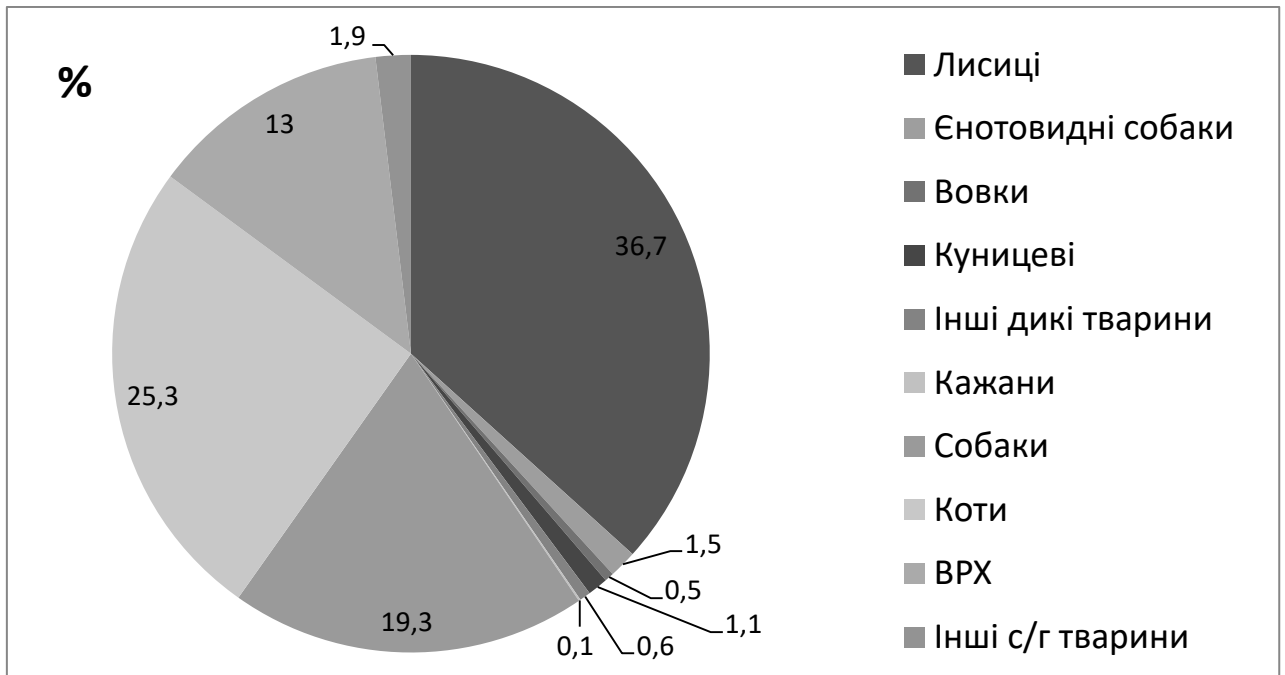


Рис. 3.2 Видова структура захворюваності тварин на сказ в Україні за 1999-2018 рр.

Аналіз динаміки неблагополучних зі сказу пунктів (рис. 3.3) показує, що за період 1999–2018 рр. реєстрували від 819 до 2697 неблагополучних пунктів. Фіксується декілька періодів підйому випадків, після зниження кількості випадків майже наполовину. Так, у 1999 р. зареєстровано 911 неблагополучних пунктів, далі поступове збільшення з виходом на пік у 2003 р. – 1723, у 2004 р. – 819 неблагополучних пунктів, з виходом на підйом у 2008 р. – 2697, у 2009 р. – 1094 неблагополучних пункти зі збільшенням кількості у 2012 р. – 1727, у 2015 р. – 855 неблагополучних пунктів, із поступовим виходом на пік у 2018 р. – 1466.

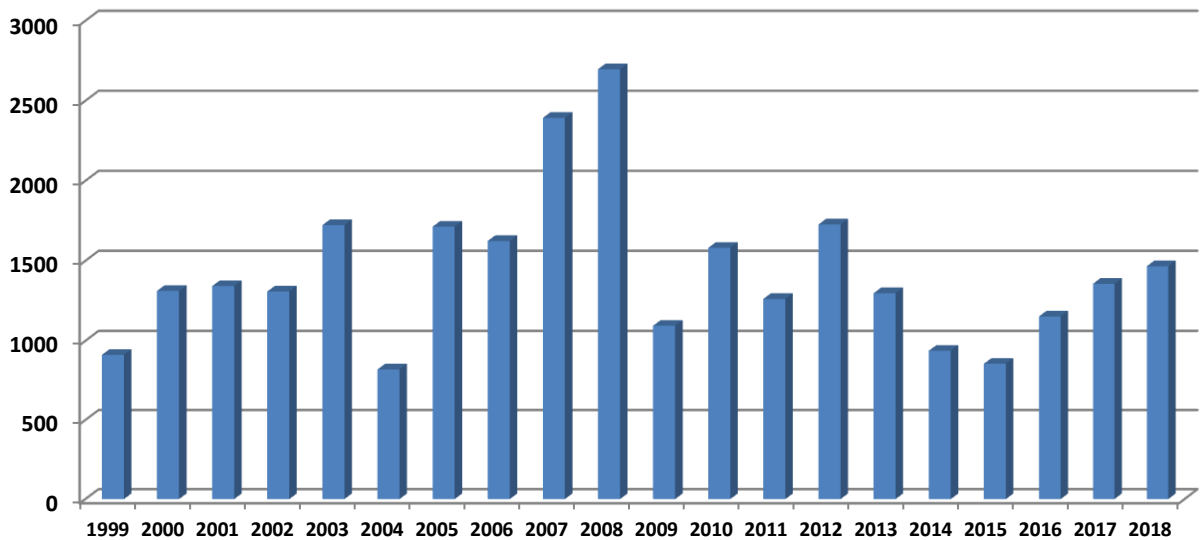


Рис. 3.3 Динаміка неблагополучних зі сказу пунктів в Україні за період 1999–2018 рр.

Аналізуючи рис. 3.4, бачимо, що кількість диких тварин, що захворіли на сказ у роках варіює від 377 до 1343 захворілих тварин, серед лисиць від 344 до 1194, й серед решти видів диких від 30 до 149 тварин. Графічне вираження дуже чітко показує практично повне накладання трендів загальної захворюваності з лисицями. Останнє ще раз підтверджує їх домінуючу роль і переважання в загальній кількості серед диких тварин.

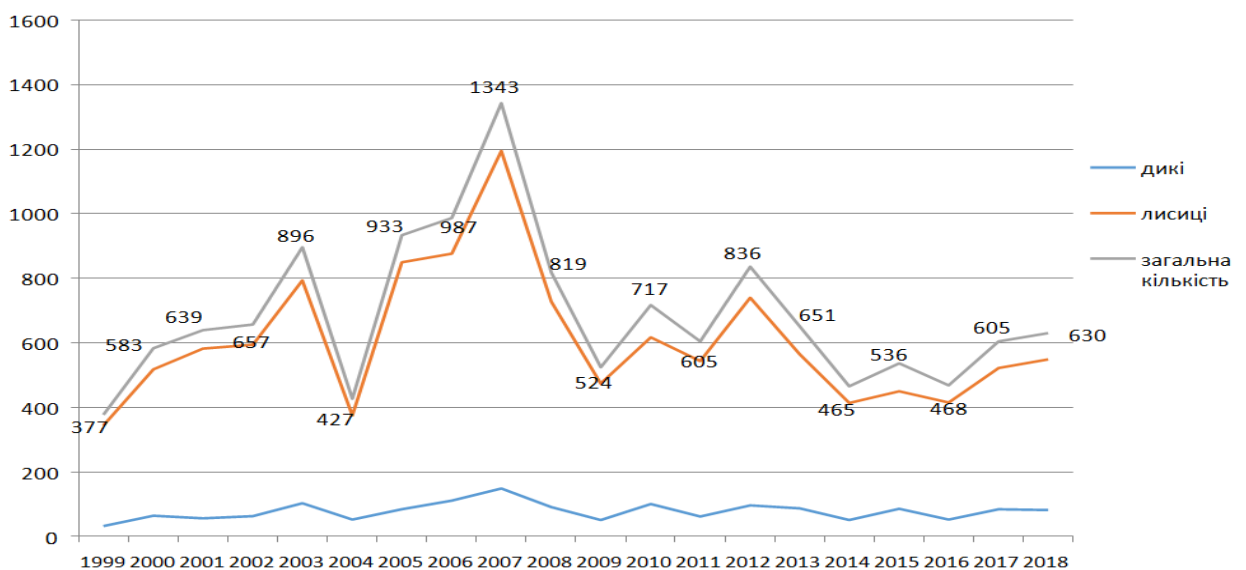


Рис. 3.4 Динаміка захворюваності на сказ серед диких тварин за період 1999–2018 рр.

На рис. 3.5 показано захворюваність собак і котів, які серед свійських є домінуючими, й накладання графіків захворюваності цих двох видів дають практично лінію загальної кількості захворілих серед свійських.

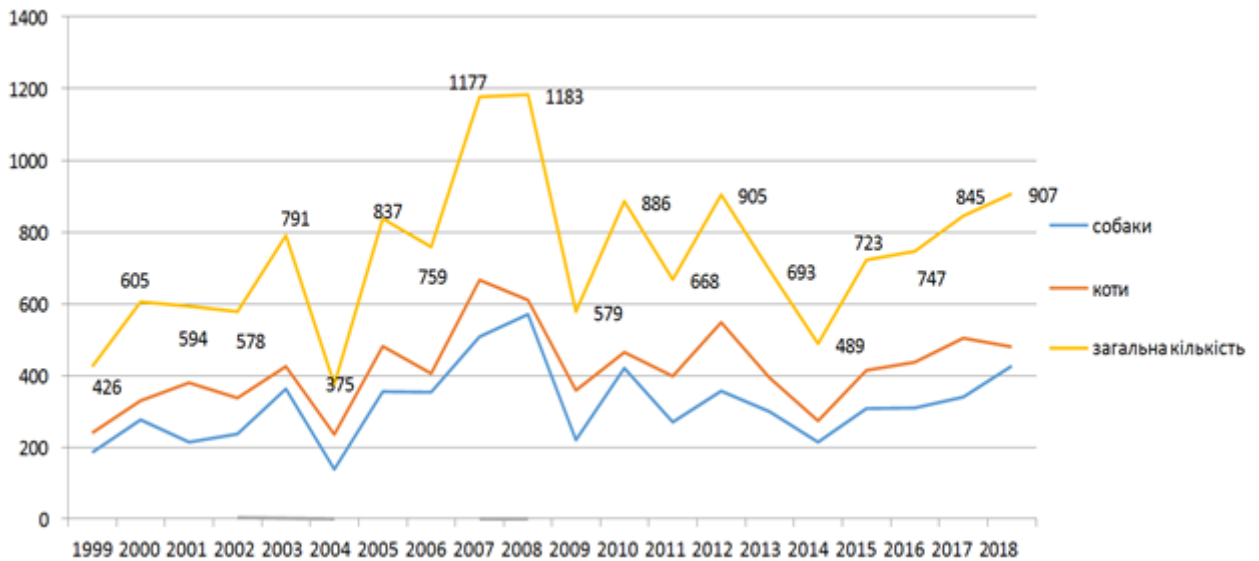


Рис. 3.5 Динаміка захворюваності на сказ серед свійських тварин за період 1999–2018 рр.

Доволі показовими є дані наведені на рис. 3.6, коли аналізуються відомості із захворюваності диких і свійських тварин. Тренди графічного вираження кількості захворілих серед диких і свійських тварин майже співпадають. Адже відмінності в окремі роки становлять 3,6–30,8%, проте чітко накладаються одне на одного. Графік чітко показує більш низький рівень захворюваності серед сільськогосподарських тварин.

У 2018 році тваринами (дикими і свійськими) укушені 49709 громадян, які звернулись до медичних установ. Із них щеплені тварини здійснили укуси 19570 громадян, нещеплені тварини завдали 30139 укусів (60,6%)(табл. 3). Щепленими собаками укушені 15336 людей, не щепленими – 14950 (49,4%), щепленими безпритульними собаками покусано 253 людини, не щепленими безпритульними собаками – 8788 (97,2%). Щеплені коти завдали 3939 укусів людям, не щеплені – 5470 (58,1%). Іншими видами тварин (дикими і

свійськими) щепленими завдано 42 укуси, не щепленими – 1032 (96,1%). Показовими є дані щодо укусів людей нещепленими безпритульними собаками та тваринами інших видів, де серед цих категорій (адже вони в цьому разі закономірно домінують) відповідно їх відсоток становив 97,2 та 96,1. Щодо укусів собаками (щепленими й нещепленими) вони розподілись приблизно порівну. Укуси щепленими собаками в кількості 15336 можна пояснити агресивністю тварин, яких утримують власники, особливо в сільській місцевості, де цінують більш злих тварин, так би мовити добрих сторожів. Адже якщо тварина проявляє агресію без видимих на те обставин, вона просто має виводитись із продовжувачів роду (це стосується однаковою мірою собак і котів). Корелятивно зв'язати захворюваність котів (480 хворих тварин) і собак (427 хворих тварин) у 2018 році із даними неспровокованих нападів не вдалося.

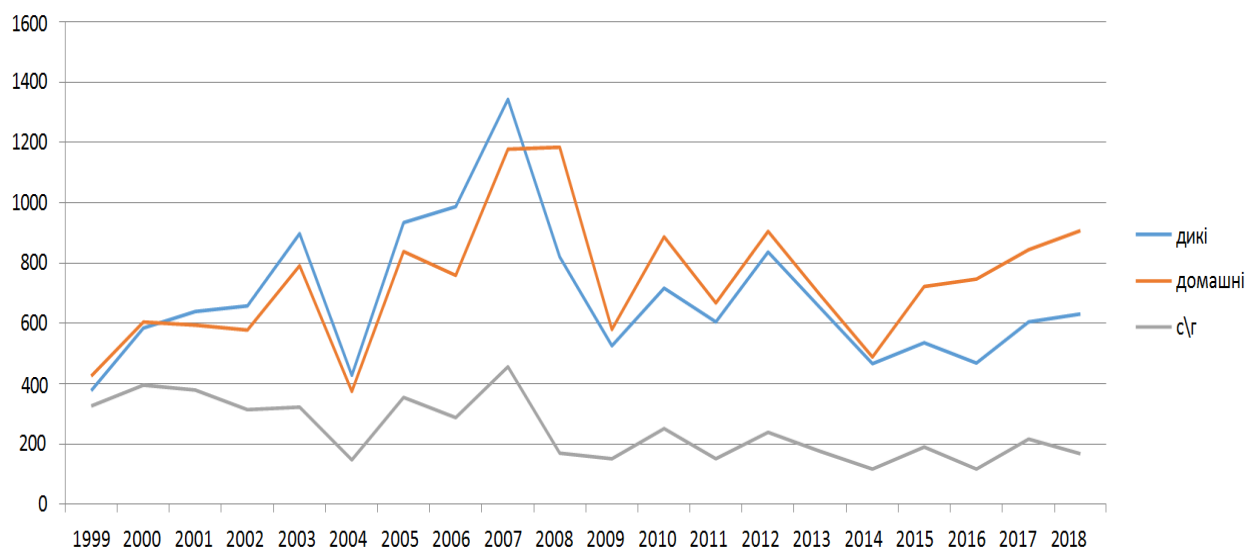


Рис. 3.6 Динаміка захворюваності на сказ серед свійських, диких і свійських тварин за період 1999–2018 рр.

На рис. 3.7 нами відтворена захворюваність різних видів (ВРХ, коти, лисиці, собаки) і категорія «всі види» у графічному виразі поквартально. Характерно, що лінії трендів захворюваності того чи іншого виду значною мірою повторюють графічну складову «всі види». Майже ідентичні лінії «всі види» і «лисиці», відрізняючись лише висотою підйомів та спадів.

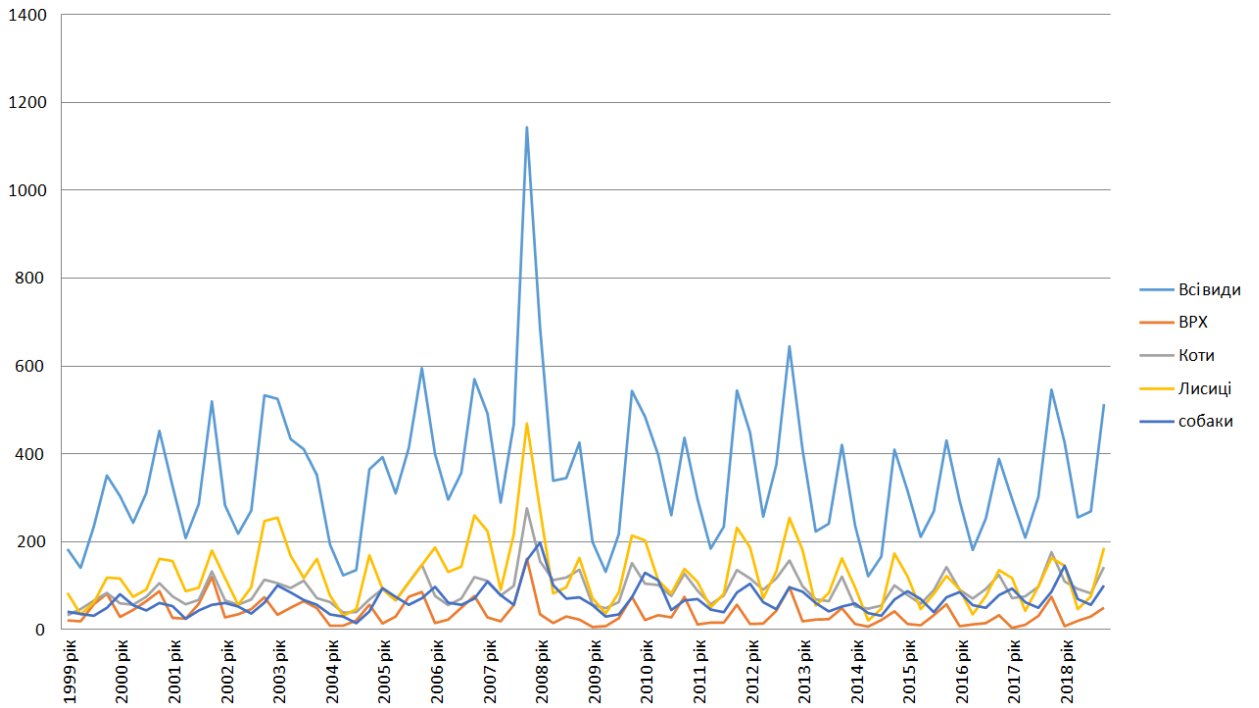


Рис. 3.7 Захворюваність різних видів тварин на сказ по кварталах за період 1999–2018 рр.

На рис. 3.8 в графічному вигляді показано сезонність загальної кількості тварин із найбільшими показниками захворюваності (лисиці, собаки, коти, ВРХ) за останні 20 років.

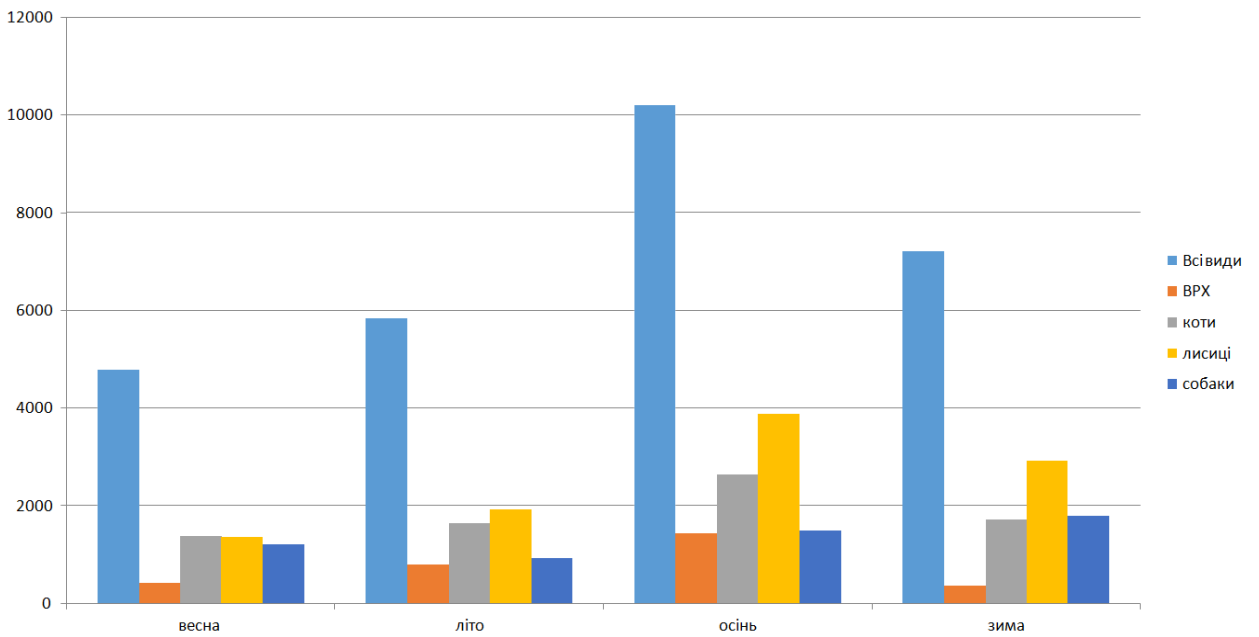


Рис. 3.8 Сезонність прояву сказу в Україні за період 1999–2018 рр.

Графік чітко показує домінування осінньо-зимової складової. Такий прояв сезонності пов'язаний із міграцією молодих тварин у пошуках нового місця проживання, активним переміщенням тварин внаслідок осінніх польових робіт, контактами із нанесенням покусів конкурентами і можливістю інфікування з подальшим захворюванням. Контакти хворих лисиць із нещепленими бездомними і свійськими собаками, котами й великою рогатою худобою, яка знаходиться на пасовищах, призводять до захворювання тварин зазначених видів.

Аналізуючи показники напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в областях України, здійснено об'єднано в трирічні періоди та проведено епізоотологічне районування на п'ять зон (до 50 випадків сказу; 50-150; 150-300; 300-450 та більше 450 протягом трьох років).

Були проаналізовані матеріали офіційної звітності за формою Вет-2 щодо лабораторно підтверджених випадків сказу в 2000-2017 рр. Результати епізоотологічного зонування України щодо напруженості епізоотичної ситуації зі сказу протягом 2000-2017 рр. представлено в табл. 3.2.

Так, території восьми областей (Миколаївська, Рівненська, Волинська, Львівська, Тернопільська, Івано-Франківська, Закарпатська та Чернівецька) віднесені до зони з низькою напруженістю епізоотичної ситуації, територія семи областей складала зону із середньою напруженістю епізоотичної ситуації із кількістю випадків сказу від 50 до 150 протягом трьох років, також п'ять областей входило в зону із середньою напруженістю із поширенням сказу в межах 150-300 випадків. В чотирьох областях (Сумська, Полтавська, Харківська, Чернігівська) встановлена загрозна напруженістю епізоотичної ситуації щодо сказу (рис. 3.9). Загалом в період 2000-2002 рр. лабораторно встановлено діагноз сказ у тварин в 4632 випадках.

Таблиця 3.2

Напруженість епізоотичної ситуації зі сказу в областях України за 2000-2017 рр.

2000-2002		2003-2005		2006-2008		2009-2011		2012-2014		2015-2017			
до 50	Волинська	до 50	АР Крим	до 50	АР Крим	до 50	АР Крим	до 50	АР Крим	до 50	Нема даних	АР Крим	
	Закарпатська		Волинська		Закарпатська		Закарпатська		Закарпатська		Закарпатська	до 50	Закарпатська
	Івано-Франківська		Закарпатська		Івано-Франківська		Івано-Франківська		Івано-Франківська		Луганська	Чернівецька	
	Львівська		Івано-Франківська		Львівська		Чернівецька		Чернівецька		Полтавська	м. Київ	
	Миколаївська		Львівська	Чернівецька	м. Київ	м. Київ	Чернівецька	50-150	Івано-Франківська				
	Рівненська		Рівненська	м. Київ	Волинська	Волинська	м. Київ	Київська	Київська				
	Тернопільська		Тернопільська	50-150	Київська	Київська	Волинська	Львівська	Львівська				
	Чернівецька		Чернівецька	Рівненська	Кіровоградська	Луганська	Івано-Франківська	Миколаївська	Миколаївська				
м. Київ	м. Київ	Київська	Одеська	Львівська	Львівська	Рівненська	Рівненська	Одеська	Полтавська	Сумська	Тернопільська		
50-150	АР Крим	50-150	Київська	150-300	Кіровоградська	50-150	Миколаївська	50-150	Миколаївська	50-150	150-300	Волинська	
	Донецька		Миколаївська		Миколаївська		Полтавська		Рівненська			Київська	Дніпропетровська
	Запорізька		Вінницька		Одеська		Рівненська		Сумська			Кіровоградська	Житомирська
	Київська		Дніпропетровська		Тернопільська		Тернопільська		Тернопільська			Харківська	Харківська
150-300	Кіровоградська	150-300	Житомирська	300-450	Вінницька	150-300	Донецька	150-300	Житомирська	150-300	150-300	Харківська	
	Херсонська		Запорізька		Дніпропетровська		Житомирська		Запорізька			Кіровоградська	Херсонська
	Одеська		Кіровоградська		Житомирська		Запорізька		Кіровоградська			Херсонська	Хмельницька
	Вінницька		Херсонська		Полтавська		Кіровоградська		Кіровоградська			Херсонська	Черкаська
150-300	Черкаська	300-450	Хмельницька	300-450	Сумська	150-300	Одеська	150-300	Херсонська	150-300	150-300	Луганська	
	Дніпропетровська		Донецька		Харківська		Сумська		Сумська			Хмельницька	Рівненська
	Житомирська		Луганська		Херсонська		Херсонська		Херсонська			Черкаська	Херсонська
	Хмельницька		Одеська		Черкаська		Черкаська		Черкаська			Чернігівська	Херсонська
300-450	Луганська	300-450	Сумська	450 ↑	Донецька	300-450	Чернігівська	300-450	Донецька	300-450	300-450	Хмельницька	
	Сумська		Харківська		Запорізька		Дніпропетровська		Запорізька			Хмельницька	Чернігівська
	Харківська		Черкаська		Луганська		Харківська		Одеська			Хмельницька	Харківська
	Чернігівська		Чернігівська		Хмельницька		Хмельницька		Дніпропетровська			Дніпропетровська	Черкаська
450 ↑	Чернігівська	450 ↑	Полтавська	450 ↑	Чернігівська	450 ↑	Вінницька	450 ↑	Вінницька	450 ↑	450 ↑	Вінницька	
	Сумська		Харківська		Донецька		Вінницька		Вінницька			Вінницька	
	Полтавська		Черкаська		Запорізька		Харківська		Харківська			Харківська	
	Харківська		Чернігівська		Луганська		Хмельницька		Хмельницька			Хмельницька	



Рис. 3.9 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2000-2002 рр.

Протягом 2003-2005 рр. лабораторно підтверджено 4968 випадків захворювання на сказ тварин. Найбільш неблагополучна ситуація залишилась в Полтавській області (рис. 3.10). Встановлено зниження напруженості епізоотичної ситуації в Харківській, Сумській та Чернігівській областях. Однак виявлено збільшення захворювання тварин на сказ в Черкаській, Одеській та Донецькій областях.



Рис. 3.10 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2003-2005 рр.

Протягом наступних трьох років (2006-2008 рр.) епізоотична ситуація щодо сказу в Україні суттєво погіршилась (рис. 3.11). Протягом цього періоду зареєстровано 7139 випадків сказу серед тварин. До зони з низькою напруженістю епізоотичної ситуації увійшло лише чотири області та АР Крим. До зони із загрозливою епізоотичною ситуацією віднесено Донецьку, Запорізьку, Луганську, Хмельницьку та Чернігівську області. Крім цього значно погіршилася ситуація у Київській, Миколаївській, Тернопільській, Вінницькій, Дніпропетровській, Житомирській та Херсонській областях.



Рис. 3.11 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2006-2008 рр.

В період 2009-2011 рр. лабораторно підтверджено 4531 випадок сказу серед тварин, а кількість областей, які увійшли за результатами районування в зону з середньою напруженістю (50-150-300 випадків) епізоотичної ситуації, збільшилась до 17 (рис. 3.12). До зони з високою напруженістю увійшло лише три області – Дніпропетровська, Харківська та Хмельницька. Встановлено погіршення ситуації лише у Вінницькій області, де зареєстровано 538 випадків захворювання тварин.



Рис. 3.12 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2009-2011 рр.

Протягом 2012-2014 рр. ситуація практично не змінилася порівняно із попереднім періодом, виявлено 4568 випадків захворювання тварин на сказ із певними географічними змінами напруженості (рис. 3.13). Епізоотична ситуація щодо сказу значно покращилась в Луганській, Полтавській та Сумській областях, що є підтвердженням ефективності проведених кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних із застосуванням рекомбінантної вакцини «Броварабіс VRG». За результатами районування в цей період загрозлива зона встановлена у Вінницькій області, де зафіксували 658 випадків сказу.



Рис. 3.13 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2012-2014 рр.

Протягом 2015-2017 рр. ситуація не зазнала суттєвих змін порівняно із попереднім періодом. Діагностовано 4446 випадків захворювання тварин на сказ (рис. 3.14). Загрозлива зона знову встановлена у Вінницькій області, де підтверджено 521 випадок захворювання тварин на сказ. Епізоотична ситуація погіршилася в Луганській і Полтавській областях, а покращилася в Одеській, Дніпропетровській та Запорізькій областях. Однак, на нашу думку, зміни (як покращення, так і погіршення) напруженості епізоотичної ситуації не є сталими, тому що протягом цього періоду не застосовувалося радикальних протиепізоотичних заходів на кшталт широкомасштабних кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин.



Рис. 3.14 Картограма напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в Україні протягом 2015-2017 рр.

Отже, аналізуючи епізоотичну ситуацію зі сказу протягом 2000-2017 рр. слід зазначити наявність тенденції до росту напруженості епізоотичної ситуації в західних областях із певним покращенням на сході, що може бути наслідком більш тривалого впровадження пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Однак західні області продовжують залишатись більш благополучною зоною із низькою та середньою напруженістю епізоотичної ситуації, а Закарпатська та Чернівецька області постійно перебували у зоні із низькою напруженістю епізоотичної ситуації щодо сказу протягом всього аналізованого часового проміжку.

Епідеміологія сказу.

В Україні до 2003 року з приводу укусів тварин до медичних установ щороку зверталось понад 100 000 людей (майже 210 на 100 000 населення). Щорічно до 20–23 тис. осіб отримували призначення на проведення антирабічних щеплень, з них понад 60% – за безумовними показниками. Нині в

Україні зареєстровані вакцини для профілактики сказу в людей індійського виробництва РАБПУР та ІНДІРАБ, а також вакцина VERORAB (Франція).

За отриманими нами в Центрі громадського здоров'я МОЗ України відомостями (табл. 3.3) за антирабічною допомогою зверталось від 63753 осіб (2014) до 110202 (2003).

Таблиця 3.3

Захворюваність людей на сказ та показники антирабічної допомоги

Роки	Захворіло та померло від сказу	Звернулось за антирабічною допомогою, осіб	Вакциновано проти сказу, % від звернень
1999	1	–	–
2000	1	–	–
2001	5	–	–
2002	2	–	–
2003	4	110202	19902/18,1
2004	1	104912	17920/17,1
2005	4	102952	20679/20,1
2006	1	95865	14149/14,8
2007	7	101519	21840/21,5
2008	2	106496	21454/20,1
2009	1	97156	18715/19,3
2010	3	95020	19366/20,4
2011	6	96682	19660/20,3
2012	0	98446	20057/20,4
2013	3	86661	18358/21,2
2014	4	63753	13706/21,5
2015	6	70129	15865/22,6
2016	4	67529	11897/17,6
2017	2	69153	16131/23,3

Примітка: «–» – відомості відсутні.

Охоплено щепленнями від тих що звернулись за допомогою від 14,8% (14149 осіб в 2006) до 23,3% (16131 осіб у 2017). За аналізований період загинуло 58 людей. У Донецькій області – 9 загиблих (2001, 2007(2), 2008, 2010, 2011, 2013, 2015(2), у Харківській – 6 (2000, 2005, 2008, 2010, 2013, 2015), у Київській і м. Київ – 5 (2003, 2011(2), 2013, 2016), у Одеській – 5 (2001(2), 2014, 2015, 2017), у Чернігівській – 5 (2001, 2005, 2006, 2011, 2016), у Дніпропетровській – 4 (2015(2), 2016, 2017), у Кіровоградській – 4 (2001, 2005(2), 2014), у Луганській – 3 (2002, 2007(2), у Львівській – 3 (2003, 2009, 2018), у Вінницькій – 2 (2007(2), у Миколаївській – 2 (1999, 2002), у Рівненській – 2 (2014, 2016), у Тернопільській – 2 (2010, 2011), у Запорізькій – 1 (2004), у Полтавській – 1 (2003), у Сумській – 1 (2011), у Херсонській – 1 (2007), у Черкаській області – 1 загиблий (2003).

Зазначена епідемічна ситуація є свідченням необхідності удосконалення наявної системи профілактичних антирабічних заходів серед диких і свійських тварин, а також просвітницьких заходів серед населення щодо джерел і резервуарів збудника сказу, способів інфікування, засобів профілактики сказу серед людей та небезпеки захворювання на сказ.

Результати підрозділу 3.1 висвітлені в наукових працях [9, 21, 54, 34, 251, 57].

3.2. Дослідження поширення сказу в Україні з використання інструментів ГІС

Визначення просторових закономірностей і встановлення статистично-достовірних географічних кластерів випадків сказу може бути корисним для прийняття рішень з ефективного розподілу зусиль у боротьбі з цим захворюванням. Саме тому, впровадження геоінформаційних систем для оцінки епізоотичної ситуації зі сказу та використання на практиці отриманих результатів дасть змогу створити нові заходи та підвищити ефективність механізмів контролю сказу на усій території України. Прийняття додаткових

протиепізоотичних заходів, або корегування існуючої системи можливе за рахунок здійснення як загальних (забезпечення додаткового контролю популяції диких тварин, покращення системи боротьби з безпритульними тваринами), так і спеціальних міроприємств (додаткої кампанії з антирабічної вакцинації свійських тварин; збільшення щільності розповсюдження принад з вакциною на один квадратний кілометр при проведенні пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу; збільшення кратності цього заходу; коригування термінів проведення тощо).

3.2.1. Просторово-часова характеристика прояву сказу в Чернігівській області в 2011-2016 рр.

Для здійснення аналізу епізоотії сказу, виявлення просторових і часових закономірностей на сучасному рівні обов'язковою умовою є проведення геокодування випадків сказу. Використання такого сучасного інструменту як ГІС, за рахунок використання точних координат випадків сказу, дає можливість досконально оцінювати поширення сказу на певній території, яка може бути обмежена як географічними бар'єрами такими як річки або гори, так і адміністративними кордонами, що дає можливість для більш досконалого вивчення прояву епізоотії на відносно невеликій території.

3.2.1.1. Аналіз випадків сказу на території Чернігівської області

З використанням звітності Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи проведено визначення географічних координат кожного випадку сказу, який був лабораторно підтверджений методом флуоресціюючих антитіл або біологічною пробою в Чернігівській державній регіональній лабораторії ветеринарної медицини.

Була створена інформаційна база даних в форматі Microsoft Office Excel 2010 із 463-х записів про спалахи сказу на території Чернігівської області в

2011-2016 рр. Кожен випадок сказу був географічно прив'язаний до центроїду найближчого населеного пункту.

За цей період було зареєстровано випадки сказу у 17 (бобер, борсук, вовк, ВРХ, дикий кабан, ДРХ, єнотовидний собака, кінь, кіт, косуля, кріт, куниця, лисиця, миша, ондатра, рись, собака) видів тварин: 313 випадків сказу серед свійських тварин і 150 серед диких (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Кількість випадків сказу в 2011-2016 рр. в Чернігівській області

Вид тварини	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Всього
бобер		1		1			2
борсук						1	1
вовк		1			3	1	5
ВРХ	1	10	7	9	8	5	40
дикий кабан			1				1
ДРХ		3			1	3	7
єнотовидний собака	7	3	6	1	14	4	35
кінь	1	1	2				4
кіт	28	39	30	8	28	47	180
косуля					1		1
кріт		1					1
куниця	1	3					4
лисиця	16	16	17	8	15	24	96
миша					1		1
ондатра			1				1
рись	1					1	2
собака	12	13	19	5	8	25	82
Всього	67	91	83	32	79	111	463

Основна частина випадків приходилась на свійських м'ясоїдних тварин (котів і собак) – 262 випадки, або 56,6 %. Частка лисиць становила 20,7 % від загальної кількості випадків (відсоток лисиць в межах України за 2011-2016 рр. становив 35,7 %).

При здійсненні картографії усіх 463 випадків сказу встановлено їхнє скупчення в межах населених пунктів в Чернігівському, Куликівському, Борзнянському, Носівському і Бобровицькому районах (рис. 3.15). Найменше випадків сказу встановлено в північно-східних і південно-східних районах.

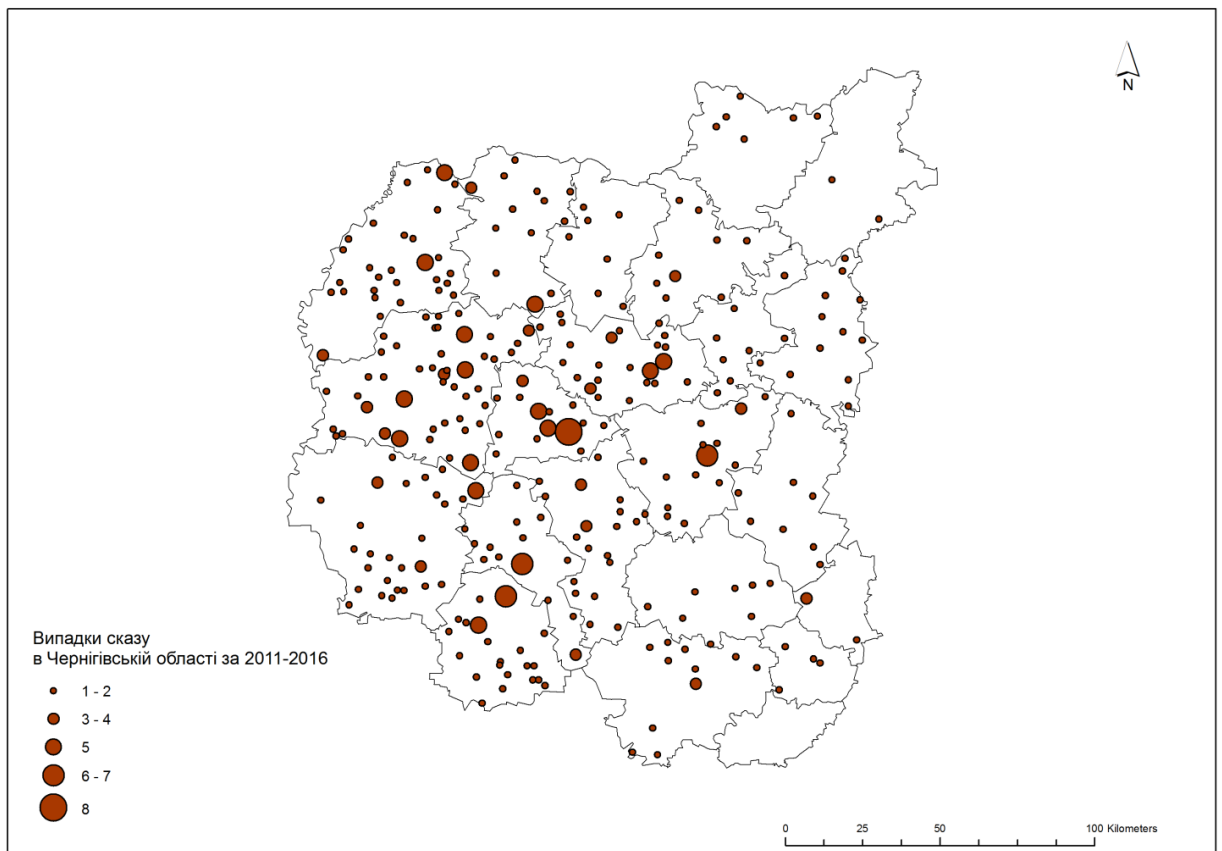


Рис. 3.15 Карта розповсюдження випадків сказу в Чернігівській області (2011-2016 рр.).

Висока напруженість епізоотичної ситуації можливо пов'язана із більшою густиною населення в цих районах і відповідно більшою концентрацією свійських тварин. Іншим фактором, який безумовно впливає на напруженість епізоотії, є об'єми проведення заходів специфічної профілактики сказу. Однак

відмінностей у здійсненні цих заходів як профілактичних, так і вимушених у неблагополучних пунктах в різних районах області не виявлено.

Для того, щоб описати зміни просторового тренду розповсюдження випадків сказу в Чернігівській області по роках з 2011 по 2016 ми побудували еліпси стандартних відхилень для кожного року (рис. 3.16). Еліпс стандартного відхилення узагальнює просторові характеристики географічних об'єктів: середній центр випадків сказу, дисперсію, просторові тренди.

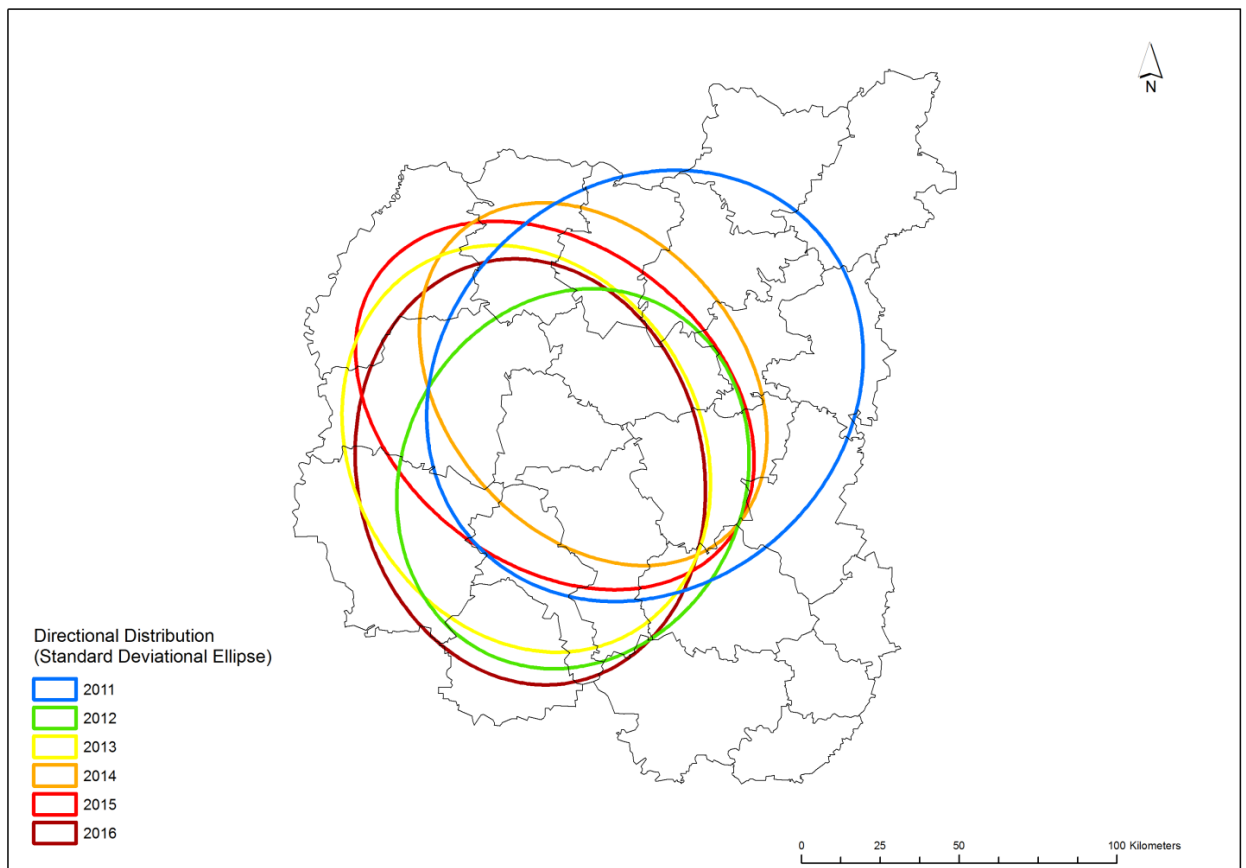


Рис. 3.16 Еліпси стандартних відхилень (розміром в 1 стандартне відхилення) випадків сказу, Чернігівська область, 2011-2016 рр.

Еліпси стандартних відхилень показали, що в 2011-2012 рр. просторові тренди випадків сказу лежали на осі південний захід – північний схід.

Центральна тенденція випадків сказу в 2011 році розміщувалася помітно східніше і північніше ніж в наступні роки. Еліпси 2011-2016 рр. знаходилися на осі південний схід – північний захід, переважно в центральних і західних районах області. В 2016 році еліпс стандартного відхилення випадків сказу

розміщений південніше ніж в попередні роки і найбільше наближений до осі південь-північ. Таким чином, якщо в 2011 році спалахи сказу спостерігались переважно в північно-східних і центральних районах області, то в наступні роки розподіл спалахів змістився західніше і південніше.

Встановлено також відмінності в тенденції центральних еліпсів для випадків сказу серед свійських і диких тварин (рис. 3.17).

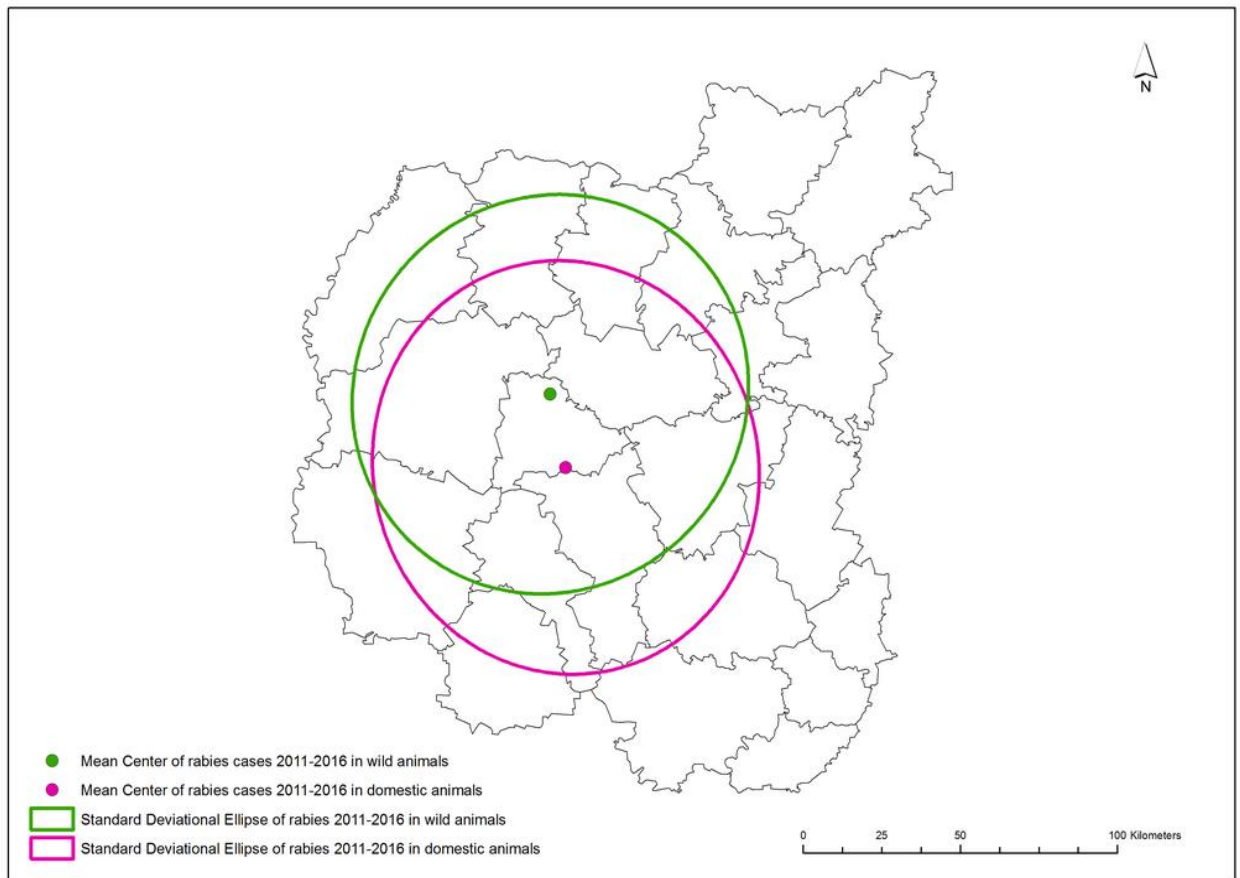


Рис. 3.17 Еліпси стандартних відхилень (розміром в 1 стандартне відхилення) випадків сказу за 2011-2016рр. для диких і свійських тварин.

Як видно з рисунку 3.17, центральна тенденція еліпсу за 2011-2016 рр. для диких тварин знаходилася на 23 км далі на північний захід ніж для свійських.

Для того щоб виділити території з більшою концентрацією випадків сказу (хотспоти – hot spots) ми використали метод ядерної оцінки щільності (Kernel density estimation – KDE), завдяки якому перетворені точкові дані в непереривну поверхню, яка відображає щільність випадків. Ця методика

входить в набір інструментів Spatial Analyst для ESRI ArcMap 10.3, в якому вона реалізована з використанням квадратичної функції ядра відповідно формулі Silverman (1986). На силу згладжування результативної поверхні впливала величина радіуса сусідства h , яку обраховували за формулою Fotheringham (2000).

Для визначення статистичної достовірності кластеризації випадків сказу спочатку проведений тест ANNI. Результат цього тесту показав наявну статистично значиму кластеризацію випадків сказу на території Чернігівської області в 2011-2016 рр. Цей самий тест для центроїдів населених пунктів області показав статистично значиме розсіювання і середню відстань між сусідніми населеними пунктами приблизно 3 км.

На рис. 3.18 представлений KDE-аналіз випадків сказу серед тварин на території Чернігівської області за 2011-2016 рр. Кластери спалахів сказу визначені методом KDE при трьох порогах значень щільності – 5, 10 і 25 %.

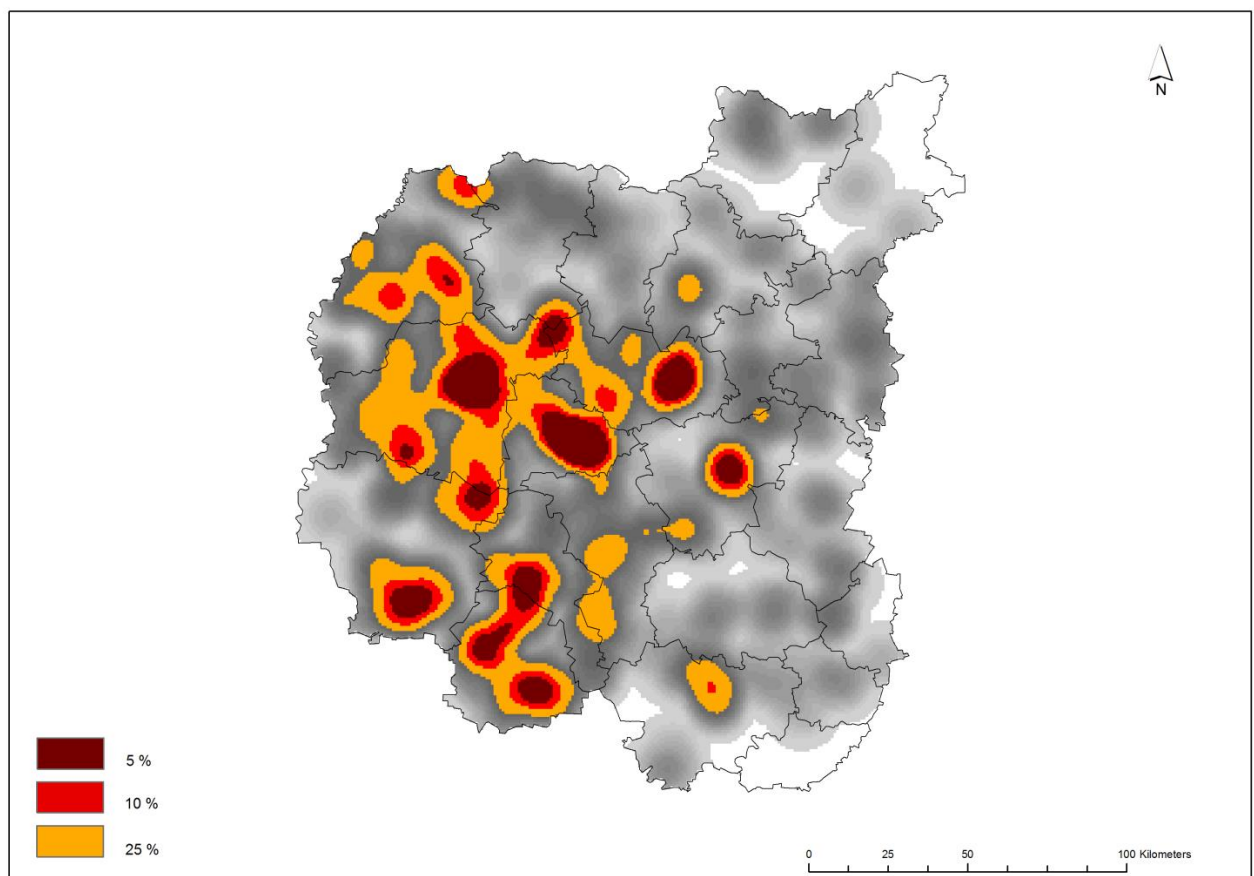


Рис. 3.18 KDE-аналіз випадків сказу в Чернігівській області в 2011-2016 рр.

Як видно з рисунку 3.18, просторові кластери випадків сказу розміщені переважно в центральних, західних і південно-західних районах області.

Аналіз випадків сказу відповідно географічних координат (карта поширення сказу – рис. 3.15; карта еліпсів стандартних відхилень – рис. 3.17 і KDE-аналіз випадків сказу – рис. 3.18) дав нам підґрунтя для напрацювання основної теорії поширення сказу на території Чернігівської області. Такою теорією нерівномірності епізоотії сказу в Чернігівській області, є опосередкований позитивний вплив на епізоотичну ситуацію зі сказу кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних, що постійно проводилися на території суміжних Сумської і Полтавської областей протягом 2006-2015 рр.

Для підтвердження цієї теорії проведений KDE-аналіз випадків сказу окремо серед свійських і диких тварин (рис. 3.19, 3.20).

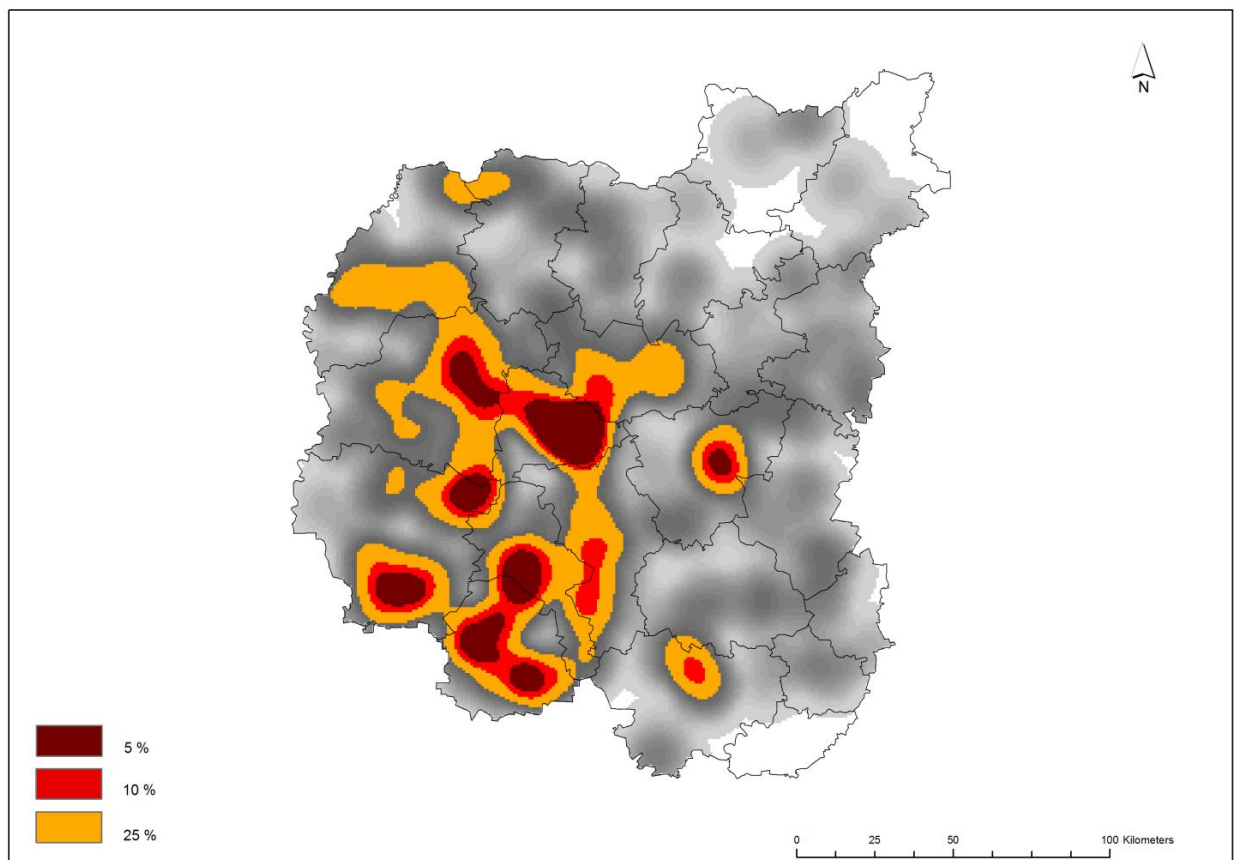


Рис. 3.19 KDE-аналіз випадків сказу серед свійських тварин на території Чернігівської області в 2011-2016 рр.

Аналіз показав, що більша щільність сказу серед популяцій свійських і сільськогосподарських тварин спостерігалася в центральних, західних і південно-західних районах області (рис. 3.19). Однак, основні кластери випадків серед диких тварин знаходилися в північно-західних районах (рис. 3.20).

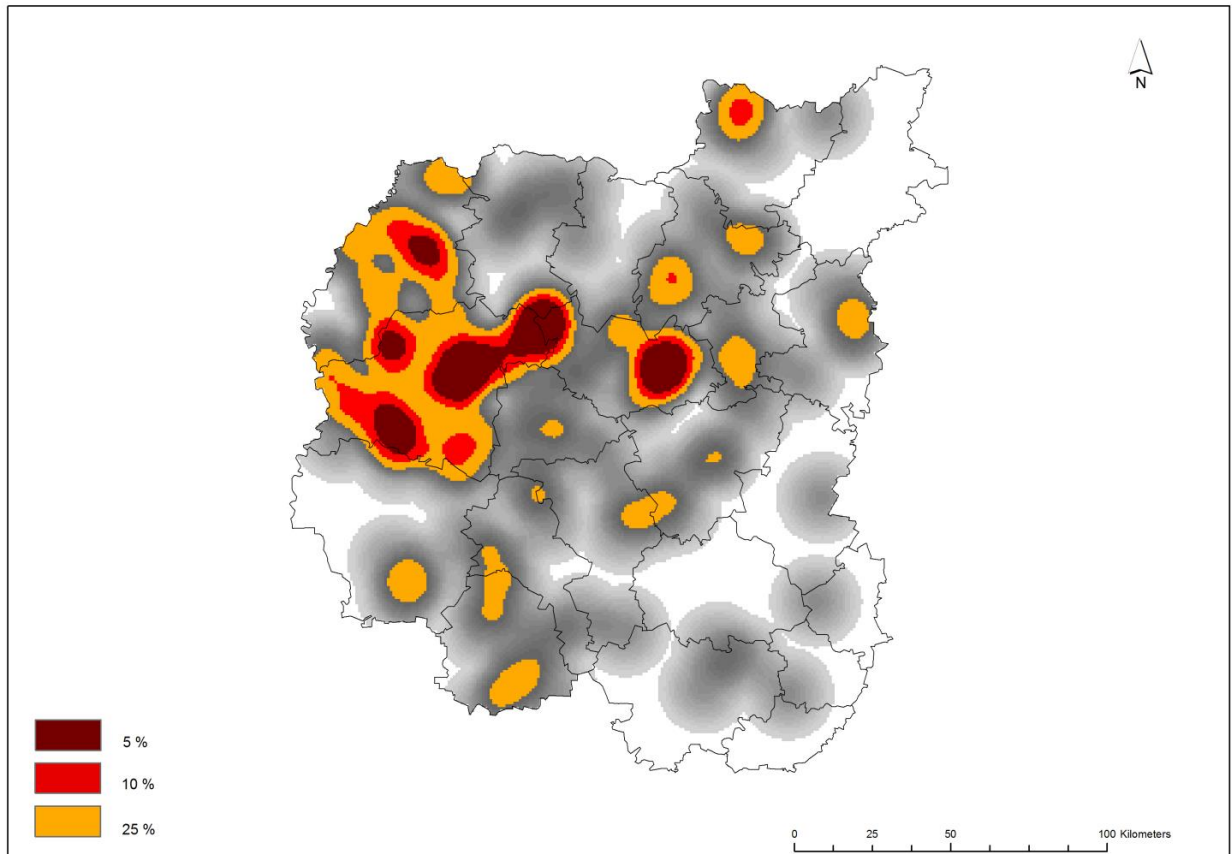


Рис. 3.20 KDE-аналіз випадків сказу серед диких тварин на території Чернігівської області в 2011-2016 рр.

Враховуючи отримані результати, є підстави стверджувати, що KDE-аналіз випадків сказу окремо серед популяцій свійських і диких тварин також підтвердив теорію нерівномірності поширення сказу на території Чернігівської області в 2011-2016 рр., що можливо пов'язане із впливом пероральної імунізації диких м'ясоїдних в суміжних Сумській і Полтавській областях, що постійно проводилася протягом 2006-2015 рр.

3.2.1.2. Виявлення стаціонарно-неблагополучних зон і нових зон поширення сказу шляхом проведення Emerging Hotspot Analysis

Для визначення просторово-часових тенденцій випадків сказу на території Чернігівської області за 2011-2016 рр. здійснено аналіз за допомогою інструменту Create Space Time Cube для ESRI ArcMap 10.3, яким дає можливість виявити нові кластери, ріст чи зменшення захворювання в певних зонах, спорадичні гарячі і холодні зони.

Цей інструмент заснований на статистиці Getis-Ord G^* , яка дає змогу виявити статистично значимі кластери високих значень (гарячі точки), і статистиці Mann-Kendall, з використанням якої визначають часові тенденції в кожному місці. Такий аналіз вимагає об'єднання координат точок в клітини, які мають конкретний просторовий і тимчасовий розмір, що складається в просторово-часовий куб у дослідній області. В наших дослідженнях обрано як просторовий розмір клітини відстань в 14 км, що є середньою загрозовою відстанню поширення сказу. Ця відстань була обрахована шляхом суми добутоків максимальних відстаней поширення сказу для кожного виду тварин і відсотку в структурі захворюваності на сказ в Чернігівській області в 2002-2016 рр., що представлена в розділі 3.2.1.1.

У якості часового розміру для аналізу обрано період в 2 місяці, який є узагальненим середнім інкубаційним періодом при сказі тварин. Крім того, 2 місяці – це термін з дня останнього випадку захворювання тварин на сказ, після якого можна проводити зняття карантинних обмежень в неблагополучних зі сказу пунктах. Він закріплений законодавчо в чинній Інструкції «Про заходи щодо боротьби зі сказом тварин» (1994 р.).

Враховуючи характеристику інструменту Create Space Time Cube для ESRI ArcMap 10.3 околиці відстані, на якій виявляли просторову автокореляцію випадків сказу становила 47 км.

При здійсненні Emerging Hotspot Analysis випадків сказу на території Чернігівської області за 2011-2016 рр. виявлено 18 просторово часових кластерів із трендом «спорадичний» (місце, в якому з'являється і зникає гаряча

точка (hotspot); місце, в якому менше 90 % всіх часових інтервалів були статистично значимі hotspots і ні один з інтервалів не був статистично значимою холодною точкою – coldspot) в центральних і південно-західних районах області: Куликівському, Бобровицькому, Ічнянському; частково в Носівському, Ніжинському і Козелецькому і на півдні Прилуцького (рис. 3.21).

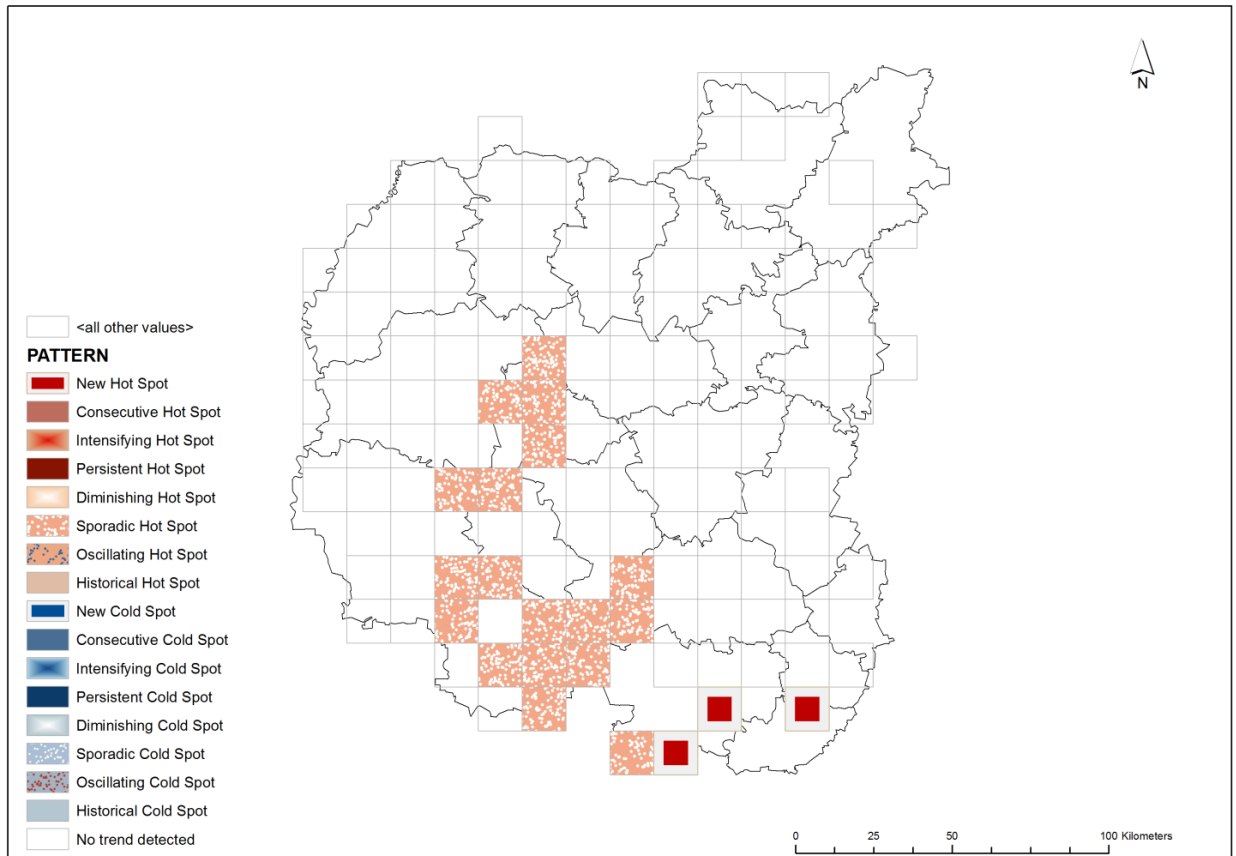


Рис. 3.21 Emerging Hotspot Analysis випадків сказу серед тварин на території Чернігівської області в 2011-2016 рр.

Виявлення цих 18 кластерів має особливе практичне значення. Адже територія цих кластерів і є математично достовірно доведеними стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу в Чернігівській області. Просторово-часове підтвердження постійної реєстрації випадків сказу на цих територіях є науковим обґрунтуванням зміни системи профілактичних і вимушених заходів проти сказу та повинно стати основою для активізації боротьби з безпритульними тваринами, регулювання чисельності видів-резервуарів сказу (в першу чергу лисиць), збільшення об'ємів специфічної профілактики сказу

через парентеральну імунізацію свійських тварин та інших заходів, які направлені на ерадикацію сказу.

Крім встановлення географічних стаціонарно-неблагополучних зі сказу зон на території Чернігівської області, Emerging Hotspot Analysis виявив 3 кластери із трендом «новий» (розташування, що є статистично значимою гарячою точкою в останньому часовому кроці і ніколи не було статистично значимою гарячою точкою раніше), які розміщені на крайньому південному сході області по периметру Варвинського району, де за дослідний період не зафіксовано жодного випадку сказу.

Виявлення цих кластерів може бути пов'язане із припиненням в останні роки кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу на території суміжних Полтавської і Сумської областей у зв'язку з складною економічною ситуацією в Україні. Тому, це є ще одним підтвердженням теорії щодо наявності опосередкованого пресингу на епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області пероральної імунізації диких м'ясоїдних, яка проводилася на території Полтавської і Сумської областей протягом 2006-2015 рр.

Однак, підтвердження пресингу кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу на епізоотичну ситуацію в суміжних зонах, де цей захід не проводився, вимагає здійснення додаткового географічного аналізу випадків сказу із розширенням дослідної зони і за більш ранні періоди – до початку проведення цього заходу.

3.2.2. Просторово-часова характеристика прояву сказу на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр.

Кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин з використанням вакцини BROVARABIS V-RG (ТОВ «Укрветпромпостач», Україна) були реалізовані в західних областях України, що межують з Польщею та Угорщиною (тобто у Львівській, Волинській та Закарпатській областях). Метою цих кампаній був захист вільної від сказу території Польщі та Угорщини, враховуючи транскордонний характер сказу, шляхом створення буферної зони вздовж адміністративного кордону з Україною в рамках міждержавної угоди. Вакцину розповсюджували з використанням повітряного транспорту з концентрацією 25 приманок/км². З 2012 по 2016 роки проводилися кампанії з дедалі більшими цільовими територіями (з приблизно 26 000 км² у 2012 році до понад 48 000 км² у 2016 році). Електронний метроном, підключений до глобальної системи позиціонування (GPS Control Distribution Unit gen.4, GPS CDU-4), регулював частоту скидання вакцини з урахуванням швидкості літака, забезпечуючи високу ймовірність рівномірного покриття приманкою.

У цих дослідженнях ми вивчали ефективність кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу на території Львівської, Волинської та Закарпатської областей (2012–2016 рр.) з використанням інструментів просторового та просторово-часового аналізу випадків сказу.

3.2.2.1. Характеристика дослідного регіону та формування бази даних випадків сказу

Характеристика регіону.

Це дослідження спрямоване на три західні області України, а саме на Волинську, Львівську та Закарпатську. Ці області межують з півночі на південь з Білоруссю, Польщею, Словаччиною, Угорщиною та Румунією і складають

близько 9 % всієї території України. Цей регіон малозаселений, переважно гористий і вкритий лісами. Область дослідження описана на рис. 3.22.

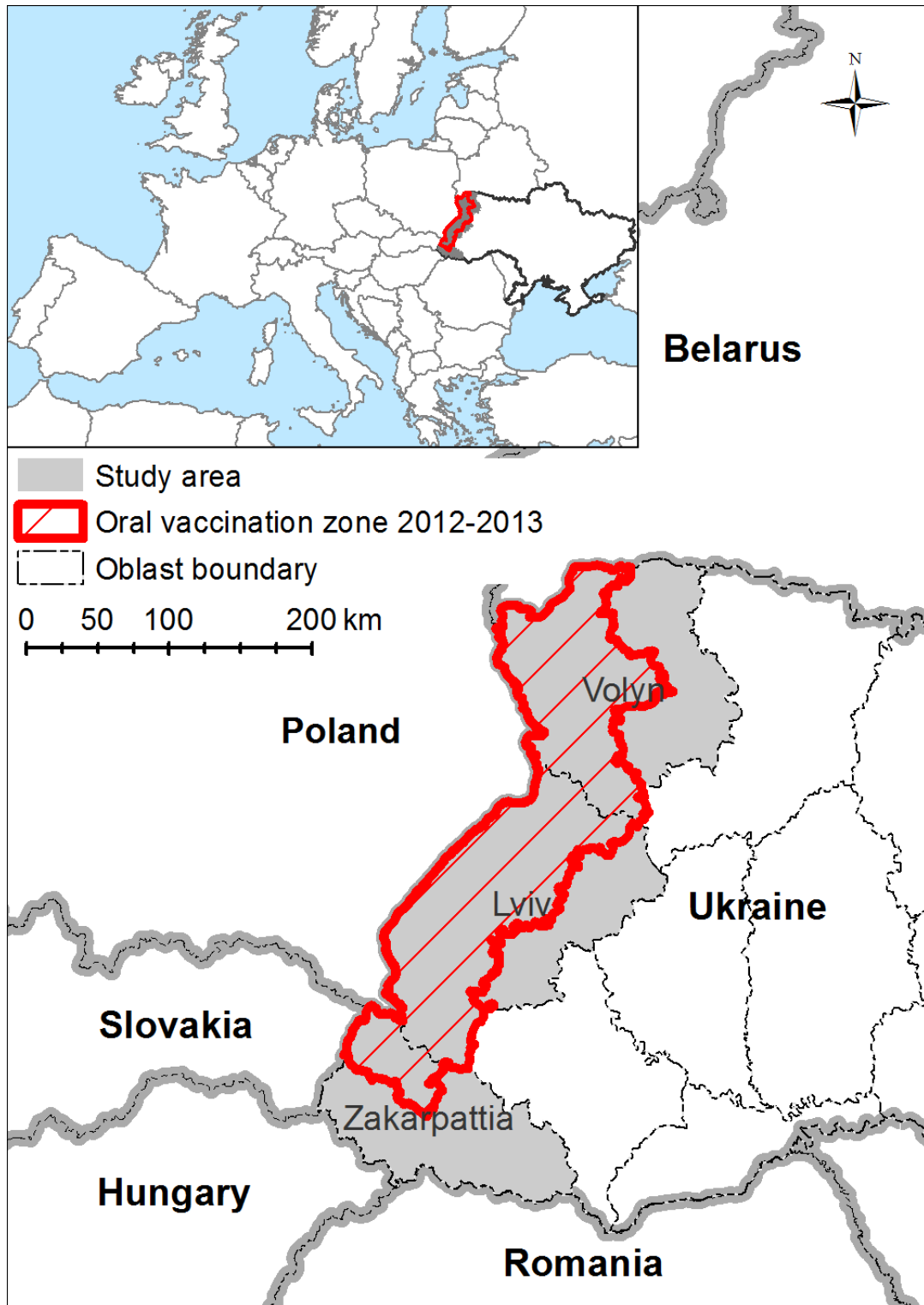


Рис. 3.22 Карта району дослідження – Волинська, Львівська та Закарпатська області України. Територія дослідження відзначена сірою заливкою. Червона заштрихована ділянка – це територія, на якій проводилася пероральна вакцинація диких м'ясоїдних тварин проти сказу у 2012-2013 рр.

Волинська область займає 20 200 км² (3,3 % території України) і характеризується двома чітко виділеними типами ландшафтів: (а) північна частина з великими лісами, болотами та численними озерами та (б) південна частина, що охоплює долини та гірські рельєфи з невеликими лісами. Площа лісів Волинської області становить 6980 км². Львівська область займає 21800 км² (3,6 % території України), з них 6950 км² ліси. Південну частину Львівської області займають Карпати. Закарпатська область займає 12800 км² (2,1 % території України), з них близько 80 % займають гори і 50 % ліси (6570 км²).

Формування бази даних випадків сказу в дослідному регіоні.

Державними регіональними лабораторіями ветеринарної медицини України за 2012-2016 роки зібрані дані щодо захворювання на сказ диких і свійських тварин у Волинській, Львівській та Закарпатській областях. Зразки тканин мозку тварин перевіряли на наявність вірусу сказу за допомогою реакції прямої імунофлуоресценції з використанням тест-наборів вітчизняного виробництва. Під час цього дослідження лабораторії отримали загалом 10560 проб головного мозку від тварин, у 427 зразках було підтверджено вірус сказу (табл. 3.5).

Всього з 2012 по 2016 рік підтверджено 427 випадків сказу серед свійських і диких тварин. З них 226 (52,93 %) випадків виявлено у лисиць. Сказ інших диких тварин виявлено у 21 випадку (4,92 %). Серед свійських м'ясоїдних тварин (котів і собак) підтверджено 169 випадків сказу (39,58 %). Ця група тварин є другою за чисельністю в досліджених областях. В інших свійських тварин виявлено 11 випадків (2,57 %).

Таблиця 3.5

**Випадки сказу серед різних видів тварин у Львівській, Волинській та
Закарпатській областях в 2012-2016 рр.**

Вид	Львівська					Волинська					Закарпатська					Всього
	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016	2012	2013	2014	2015	2016	
1). Лисиці	27	18	10	17	14	22	40	21	23	24	4	2	1	3		226
2). Свійські м'ясоїдні	6	5	5	8	14	12	15	10	22	35	9	10	3	6	9	169
• Коти	2	2		4	9	8	9	6	14	22	3	4	3	3	2	91
• Собаки	4	3	5	4	5	4	6	4	8	13	6	6		3	7	78
3). Інші дикі тварини	1	3	1			4	3	3	5	1						21
• Кажани							1									1
• Косулі	1															1
• Куниці		3				2		1	1							7
• Ласки			1				1		1							3
• Щури						1										1
• Єнотовидні собаки						1	1	2	2							6
• Вовки									1	1						2
4). Інші свійські тварини		1						1	2	3	1	2			1	11
• Корови		1							1	2	1	1			1	7
• Вівці									1							1
• Мурчаки								1								1
• Коні										1		1				2
Всього			130					246					51			427

Найбільшу частину (94,74 %) даних про лисиць зібрано шляхом активного моніторингу, тобто за впольованими мисливцями лисицями. Зразки інших видів були отримані шляхом пасивного нагляду за поширенням сказу, тобто

направлені до обласних (Волинської, Львівської та Закарпатської) лабораторій працівниками державної ветеринарної служби. Дані, які зібрані в нашу базу даних, включали: вид тварин, географічні координати центрюду населеного пункту (мисливського угіддя), з якого було отримано зразок, і дату прийняття зразка випробувальною лабораторією. Якщо дані GPS були недоступні, центрюд найближчого села розраховувався з використанням вихідних даних вибірки.

3.2.2.2. Описовий статистичний аналіз сказу

Першочергово було досліджено сезонність прояву сказу у Львівській, Волинській та Закарпатській областях в 2012-2016 рр. Епідемічна крива сказу серед лисиць демонструвала послідовне зростання захворюваності з жовтня по грудень кожного року (рис. 3.23).

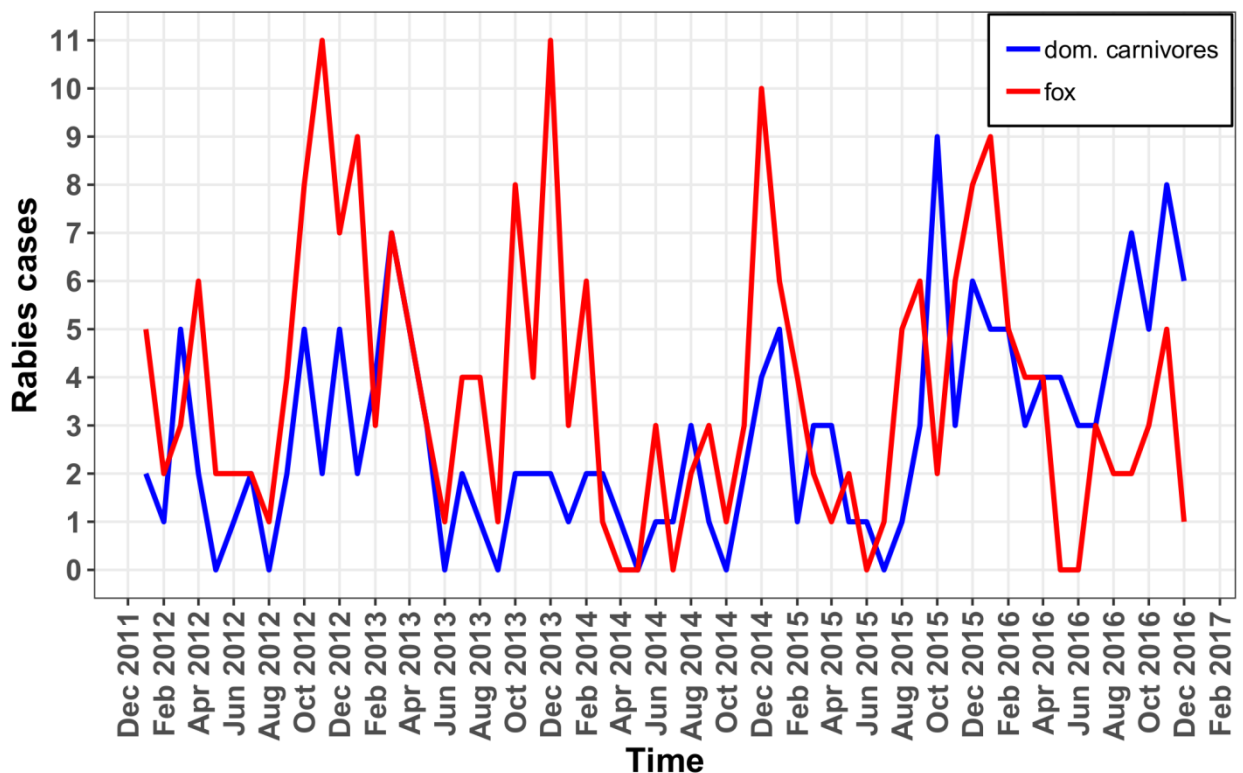


Рис. 3.23 Епідемічні криві сказу серед лисиць (червона лінія) та свійських м'ясоїдних (синя лінія) по місяцях.

Виражений прояв сезонності захворювання на сказ серед лисиць має дві складові. Перша причина – біологічні особливості виду *Vulpes Vulpes*, тобто осіння міграція молодих тварин, що є основою для інфікування вірусом сказу за рахунок численних контактів з іншими тваринами. Друга причина – суттєве збільшення надходження проб головного мозку лисиць до регіональних лабораторій Держпродспоживслужби на дослідження внаслідок процесу активного моніторингу (відстріл лисиць) та оцінки ефективності проведеної кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Якщо враховувати, що резервуар вірусу сказу в природі знаходиться саме в популяції лисиці звичайної, то епідемічні криві для лисиць та для свійських м'ясоїдних тварин (котів і собак) повинні співпадати.

Однак, епідемічна крива для свійських котів і собак, показана на рис. 3.23, демонструє менш регулярну картину порівняно з лисицями без очевидних відмінностей за роки спостереження ($\chi^2 = 8,9906$, $df = 4$, $p = 0,06134$).

Саме тому, на нашу думку, активний відстріл лисиць після кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу і дослідження зразків головного мозку на наявність вірусу сказу є одним з факторів впливу на показник сезонності захворювання серед лисиць.

Для порівняння прояву сказу у Львівській, Волинській та Закарпатській областях в 2012-2016 рр. проведено поділ випадків сказу на основні групи: лисиці, інші дикі тварин, свійські тварин (собаки і коти) та інші свійські тварини. Результати представлено в табл. 3.6.

Відсоток позитивних випадків серед лисиць відрізнявся за роки спостереження ($\chi^2 = 23,637$, $df = 4$, $p < 0,05$). Найменший відсоток виявлення сказу у лисиць спостерігався у 2014 році, а найвищий – у 2012 році. З 2012 по 2014 рік спостерігається зниження відсотка виявлення сказу серед лисиць (2012 – 4,34 %, 2013 – 2,41 %, 2014 – 1,58 %). Після цього відбулося зростання в наступні 2 роки (2015 – 2,59 %, 2016 – 2,68 %).

Таблиця 3.6

**Кількість випадків сказу серед різних груп тварин у Львівській,
Волинській та Закарпатській областях в 2012-2016 рр.**

Вид	Рік	Позитивно	Всього проб	% позитивних	Нижче 95 % ВСІ*	Вище 95 % ВСІ*
Лисиці	2012	53	1220	4.34	3.27	5.64
	2013	60	2493	2.41	1.84	3.09
	2014	32	2024	1.58	1.08	2.22
	2015	43	1661	2.59	1.88	3.47
	2016	38	1418	2.68	1.90	3.66
Свійські м'ясоїдні тварини (собаки і коти)	2012	27	287	9.41	6.29	13.39
	2013	30	267	11.24	7.71	15.65
	2014	18	226	7.96	4.79	12.30
	2015	36	289	12.46	8.88	16.83
	2016	58	385	15.06	11.64	19.04
Інші свійські тварини	2012	1	12	8.33	0.21	38.48
	2013	3	8	37.50	8.52	75.51
	2014	1	7	14.29	0.36	57.87
	2015	2	12	16.67	2.09	48.41
	2016	4	18	22.22	6.41	47.64
Інші дикі тварини	2012	5	43	11.63	3.89	25.08
	2013	6	65	9.23	3.46	19.02
	2014	4	39	10.26	2.87	24.22
	2015	5	43	11.63	3.89	25.08
	2016	1	43	2.33	0.06	12.29

Примітка: ВСІ (95% Exact binomial confidence interval) – 95 % точний біноміальний довірчий інтервал.

Окремо проведено аналіз для випадків сказу в кожній області окремо з поділом випадків на основні групи: лисиці, інші дикі тварин, свійські тварин (собаки і коти) та інші свійські тварини (табл. 3.7-3.9).

Таблиця 3.7

Кількість випадків сказу серед різних груп тварин у Волинській області в 2012-2016 рр.

Вид	Рік	Позитивно	Всього проб	% позитивних	Нижче 95 % ВСІ*	Вище 95 % ВСІ*
Лисиці	2012	22	280	7.86	4.99	11.65
	2013	40	892	4.48	3.22	6.06
	2014	21	685	3.07	1.91	4.65
	2015	23	444	5.18	3.31	7.67
	2016	24	464	5.17	3.34	7.60
Свійські м'ясоїдні тварини (собаки і коти)	2012	12	101	11.88	6.29	19.83
	2013	15	92	16.30	9.42	25.46
	2014	10	65	15.38	7.63	26.48
	2015	22	94	23.40	15.29	33.26
	2016	35	180	19.44	13.93	25.99
Інші свійські тварини	2012	0	3	0.00	0.00	70.76
	2013	0	2	0.00	0.00	84.19
	2014	1	4	25.00	0.63	80.59
	2015	2	6	33.33	4.33	77.72
	2016	3	11	27.27	6.02	60.97
Інші дикі тварини	2012	4	11	36.36	10.93	69.21
	2013	3	15	20.00	4.33	48.09
	2014	3	9	33.33	7.49	70.07
	2015	5	17	29.41	10.31	55.96
	2016	1	16	6,25	0.16	30.23

Примітка: ВСІ (95% Exact binomial confidence interval) – 95 % точний біноміальний довірчий інтервал.

Таблиця 3.8

Кількість випадків сказу серед різних груп тварин у Львівській області в 2012-2016 рр.

Вид	Рік	Позитивно	Всього проб	% позитивних	Нижче 95 % ВСІ*	Вище 95 % ВСІ*
Лисиці	2012	27	840	3.21	2.13	4.64
	2013	18	1426	1.26	0.75	1.99
	2014	10	1167	0.86	0.41	1.57
	2015	17	1090	1.56	0.91	2.49
	2016	14	842	1.66	0.91	2.77
Свійські м'ясоїдні тварини (собаки і коти)	2012	6	153	3.92	1.45	8.34
	2013	5	138	3.62	1.19	8.25
	2014	5	139	3.60	1.18	8.19
	2015	8	167	4.79	2.09	9.22
	2016	14	183	7.65	4.25	12.50
Інші свійські тварини	2012	0	8	0.00	0.00	36.94
	2013	1	3	33.33	0.84	90.57
	2014	0	3	0.00	0.00	70.76
	2015	0	6	0.00	0.00	45.93
	2016	0	4	0.00	0.00	60.24
Інші дикі тварини	2012	1	25	4.00	0.10	20.35
	2013	3	44	6.82	1.43	18.66
	2014	1	29	3.45	0.09	17.76
	2015	0	24	0.00	0.00	14.25
	2016	0	22	0.00	0.00	15.44

Примітка: ВСІ (95% Exact binomial confidence interval) – 95 % точний біноміальний довірчий інтервал.

Таблиця 3.9

Кількість випадків сказу серед різних груп тварин у Закарпатській області в 2012-2016 рр.

Вид	Рік	Позитивно	Всього проб	% позитивних	Нижче 95 % ВСІ*	Вище 95 % ВСІ*
Лисиці	2012	4	100	4.00	1.10	9.93
	2013	2	175	1.14	0.14	4.07
	2014	1	172	0.58	0.01	3.20
	2015	3	127	2.36	0.49	6.75
	2016	0	112	0.00	0.00	3.24
Свійські м'ясоїдні тварини (собаки і коти)	2012	9	33	27.27	13.30	45.52
	2013	10	37	27.03	13.79	44.12
	2014	3	22	13.64	2.91	34.91
	2015	6	28	21.43	8.30	40.95
	2016	9	22	40.91	20.71	63.65
Інші свійські тварини	2012	1	1	100.00	2.5	100.00
	2013	2	3	66.67	9.43	99.16
	2014	0	0	-	-	-
	2015	0	0	-	-	-
	2016	1	3	33.33	0.84	90.57
Інші дикі тварини	2012	0	7	0.00	0.00	40.96
	2013	0	6	0.00	0.00	45.93
	2014	0	1	0.00	0.00	97.50
	2015	0	2	0.00	0.00	84.19
	2016	0	5	0.00	0.00	52.18

Примітка: ВСІ (95% Exact binomial confidence interval) – 95 % точний біноміальний довірчий інтервал.

Відсоток позитивних випадків сказу серед лисиць протягом багатьох років у Волинській області був значно вищий, ніж у Львівській та Закарпатській областях за підсумковим рейтингом Вілкоксона ($w=24$, $p<0,01$), тоді як різниця не є статистично значущою між Львівською та Закарпатською областями.

Найнижчий відсоток позитивних випадків сказу спостерігався у 2014 році (подібно до лисиць), а найвищий відсоток позитивних випадків – у 2016 році. Відсоток позитивних випадків у Волинській та Закарпатській областях значно вищий, ніж у Львівській області ($w = 25$, $p < 0,01$), тоді як відсоткова різниця не є статистично значущою між Волинською та Закарпатською областями.

3.2.2.3. Просторово-часовий аналіз прояву сказу

З 2012 по 2016 рік середній географічний центр випадків сказу серед лисиць змістився на північ на 52 км (рис. 3.24).

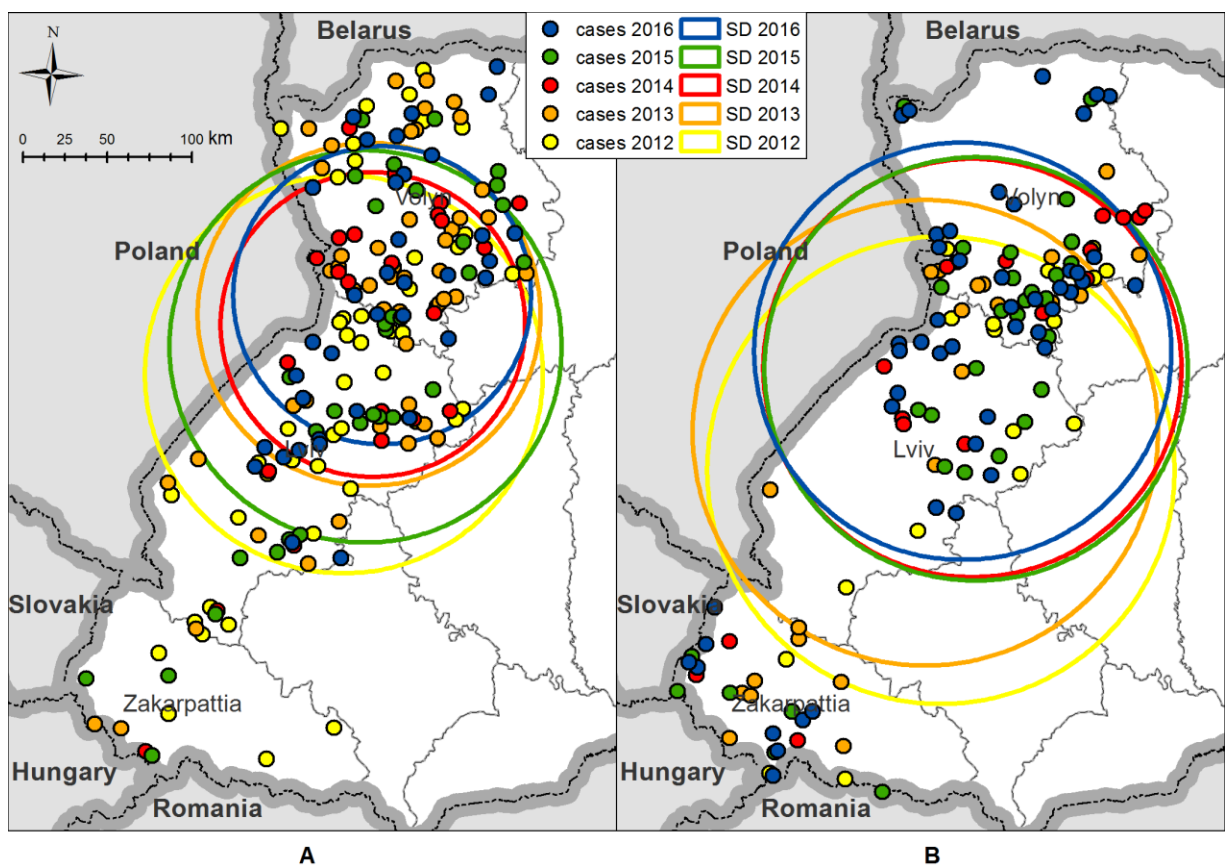


Рис. 3.24 Стандартні відстані захворюваності на сказ у Волинській, Львівській та Закарпатській областях. (А) у лисиць, (В) у свійських м'ясоїдних. Круги представляють собою одне стандартне відхилення дисперсії випадків сказу у лисиць або свійських м'ясоїдних тварин за відповідний рік. Центр кожного кола – це усереднені географічні координати всіх випадків сказу серед лисиць або свійських м'ясоїдних тварин.

Однак стандартна відстань, яка представляє ступінь їх розсіювання навколо середнього центру, зменшилася з 117,7 км у 2012 році до 90,1 км у 2014 році (рис. 3.25).

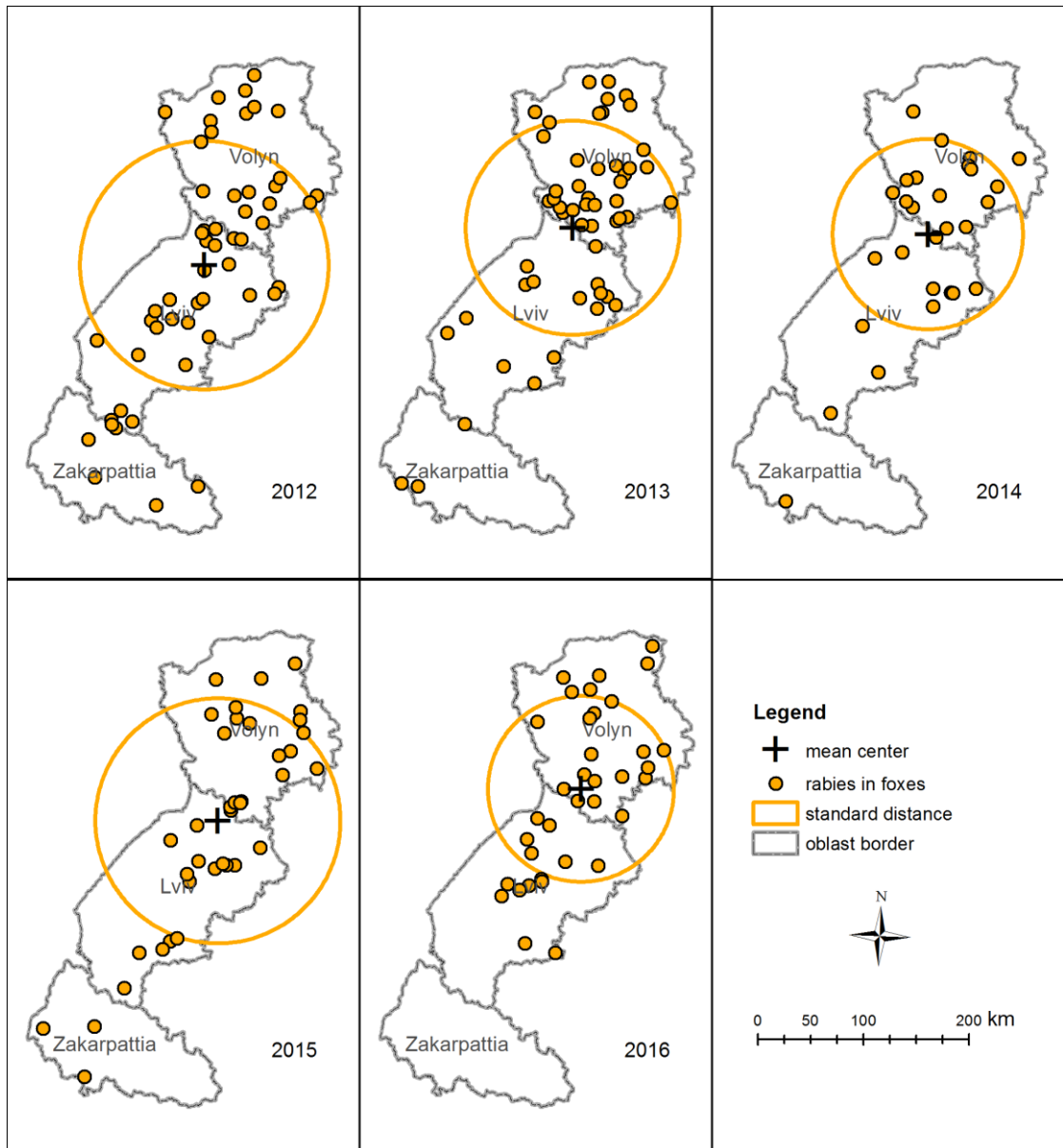


Рис 3.25 Просторовий розподіл випадків сказу серед лисиць за роками. Середній центр (чорний хрест) випадків сказу демонструє просторове усунення розподілу за роками 2012-2016. Кола стандартної відстані представляють зміни дисперсії випадків сказу серед лисиць по роках.

Послідовного зменшення розповсюдження (116 км) та зсуву на північ (21 км) у 2015 році не спостерігалось, оскільки зросли випадки сказу серед лисиць у Закарпатській та Львівській областях. У 2016 році найбільше випадків сказу

серед лисиць було зосереджено на півдні та в центрі Волинської та півночі Львівської областей.

Просторова картина для свійських собак і котів нагадує таку ж, як для лисиць, з прогресивним зміщенням середнього центру випадків сказу на північ і зменшенням ступеня їх розповсюдження з 2012 по 2016 рік. Випадки сказу серед собак менш концентруються навколо середнього центру, але більш широко поширені на територіях дослідних областей (рис. 3.26).

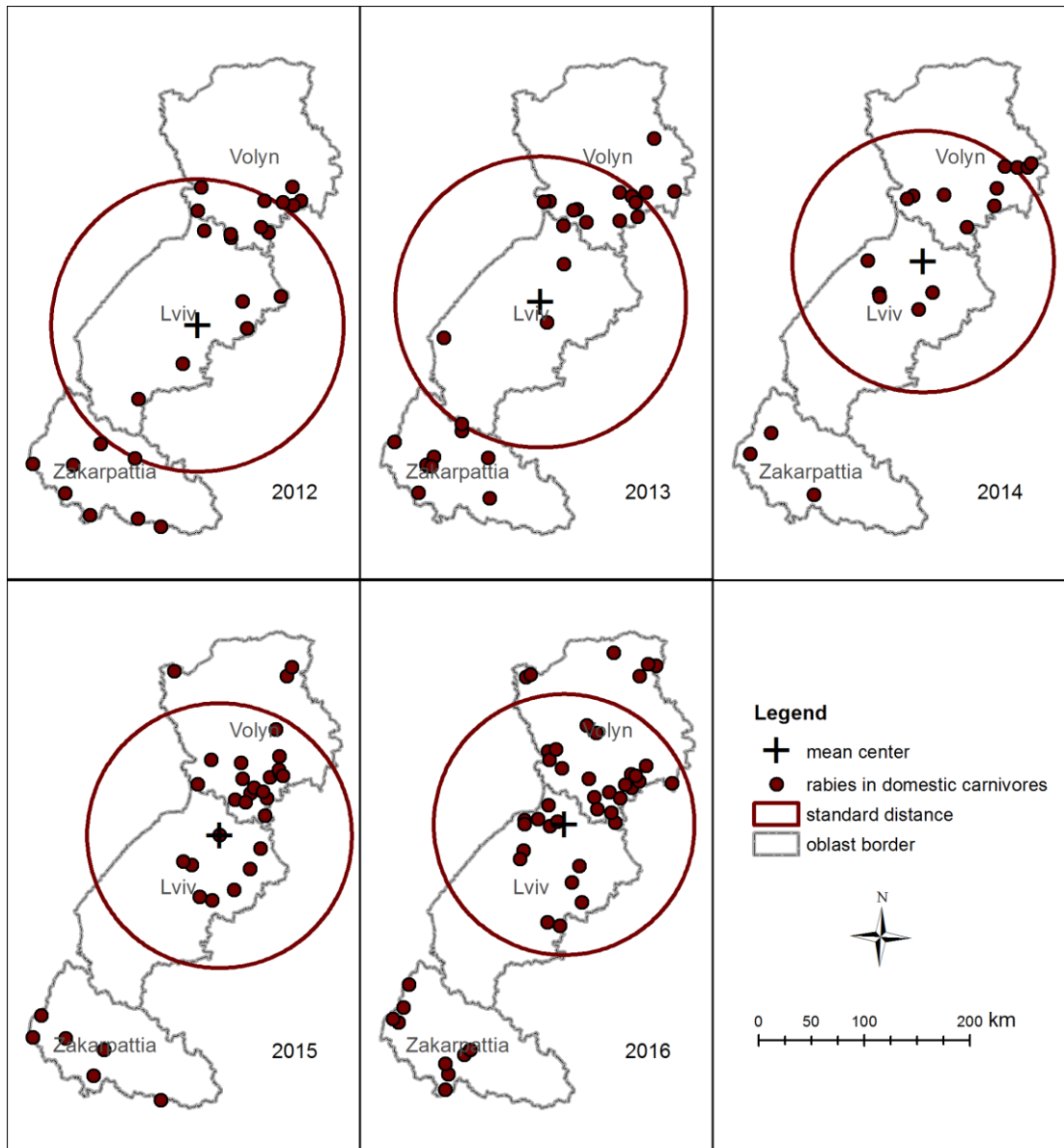


Рис. 3.26 Просторовий розподіл випадків сказу серед свійських м'ясоїдних тварин по роках. Середній центр (чорний хрест) випадків сказу демонструє просторовий зсув розподілу за 2012-2016 роки. Кола стандартної відстані відображають зміни дисперсії випадків сказу.

Помітно знизилася щільність захворюваності лисиць на сказ у Львівській та Закарпатській областях з 2014 року. У 2016 році по всій території Закарпатської області щільність була нульовою. Територія захворюваності на сказ лисиць протягом 2012–2016 > 0 років охоплює більшу частину Волинської та Львівської областей (рис. 3.27).

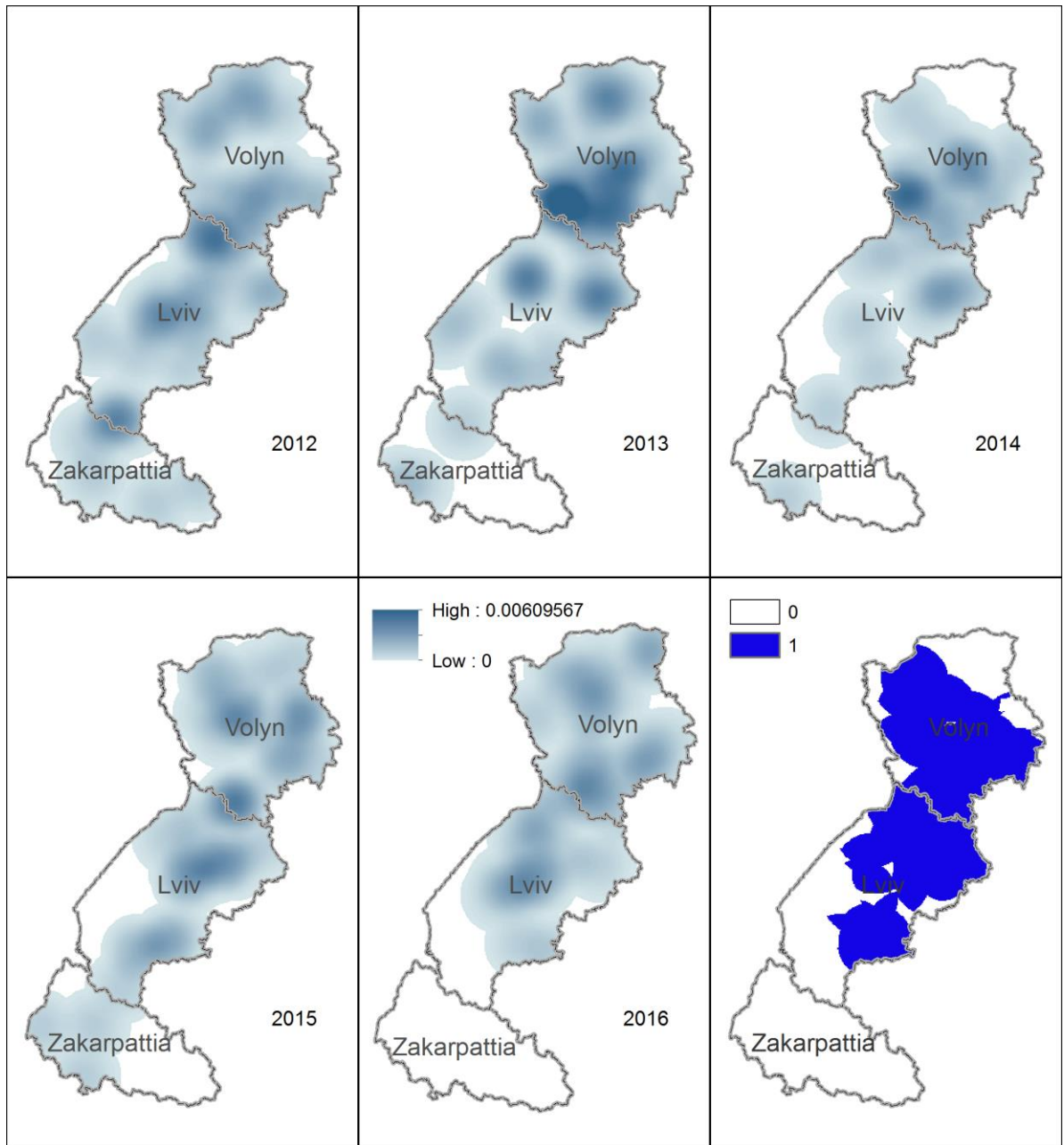


Рис. 3.27 Оцінка щільності ядра випадків сказу серед лисиць у Волинській, Львівській та Закарпатській областях. Щорічні карти представляють території з більш високою щільністю випадків сказу у лисиць за 2012-2016 роки. Суцільним синім кольором на нижньому правому малюнку відзначена територія, де щільність випадків постійно >0 протягом усіх років.

Найбільша щільність захворюваності на сказ собак і котів протягом 2012–2016 років – на межі Волинської та Львівської областей. Територія, де протягом 2012–2016 рр. щільність захворюваності на сказ собак і котів була >0 , поширюється від центру Волині до центру Львівської області та охоплює більшу частину території Закарпатської області (рис. 3.28).

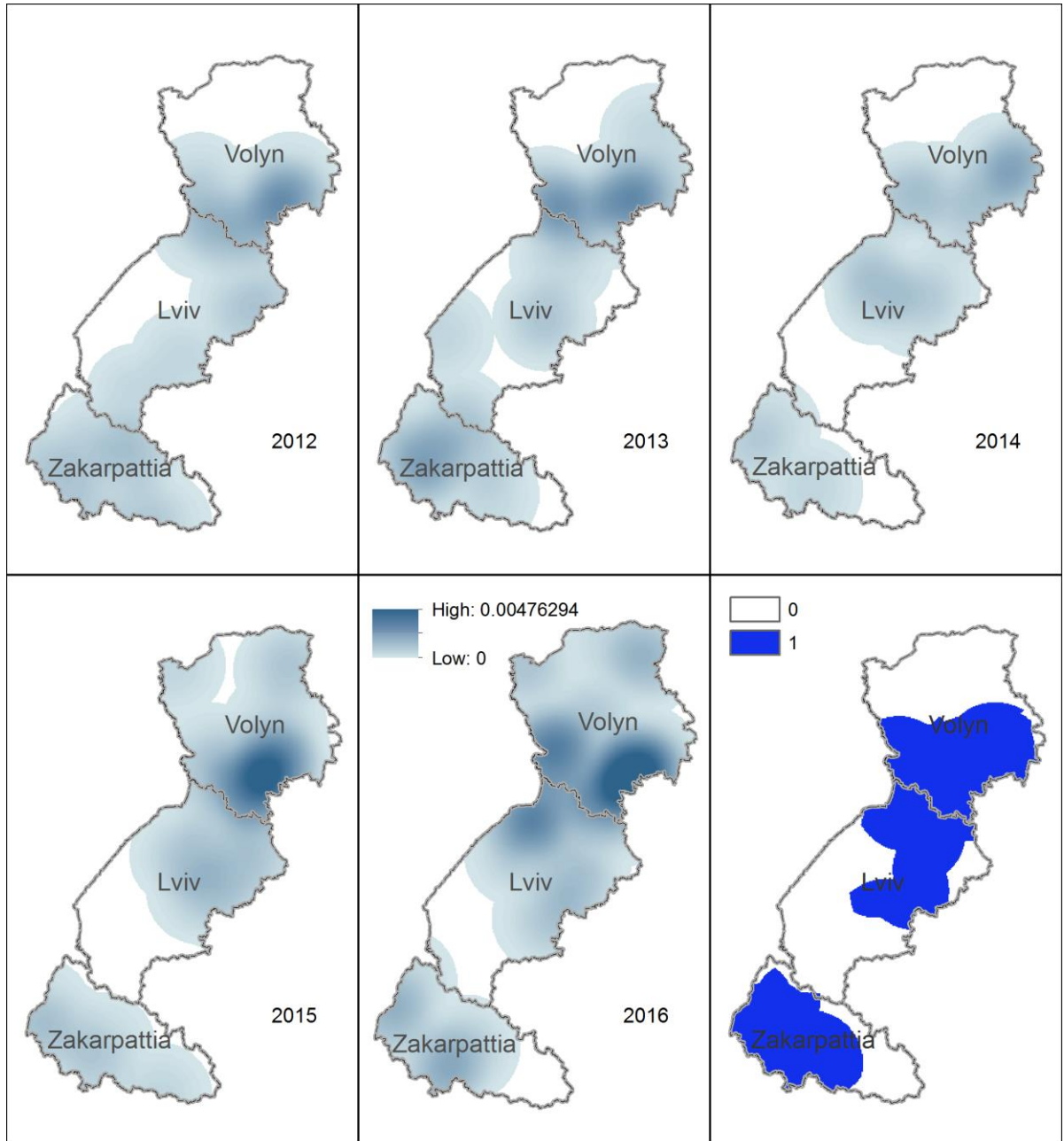


Рис. 3.28 Оцінка щільності ядра випадків сказу серед свійських м'ясоїдних у Волинській, Львівській та Закарпатській областях. Суцільним синім кольором на правому нижньому малюнку відзначено територію, де щільність випадків постійно >0 протягом усіх років.

Модель просторово-часової перестановки SatScan, виконана для всіх видів, виявила три статистично значущі кластери з $p < 0,05$ випадків сказу (рис. 3.29).

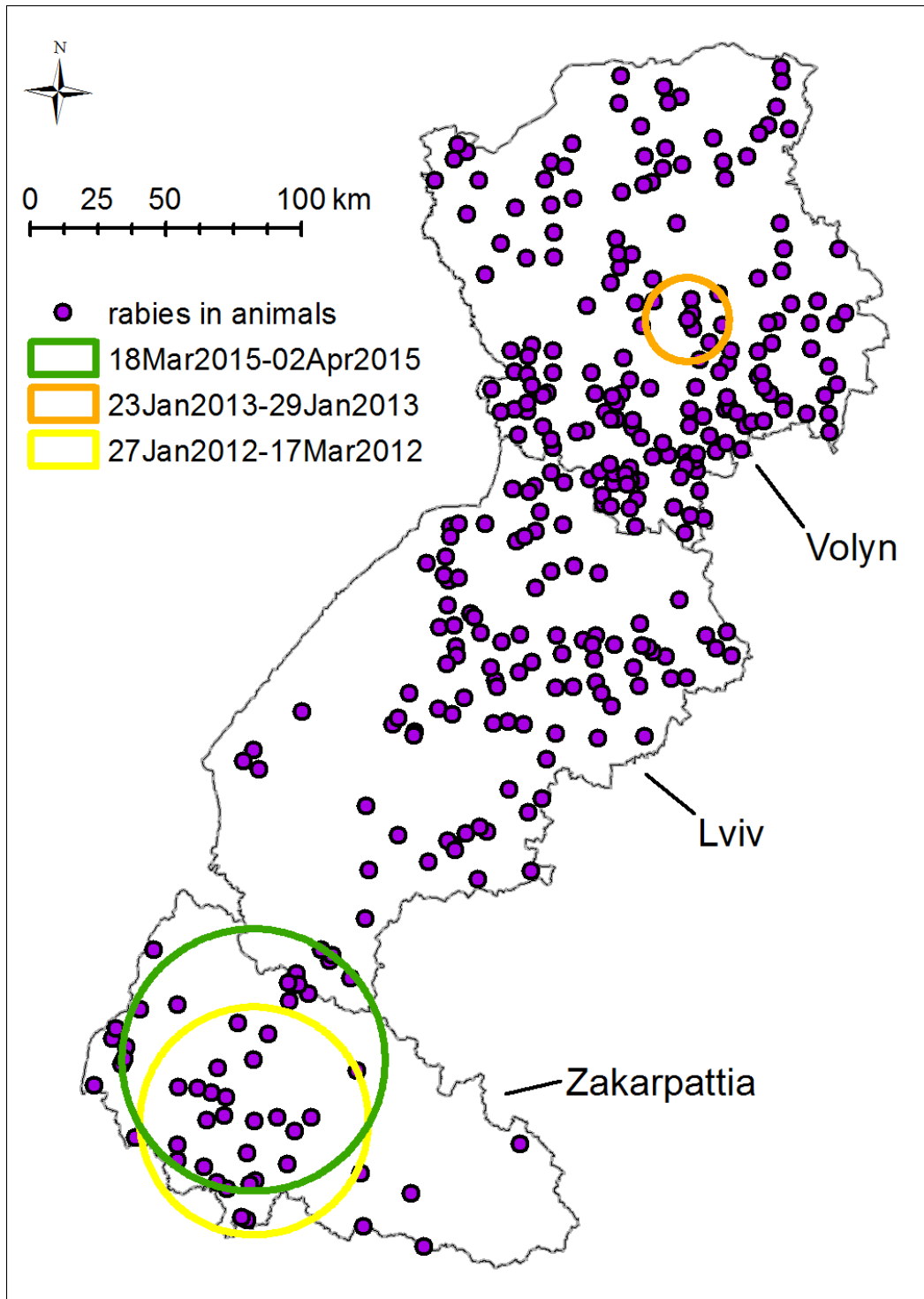


Рис. 3.29 Просторово-часова кластеризація випадків сказу серед тварин у Волинській, Львівській та Закарпатській областях з 2012 по 2016 р., виявлена з використанням моделі просторово-часової перестановки у SatScan.

Перший кластер – жовте коло ($p = 0,01$, з 27 січня 2012 р. по 17 березня 2012 р.) розташований на південь від Закарпатської області на кордоні з Угорщиною та Румунією радіусом 41,9 км. Цей кластер включає сім випадків сказу у тварин: два у лисиць, три у собак і два у котів.

Другий кластер – помаранчеве коло ($p = 0,022$, 23–29 січня 2013 р.) радіусом 15,4 км розташований у центрі Волинської області, на межі зони оральної вакцинації 2012–2013 рр. Цей кластер включає п'ять випадків сказу (чотири у лисиць, один у єнотоподібних собак).

Третій кластер – зелене коло ($p = 0,028$) знаходиться в Закарпатській області; його центр розташований на північ від центру першого кластера. Радіус кластера становить 48,2 км і охоплює період з 18 березня 2015 року по 02 квітня 2015 року. Включає п'ять випадків сказу (три у лисиць, два у котів).

Модель просторово-часової перестановки, виконана для випадків сказу серед лисиць, виявила три вірогідні кластери з $p < 0,05$ у 2013, 2014 та 2015 роках (рис. 3.30). Перший кластер ($p = 0,04$, 24 січня 2013) розташований поблизу центру Волинської області та має радіус 7,2 км. Він складається з трьох випадків і перетинається в просторі та часі для всіх видів.

Другий кластер ($p = 0,016$, 17 лютого – 19 червня 2014 р.) розташований у Львівській області радіусом 79,3 км і складається з п'яти випадків.

Третій кластер ($p = 0,005$, 18 березня – 12 травня 2015 р.) розташований у західній частині Закарпатської області радіусом 85,3 км. Він складається з чотирьох випадків і перетинається в просторі і часі за всі види.

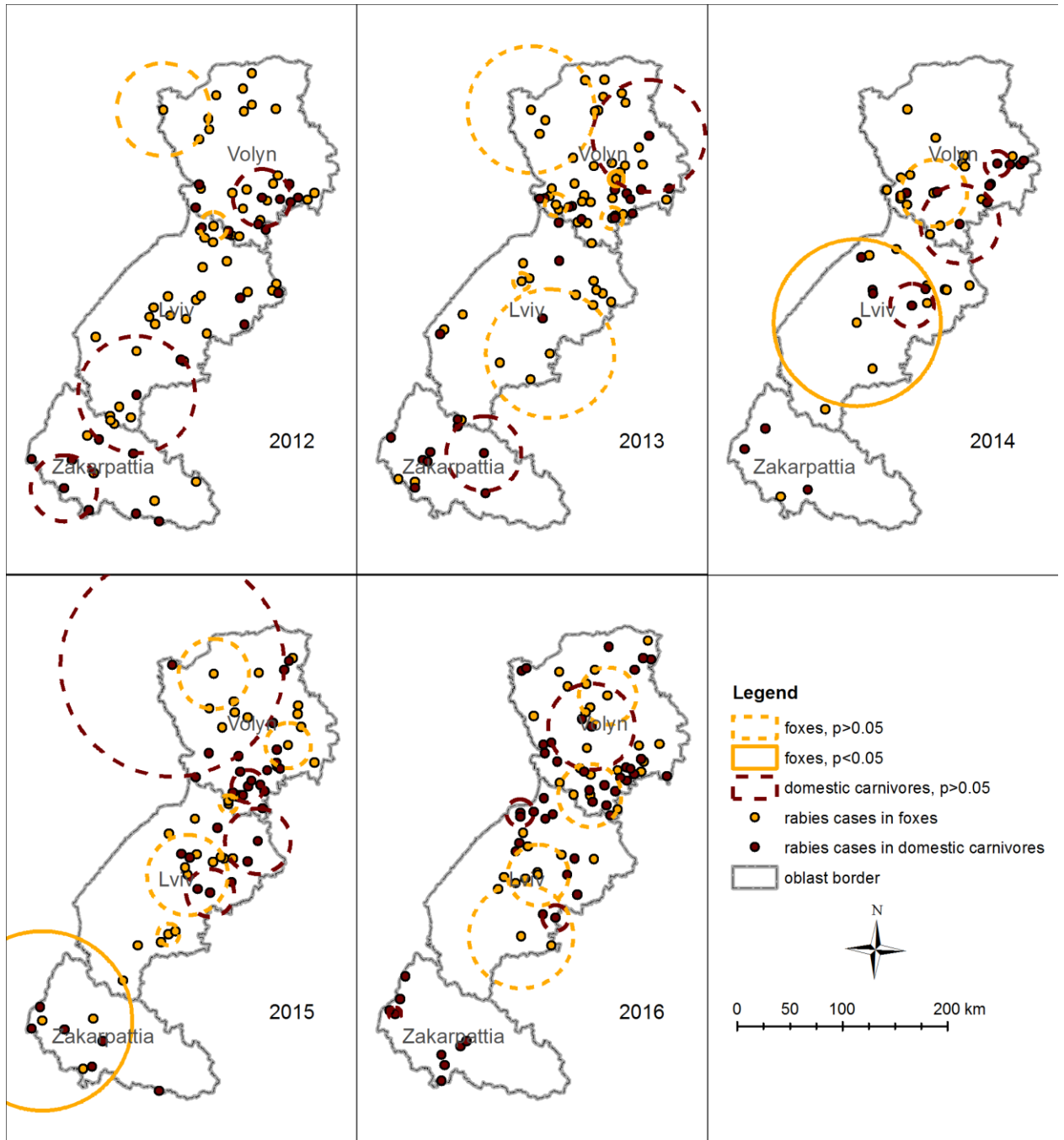


Рис. 3.30 Просторово-часова кластеризація випадків сказу серед лисиць (помаранчеві кола) та свійських м'ясоїдних тварин (коричневі кола) у Волинській, Львівській та Закарпатській областях з 2012 по 2016 рр., виявлена з використанням просторово-часової моделі перестановок у SatScan.

Суцільні кола на рис. 3.30 представляють кластери з рівнем статистичної значущості $p < 0,05$, пунктирні кола представляють кластери з $0,05$. Статистично значущі кластери випадків сказу серед лисиць виявлені у 2013,

2014, 2015 роках. Хоча деякі з них перетинаються з незначними кластерами серед свійських м'ясоїдних тварин у просторі, жоден з них не перетинається у часі.

Модель просторово-часової перестановки для випадків сказу у свійських м'ясоїдних тварин не виявила значного кластера. Однак за роки (з 2012 по 2016) серед інших видів було виявлено ряд скупчень різного розміру. З 2012 по 2013 рр. порівняно великі кластери були виявлені в Закарпатській області, на півдні Львівської та у Волинській областях. У наступні роки (2014–2016) кластери не виявлялися в Закарпатській області, тоді як найбільше кластерів було виявлено на півночі Львівської та у Волинській областях. Хоча деякі з кластерів у лисиць і свійських м'ясоїдних перекриваються в просторі, жодне з них не перетинається в часі.

Виявлення трьох кластерів захворювань, включаючи випадки як серед диких, так і свійських тварин (хоча це не підтверджується епідеміологічними чи молекулярно-генетичними дослідженнями), а також наявність кластерів у лисиць і свійських м'ясоїдних тварин поблизу один від одного припускають можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Крім того, наші результати підтверджують, що статистично значущі скупчення лисиць передували з часом скупченням усіх інших видів. Однак для підтвердження міжвидової передачі слід провести більш надійні спостереження та молекулярно-генетичні дослідження з філогенетичним аналізом.

Отже, дослідження ендемічних спалахів сказу на території трьох західних областей України (Волинська, Львівська та Закарпатська області) з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній. Включення собак і котів до ендемічних вогнищ показало недостатність існуючої системи профілактики сказу серед свійських тварин. Це вказує на необхідність виявлення та пом'якшення недоліків для забезпечення максимального охоплення вакцинацією проти сказу собак і котів. Наявна система нагляду за спалахами сказу в Україні наразі не збирає та не акумулює

інформацію ГІС, яка має вирішальне значення для визначення розповсюдження хвороби та потенційної наявності окремих кластерів хвороби у зв'язку з екологічними особливостями диких тварин, особливостями місцевості та землекористування.

Тому, розробляти, впроваджувати і використовувати для аналізу регіональні, або національну базу даних випадків сказу в Україні, що зберігає інформацію ГІС, є актуальним завданням. Вважаємо, що такі бази даних щодо сказу в майбутньому стануть ефективним інформаційним ресурсом. Визначення просторових тенденцій і ідентифікація кластерів сказу може бути корисним для прийняття рішень щодо ефективного розподілу зусиль для контролю захворювання.

3.2.3. Просторово-часова характеристика прояву сказу в Україні протягом 2018-2022 рр.

Аналіз випадків сказу проводився на усій території України, окрім тимчасово окупованих територій (Автономна республіка Крим та південно-східні частини Донецької та Луганської областей), на яких влада України не має змоги проводити профілактичні антирабічні заходи та не контролює поширення сказу. Площа цієї території 43 300 кв км, що становить близько 7 % території України. Крім того, в зв'язку із військовим вторгненням Росії в Україну в 2022 році, окупацією частини території України та руйнуванням лабораторій Держпродспоживслужби, в аналізі відсутні дані щодо випадків сказу серед тварин з Донецької, Луганської та Херсонської областей в 2022 році.

3.2.3.1. Описово-статистична характеристика прояву сказу

Протягом 2018-2022 рр. до Державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби для дослідження на наявність антигену вірусу сказу надійшло 75691 проб головного мозку тварин. Найбільше зразків (57085) були від лисиць. Основна частина зразків від лисиць (53860 проб головного мозку,

або 94,35 %) до лабораторій надходила внаслідок активного моніторингу (відстрілу лисиць), як елементу контролю ефективності кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу. Решта проб головного мозку від диких і свійських тварин (21831) були отримані шляхом пасивного нагляду за сказом, тобто направлені до регіональних лабораторій ветеринарними працівниками.

Всього за цей період 5846 проб головного мозку визнано позитивними на сказ в РПФ (2018 – 1847; 2019 – 1421; 2020 – 1226; 2021 – 767; 2022 – 585). Крім цього, в аналізі не представлені 40 випадків сказу, що виявлені різними регіональними лабораторіями протягом 2018-2022 років, однак їхню географічну локалізацію не вдалося встановити.

Протягом 2018-2022 років в Україні сказ був лабораторно встановлений серед 28 видів тварин (табл. 3.10): 6 видів свійських і сільськогосподарських тварин (ВРХ, ДРХ, кінь, кіт, свиня, собака) та 22 видів диких тварин (білка, бобер, борсук, видра, вовк, дика коза, єнотовидний собака, заєць, їжак, дикий кабан, кажан, косуля, кріль, куниця, ласка, лисиця, миша, ондатра, тхір, хом'як, шакал, щур).

Таблиця 3.10

Випадки сказу серед тварин в Україні протягом 2018-2022 рр. з визначеними географічними координатами

Вид тварин	2018	2019	2020	2021	2022
білка	2	0	1	4	0
бобер	2	0	0	2	0
борсук	6	5	4	1	1
видра	0	0	0	1	0
вовк	8	6	0	1	0
ВРХ	128	71	63	34	38
дика коза	1	0	0	0	0
ДРХ	29	9	12	7	7

Вид тварин	2018	2019	2020	2021	2022
енотовидний собака	31	12	6	3	1
заєць	0	2	0	0	0
їжак	0	1	0	0	0
дикий кабан	0	0	0	0	1
кажан	2	1	0	0	0
кінь	2	2	2	0	2
кіт	462	276	292	230	184
косуля	1	0	1	0	0
кріль	1	0	0	0	0
куниця	14	6	3	3	7
ласка	0	0	1	0	0
лисиця	737	811	552	277	179
миша	0	0	0	0	1
ондатра	1	0	0	0	0
свиня	0	0	1	0	0
собака	414	211	281	192	163
тхір	1	0	2	2	0
хом'як	0	3	0	0	0
шакал	3	4	4	9	0
щур	2	1	1	1	1
Всього	1847	1421	1226	767	585

Також ми порахували і представили в таблиці кількість випадків сказу серед тварин за роками та областями України (табл. 3.11) та візуально представили це на карті (рис. 3.31).

Таблиця 3.11

Випадки сказу серед тварин в областях України протягом 2018-2022 рр.

Область	2018	2019	2020	2021	2022
Вінницька	263	346	226	107	81
Волинська	23	20	24	26	25
Дніпропетровська	86	24	23	22	14
Донецька	57	75	102	56	-
Житомирська	99	68	52	45	39
Закарпатська	21	26	16	15	16
Запорізька	106	115	46	15	5
Івано-Франківська	23	20	25	18	27
Київська	50	19	114	66	55
Кіровоградська	152	63	82	43	36
Луганська	41	24	35	29	-
Львівська	40	27	15	20	40
Миколаївська	59	35	44	34	10
Одеська	46	37	46	43	15
Полтавська	43	20	15	21	5
Рівненська	52	27	17	30	30
Сумська	81	19	11	3	0
Тернопільська	26	27	15	32	29
Харківська	109	37	30	26	5
Херсонська	46	12	15	10	-
Хмельницька	213	122	62	16	67
Черкаська	116	221	197	84	81
Чернівецька	6	25	10	5	4
Чернігівська	89	12	4	1	1

Примітка: - – відсутня інформація.

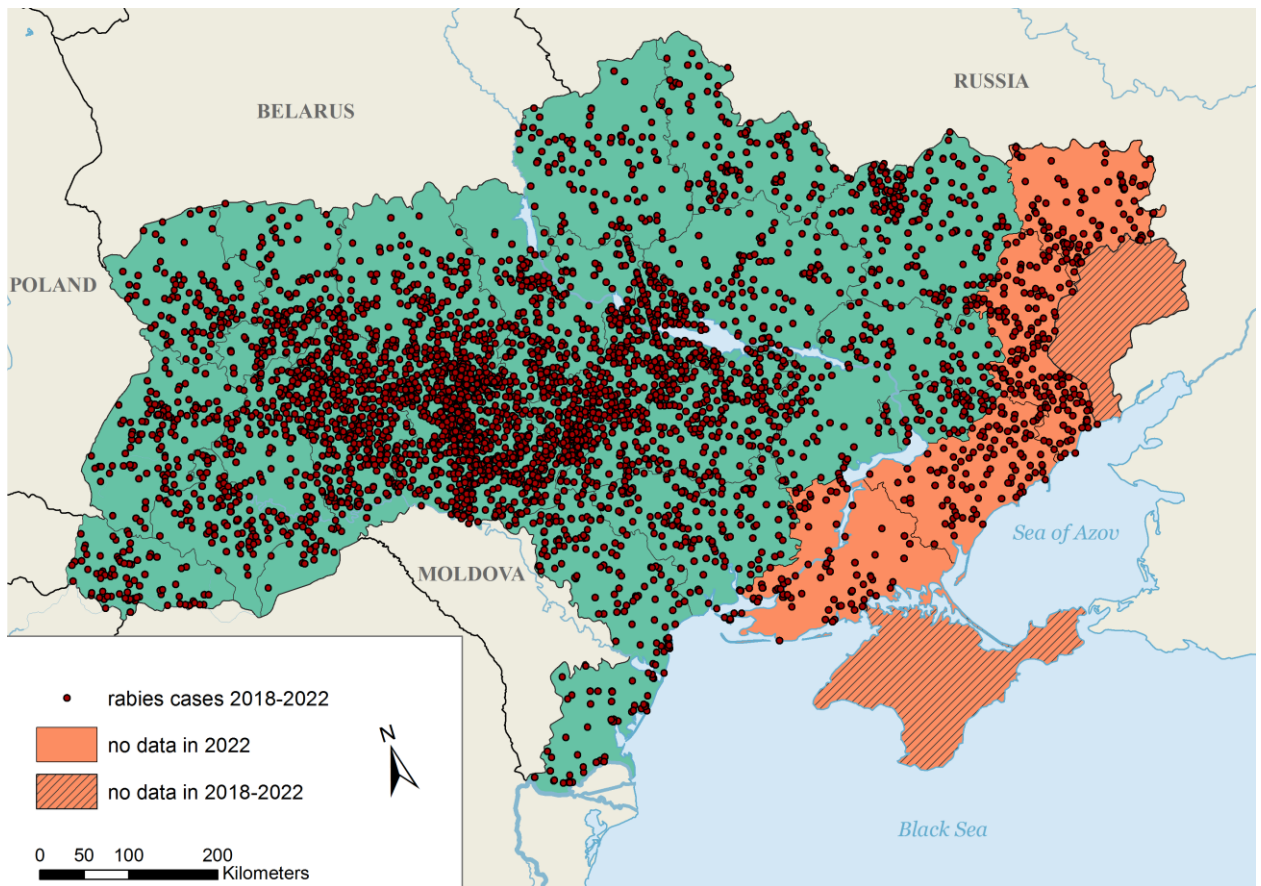


Рис. 3.31 Випадки сказу серед тварин протягом 2018-2022 рр.

Усі випадки сказу розділили на чотири групи: (1) свійські м'ясоїдні тварини (коти та собаки), (2) лисиці, 3) інші свійські тварини (тобто корова, коза, кінь і морська свинка) і (4) інші дикі тварини (табл. 3.12). Статистичні дані про випадки сказу серед лисиць були відокремлені від інших видів тварин, так як лисиці є резервуаром вірусу сказу в природі та цільовим видом тварин при здійсненні кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу. Випадки сказу серед собак і котів згруповано, так як ці тварини володіють епідеміологічним потенціалом і найчастіше викликають сказ в людей.

Найбільший відсоток позитивних випадків серед лисиць (8.28 %) був у 2018 р. (на початку проведення масштабних кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу). В наступні роки спостерігали зниження відсотка позитивних на сказ випадків у лисиць (2019 – 4.81 %, 2020 – 3.95 %, 2021 – 2.47 %). Однак в 2022 відсоток позитивних на сказ в лисиць був 2.90 %.

Таблиця 3.12

**Випадки сказу серед епідемічноважливих груп тварин в Україні протягом
2018-2022 рр.**

Групи тварин	Рік	Позитивно	Досліджено	%	Нижче 95% ВСІ	Вище 95% ВСІ
Свійські м'ясоїдні тварини	2018	876	4202	20.85	19.63	22.11
	2019	487	3666	13.28	12.20	14.43
	2020	573	3198	17.92	16.60	19.29
	2021	422	2916	14.47	13.21	15.80
	2022	347	2063	16.82	15.23	18.51
Лисиці	2018	737	8904	8.28	7.71	8.87
	2019	811	16861	4.81	4.49	5.14
	2020	552	13963	3.95	3.64	4.29
	2021	277	11192	2.47	2.20	2.78
	2022	179	6165	2.90	2.50	3.35
Інші свійські тварин	2018	160	247	64.78	58.47	70.73
	2019	82	121	67.77	58.67	75.98
	2020	78	110	70.91	61.48	79.18
	2021	41	104	39.42	29.98	49.49
	2022	47	94	50.00	39.51	60.49
Інші дикі тварини	2018	74	507	14.60	11.64	17.97
	2019	41	444	9.23	6.71	12.32
	2020	23	395	5.82	3.73	8.61
	2021	27	355	7.61	5.07	10.87
	2022	12	184	6.52	3.41	11.11

Примітка: ВСІ (95% Exact binomial confidence interval) – 95 % точний біноміальний довірчий інтервал.

Побудовано епідемічні криві захворюваності на сказ лисиць, свійських м'ясоїдних, інших свійських тварин та інших диких тварин за місячним показником захворюваності по всій території України. (рис. 3.32).

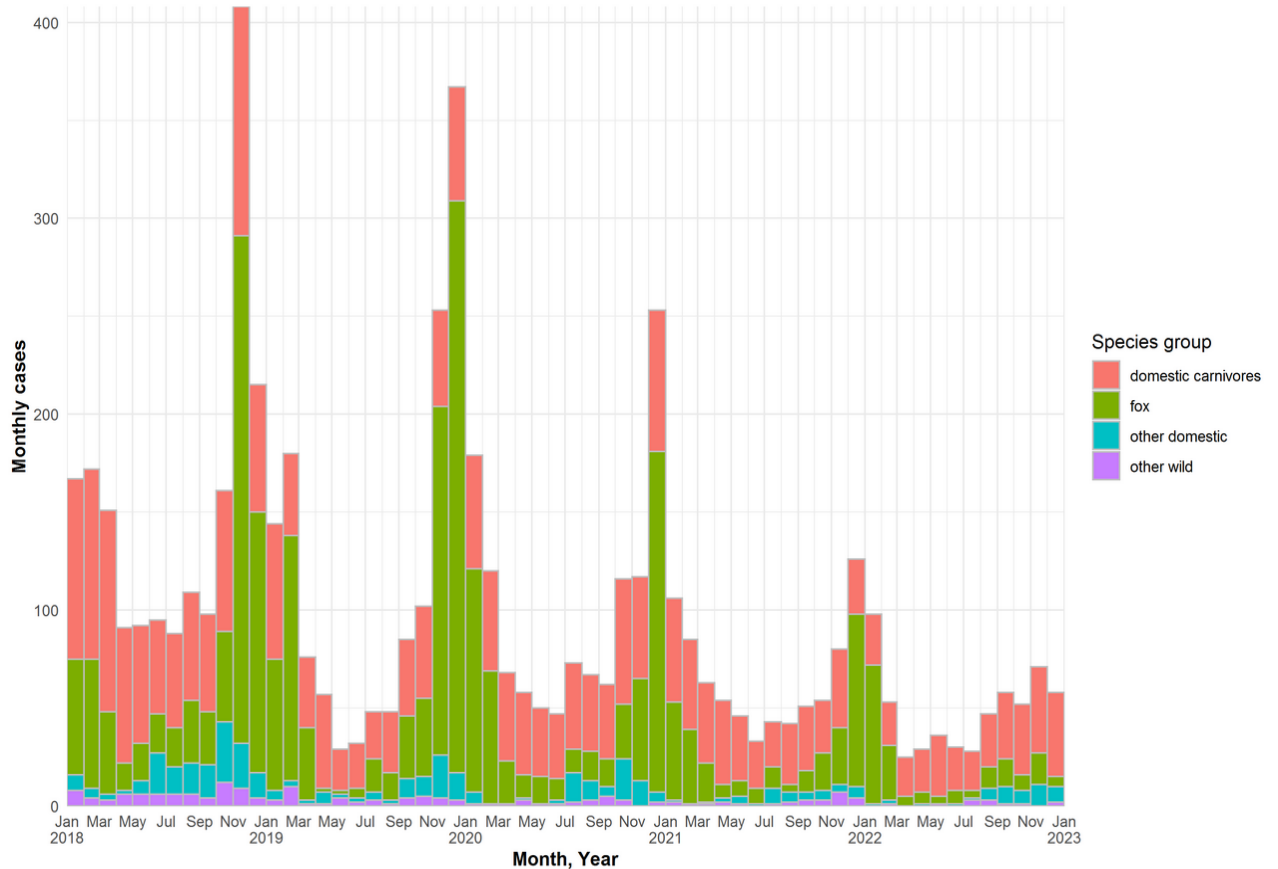


Рис. 3.32 Епідемічні криві випадків сказу серед чотирьох груп тварин по місяцях протягом 2018-2022 рр.

Епідемічна крива прояву сказу (рис. 3.32) показала щорічне зростання захворюваності в листопаді-грудні кожного року з найвищим піком виявлення випадків сказу в грудні. Відсоток позитивних випадків серед лисиць знижувався за роками спостереження.

3.2.3.2. Просторово-часова характеристика випадків сказу

Проведений просторово-часовий аналіз випадків сказу в 2018-2022 роках виявив їхню значну кластеризацію (рис. 3.33).

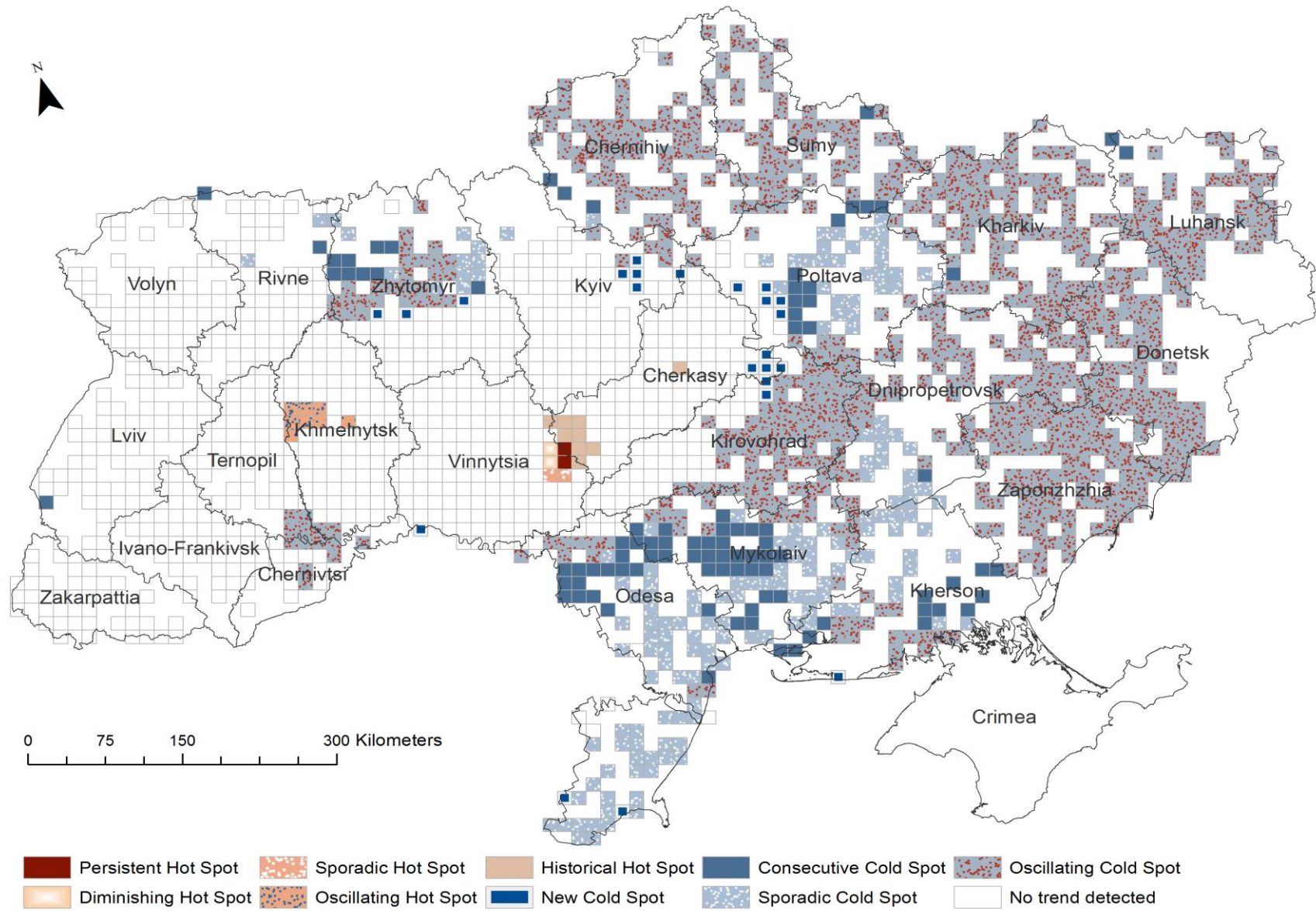


Рис. 3.33 Emerging hot spot аналіз випадків сказу в Україні в 2018-2022 рр.

Загалом просторово-часовим аналізом випадків сказу в 2018-2022 роках встановлено 1799 кластерів: 23 гарячих, 954 холодних кластера та 822 кластера без визначеного тренду (Not Emerging).

Просторово-часовий аналіз встановив п'ять видів гарячих кластерів: виявлено 9 кластерів Historical Hot Spot в Вінницькій і Черкаській областях. 2 кластери на межі Вінницької і Черкаської областей Persistent Hot Spot. 2 кластери Sporadic Hot Spot на території Вінницької області. Також на території Вінницької області виявлено два кластери Diminishing Hot Spot. Крім цього на території Хмельницької області виявлено 8 кластерів Oscillating Hot Spot.

Із холодних кластерів основна частина представлена Oscillating Cold Spot (670). Інша велика група кластерів – Sporadic Cold Spot (167). В 12 областях виявлено кластери Consecutive Cold Spot (94) та на території 7 областей – кластери New Cold Spot (23).

Відсутність холодних і гарячих кластерів виявлено лише в трьох областях: Волинська, Закарпатська та Івано-Франківська. На території цих областей були тільки кластери без визначеного тренду.

Візуалізація класифікації результатів статистики Getis-Ord G_i^* гарячі і холодні просторово-часові кластери випадків сказу в Україні впродовж 2018-2022 років розраховані з двомісячним інтервалом представлені на рис. 3.34.

Впродовж двомісячних часових проміжків, на які був розділений часовий інтервал 2018-2022 років кластеризація гарячих і холодних точок з довірчими інтервалами більше 90, 95 і 99 % значно змінилася (рис. 3.35).

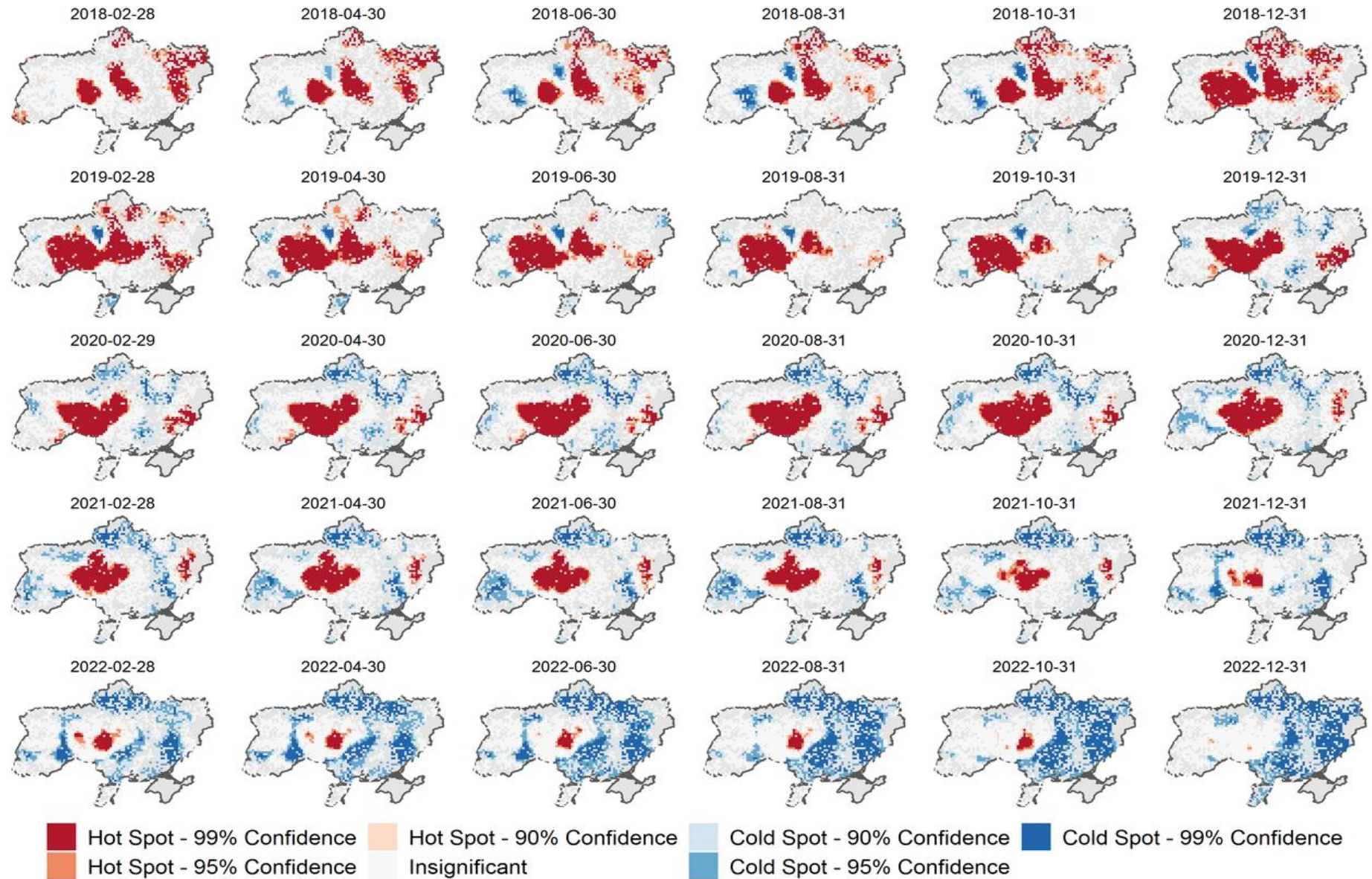


Рис. 3.34. Просторово-часовий куб для Emerging hot spot аналізу візуалізований через часові кроки в 2 місяці.

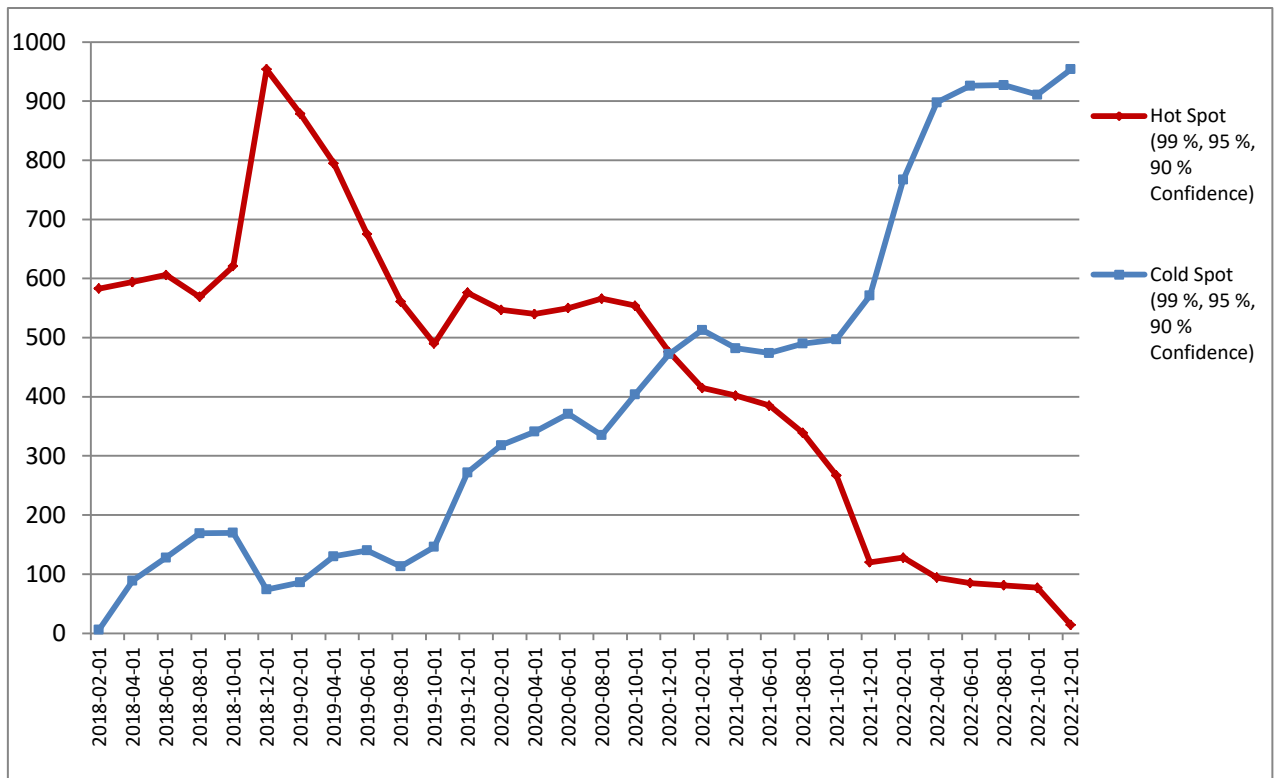


Рис.3. 35 Кількість гарячих і холодних кластерів протягом двомісячних кроків в Emerging hot spot analysis.

Протягом січня-лютого 2018 – листопада-грудня 2020 року кількість Hot Spot була близько 550 із певними коливаннями. Кількість Cold Spot була близько 100 в кожному двомісячному інтервалі до січня-лютого 2019 року, після чого почали відмічати тенденцію до збільшення кількості Cold Spot в кожний часовий проміжок. Ні рівні часового проміжку листопада-грудня 2020 року кількість кластерів була на одному рівні (476 Hot Spot проти 472 Cold Spot). В подальшому, до кінця 2022 року відмічали зменшення кількості Hot Spot та збільшення кількості Cold Spot. Лише 14 (4- 95% Confidence and 10- 90% Confidence) кластерів Hot Spot виявлено в останній часовий проміжок на території Вінницької і Хмельницької областей.

Загалом значна відмінність між кількістю гарячих і холодних кластерів сказу в Україні протягом 2018-2022 років вказує на достовірне поступове зменшення прояву епізоотії сказу в Україні внаслідок проведення в Україні кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу. Різке

збільшення кількості гарячих кластерів відповідає збільшенню реєстрації випадків сказу в кінці 2018 року (рис 3.35). Це відбулося фактично за рахунок збільшення дослідження проб головного мозку лисиць внаслідок активного моніторингу з метою контролю кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу та виявлення інфікованих тварин. Адже, після однієї кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу частка імунних тварин скоріш за все була не значною. В подальшому постійно спостерігали тенденцію до зменшення кількості статистичних кластерів з трендом Hot Spot із одночасним збільшенням кластерів з трендом Cold Spot.

Окремо варто зазначити, що з високою ймовірністю частина випадків сказу серед в 2022 році не була включена до нашого дослідження, адже проведення бойових дій в тій чи іншій мірі торкнулося багатьох областей, в яких ветеринарні лабораторії не припинили роботу (Київська, Житомирська, Чернігівська, Сумська, Полтавська, Харківська, Дніпропетровська, Запорізька і Миколаївська) і ми отримали їхню звітність. Однак через проблеми з відбором і доставкою зразків головного мозку до лабораторій можливо частина позитивних зразків не була задокументована.

Аналізуючи прояв сказу протягом 2018-2022 років можна вважати, що зниження ензоотії сказу станом на кінець 2022 року – це найкращий результат в XXI столітті, який досягнуто ветеринарною службою України. Адже відсутність контролю сказу на певній частині території України внаслідок бойових дій, не проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в 2022 році та зменшення об'ємів пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в наступні роки є факторами, які з великою вірогідністю будуть мати негативний вплив на прояв ензоотії сказу в Україні.

Результати підрозділу 3.2 висвітлені в наукових працях [10, 48, 335, 336].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

У розділі 3 висвітлено результати числених комплексних епізоотологічних досліджень прояву епізоотії сказу в Україні.

Описово-статистична характеристика прояву сказу в Україні на початку ХХІ століття показала, що сказ в Україні, з узагальненням випадків серед людей, диких і свійських тварин, є ендемічним захворюванням, що широко поширене в усіх природно-географічних зонах й адміністративних одиницях нашої держави.

Встановлено, що резервуаром збудника сказу на території України – є лисиця звичайна, на частку якої припадає більше 36 % лабораторно виявлених випадків. Серед свійських тварин найбільше реєструється захворювання в собак (19,3 %) і котів (25,3 %), що становлять найбільшу загрозу для людей, так як володіють найвищим епідемічним потенціалом.

Дослідження сезонності прояву сказу показало домінування осінньо-зимової часового проміжку виявлення випадків сказу серед тварин. Такий прояв сезонності пов'язаний із міграцією молодих тварин у пошуках нового місця проживання, активним переміщенням тварин внаслідок осінніх польових робіт, контактами із нанесенням покусів конкурентами і можливістю інфікування з подальшим захворюванням. Контакти хворих лисиць із нещепленими бездомними і свійськими собаками, котами й великою рогатою худобою, яка знаходиться на пасовищах, призводять до захворювання тварин зазначених видів.

Дослідження напруженості епізоотичної ситуації зі сказу в адміністративних областях України протягом 2000-2017 рр. показало поступове зменшення прояву сказу на території східних областей та відповідно – зміщення центру епізоотії сказу в Україні. В останні досліджені трирічні часові проміжки епіцентром епізоотії сказу в Україні було встановлено територію Вінницької області. Крім того, слід зазначити наявність тенденції до росту напруженості епізоотичної ситуації в західних областях на фоні певного

покращенням на сході України, що може бути наслідком більш тривалого впровадження пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Однак, загалом області заходу України продовжують залишатись більш благополучною зоною із низькою та середньою напруженістю епізоотичної ситуації, а Закарпатська та Чернівецька області постійно перебували у зоні із низькою напруженістю епізоотичної ситуації щодо сказу протягом всього аналізованого часового проміжку.

Аналіз епідеміологічного прояву сказу показав, що щорічна поодинокі реєстрація випадків сказу серед людей є свідченням не тільки необхідності удосконалення існуючої системи профілактичних антирабічних заходів серед диких і с війських тварин, а також просвітницьких заходів серед населення щодо джерел і резервуарів збудника сказу, способів інфікування, засобів профілактики сказу серед людей та небезпеки захворювання на сказ.

Поряд із описово-статистичною характеристикою сказу, яка за наявними механізмами може спиратися тільки на аналіз в межах адміністративних одиниць держави відповідно до поданих лабораторіями і управліннями Держпродспоживслужби звітів, вивчення поширення сказу серед тварин з використанням інструментів ГІС відкриває більш широкі й адекватні сучасним викликам можливості. Адже, сказ – є транскордонною хворобою. Саме тому проведення належного сучасного епізоотологічного аналізу можливе лише при наявності точних географічних координат усіх випадків сказу і використання широкого переліку інструментів програм для ГІС.

В наших дослідженнях (пілотний проект – дослідження просторово-часових особливостей прояву сказу в Чернігівській області) з використанням інструментів ГІС було виявлено середній центр випадків сказу, дисперсію та просторові тренди випадків сказу в Чернігівській області протягом 2011-2016 рр. Однак, найцінніший результат отримано з використання інструменту Create Space Time Cube для ESRI ArcMap 10.3, який дав можливість виявити нові кластери, ріст чи зменшення захворювання в певних зонах, спорадичні гарячі і холодні зони.

При здійсненні Emerging Hotspot Analysis випадків сказу на території Чернігівської області за 2011-2016 рр. виявлено 18 просторово часових кластерів із трендом «спорадичний» (місце, в якому з'являється і зникає гаряча точка (hotspot); місце, в якому менше 90 % всіх часових інтервалів були статистично значимі hotspots і ні один з інтервалів не був статистично значимою холодною точкою – coldspot) в центральних і південно-західних районах області.

Виявлення цих 18 кластерів має особливе практичне значення. Адже територія цих кластерів і є стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу. Підтвердження постійної реєстрації випадків сказу на цих територіях є обґрунтуванням необхідності зміни системи антирабічних заходів.

Цікавим в науково-практичному плані є виявлення 3 кластерів із трендом «новий», які були виявлені на крайньому південному сході області по периметру Варвинського району, де за дослідний період не зафіксовано жодного випадку сказу.

Нашим припущенням є те, що виявлення цих кластерів може бути пов'язане із припиненням в попередні роки кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу на території Полтавської і Сумської областей. Теорії базується на наявності опосередкованого пресингу на епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області кампаніями з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин, що були проведені в Полтавській та Сумській областях в 2006-2015 рр.

Наступним, більш широким епізоотологічним дослідженням з використанням інструментів ГІС була просторово-часова характеристика прояву сказу на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр., яка мала на меті провести дослідження впливу кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Проведення просторово-часової оцінки прояву сказу в трьох західних областях України з використанням моделі просторово-часової перестановки SatScan для усіх видів тварин показала певну кластеризацію випадків.

Перший кластер розташовувався на південь від Закарпатської області на кордоні з Угорщиною та Румунією радіусом 41,9 км Цей кластер включав сім випадків сказу у тварин: два у лисиць, три у собак і два у котів.

Другий кластер (23–29 січня 2013 р.) радіусом 15,4 км розташований у центрі Волинської області, на межі зони оральної вакцинації 2012–2013 рр. Цей кластер включав п'ять випадків сказу (чотири у лисиць, один у єнотоподібних собак).

Третій кластер знаходився в Закарпатській області; його центр розташовувався на північ від центру першого кластера. Радіус кластера становив 48,2 км і охоплював період з 18 березня 2015 року по 02 квітня 2015 року. Включав п'ять випадків сказу (три у лисиць, два у котів).

Виявлення трьох кластерів захворювань, включаючи випадки як серед диких, так і свійських тварин (хоча це не підтверджується епідеміологічними чи молекулярно-генетичними дослідженнями), а також наявність кластерів у лисиць і свійських м'ясоїдних тварин поблизу один від одного припускають можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Крім того, наші результати підтверджують, що статистично значущі скупчення випадків сказу серед лисиць передували з часом скупченням випадків сказу серед інших видів.

Отже, дослідження ендемічних спалахів сказу на території трьох західних областей України (Волинська, Львівська та Закарпатська області) з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній. Включення собак і котів до ендемічних вогнищ показало недостатність існуючої системи профілактики сказу серед свійських тварин. Це вказує на необхідність виявлення та пом'якшення недоліків для забезпечення максимального охоплення вакцинацією проти сказу собак і котів.

Логічним масштабуванням епізоотологічних досліджень стала просторово-часова оцінка поширення сказу в Україні протягом 2018-2022 рр., що мала на меті також оцінку ефективності широкомасштабних кампаній пероральної

вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що проводилися в Україні протягом 2018-2021 рр.

Просторово-часовий аналіз встановив п'ять видів гарячих кластерів: виявлено 9 кластерів Historical Hot Spot в Вінницькій і Черкаській областях. 2 кластери на межі Вінницької і Черкаської областей Persistent Hot Spot. 2 кластери Sporadic Hot Spot на території Вінницької області. Також на території Вінницької області виявлено два кластери Diminishing Hot Spot. Крім цього на території Хмельницької області виявлено 8 кластерів Oscillating Hot Spot.

Із холодних кластерів основна частина представлена Oscillating Cold Spot (670). Інша велика група кластерів – Sporadic Cold Spot (167). В 12 областях виявлено кластери Consecutive Cold Spot (94) та на території 7 областей – кластери New Cold Spot (23).

Відсутність холодних і гарячих кластерів виявлено лише в трьох областях: Волинська, Закарпатська та Івано-Франківська. На території цих областей були тільки кластери без визначеного тренду.

Протягом січня-лютого 2018 – листопада-грудня 2020 року кількість Hot Spot була близько 550 із певними коливаннями. Кількість Cold Spot була близько 100 в кожному двомісячному інтервалі до січня-лютого 2019 року, після чого почали відмічати тенденцію до збільшення кількості Cold Spot в кожний часовий проміжок. Ні рівні часового проміжку листопада-грудня 2020 року кількість кластерів була на одному рівні (476 Hot Spot проти 472 Cold Spot). В подальшому, до кінця 2022 року відмічали зменшення кількості Hot Spot та збільшення кількості Cold Spot. Лише 14 (4- 95% Confidence and 10- 90% Confidence) кластерів Hot Spot виявлено в останній часовий проміжок на території Вінницької і Хмельницької областей.

Загалом значна відмінність між кількістю гарячих і холодних кластерів сказу в Україні протягом 2018-2022 років вказує на достовірне поступове зменшення прояву епізоотії сказу в Україні внаслідок проведення кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Просторово-часова оцінка ензоотії сказу в Україні в 2018-2022 роках показала динаміку зменшення прояву сказу серед усіх видів тварин. Однак, аналіз ефективності кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу свідчить про їхню недостатню ефективність. Для досягнення кращого ефекту пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу потрібно було проводити двічі на рік: весною і восени. Включення свійських м'ясоїдних тварин (собак і котів) також вказує про наявність проблем в існуючій системі профілактики сказу серед цих тварин. В подальшому ми продовжимо досліджувати просторово-часові тенденції прояву ензоотії сказу в Україні з метою визначення масштабів негативного впливу бойових дій, які проходять на території України, на ензоотію сказу та оцінки ефективності антирабічних профілактичних заходів, що проводяться ветеринарною службою України для удосконалення існуючої системи контролю сказу.

Отже, на сьогодні наявна система нагляду за спалахами сказу в Україні наразі не збирає та не акумулює інформацію ГІС, яка має вирішальне значення для визначення розповсюдження хвороби та потенційної наявності окремих кластерів хвороби у зв'язку з екологічними особливостями диких тварин, особливостями місцевості та землекористування.

Тому, розробляти, впроваджувати і використовувати для епізоотологічного аналізу інформацію про випадки сказу в Україні, що зберігає інформацію ГІС, є актуальним завданням. Визначення просторових тенденцій і ідентифікація статистично-значимих кластерів випадків сказу може бути корисним для прийняття рішень щодо ефективного розподілу зусиль для контролю захворювання на цих територіях.

РОЗДІЛ 4. ТЕОРЕТИЧНО-ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ СИСТЕМИ КОНТРОЛЮ СКАЗУ В УКРАЇНІ

4.1. Оцінка ризику поширення сказу серед диких, свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні

На запит Управління здоров'я та благополуччя тварин Департаменту безпечності харчових продуктів та ветеринарної медицини робочою групою експертів під координацією Сектору оцінки ризиків Держпродспоживслужби та за технічної підтримки експертів Проєкту ЄС «Вдосконалення законодавства, контролю та поінформованості у сфері безпечності харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в Україні» з 19 листопада по 29 грудня 2020 року було проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних тварин, а з 01 квітня по 30 вересня 2021 року було проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед свійських і сільськогосподарських тварин з метою отримання науково-обґрунтованої оцінки факторів, які впливають на поширення сказу серед свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та формування рекомендацій щодо її удосконалення.

Протягом збору та аналізу даних був ідентифікований брак достовірних даних для проведення об'єктивної оцінки ризиків, а саме щодо щільності диких лисиць, достовірності відібраних проб сироваток та щелеп, даних щодо реальної кількості свійських і безпритульних тварин та інших даних.

Також ідентифікований брак достовірних даних щодо кількості собак та котів, недостатності та достовірності відібраних проб сироваток від свійських тварин, відсутності системи контролю антирабічного імунітету у свійських собак і котів, відсутність менеджменту безпритульних собак та котів та інших даних.

За відсутністю та/або недостовірністю було проведено синтез експертної думки, ґрунтуючись на власних знаннях та досвіді.

При проведенні оцінки ризику прийнято рішення також оцінити ймовірність занесення вірусу сказу на територію України дикими м'ясоїдними тваринами і найвищий рівень ризику занесення збудника мав шлях перетину кордону інфікованими вірусом сказу дикими м'ясоїдними тваринами (переважно лисицями). При оцінці впливу було виявлено дуже високу ймовірність не ефективності проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин, що сприяє високій ймовірності того, що за існуючої в Україні антирабічної пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин не буде достатня кількість вакцинованих тварин для формування популяційного імунітету. Також при оцінці впливу було визначено високу ймовірність неефективності системи проведення вакцинації свійських м'ясоїдних тварин та висока ймовірність не проведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин, що сприяє циркуляції вірусу сказу та ймовірності інфікування диких м'ясоїдних тварин.

А під час проведення оцінки наслідків була встановлена дуже висока ймовірність поширення сказу серед популяції диких м'ясоїдних тварин саме від невакцинованих диких м'ясоїдних тварин.

При оцінці впливу було виявлено дуже високу ймовірність неефективності проведення парентеральної вакцинації свійських тварин, що сприяє високій ймовірності того, що за існуючої в Україні системи контролю сказу тварин не буде достатня кількість вакцинованих тварин для формування популяційного імунітету.

Також при оцінці впливу було визначено високу ймовірність не проведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин, що є фактором сприяння циркуляції вірусу сказу, в тому числі ймовірності інфікування диких м'ясоїдних тварин. А під час проведення оцінки наслідків була встановлена дуже висока ймовірність поширення сказу серед популяції свійських тварин саме від невакцинованих свійських та безпритульних тварин.

Виходячи з результатів оцінки ризиків, зроблено рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками.

Рекомендації за результатами оцінки ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних тварин:

1. Для забезпечення максимального результату пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу потрібна як довгострокова стратегія, так і міжнародне співробітництво з сусідніми країнами та синхронізація цього заходу:

- вакцинація повинна бути системною – 2 рази на рік у визначені часові проміжки (місяці);

- щільність принад 25шт/км² у повітряний та ручний (прикордонний) спосіб з врахуванням кліматичних умов, геобар'єрів та біології тварин;

- синхронізація протиєпізоотичних заходів із сусідніми державами та створення буферних зон (з кожної країни глибиною 50 км впродовж кордону) з щільністю розкладки – 35 принад на км². Буферна зона пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу повинна бути шириною 50 км, але глибина буферної зони може бути зменшена до 20 км, якщо існує штучний або природний бар'єр, який обмежує пересування лисиць та / або єнотоподібних собак;

- продовжуваність пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу не менше 5 років поспіль та 2 роки після виявлення останнього випадку, а вздовж кордонів з неблагополучними країнами постійно.

2. Забезпечити контроль проведення кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу та достовірний аналіз їх ефективності:

- контрольні точки й оцінка вакцин з поля шляхом створення системи простежуваності вакцини від виробника до місця застосування (створення майстер файлів) та серійний контроль вакцин в уповноваженій установі перед розкладкою принад в полі;

- проведення контролю споживання вакцини в контрольних точках (4, 7, 15 день);

- проведення контролю відстрілу лисиць (2-4 на 100 км²);

- забезпечити відповідність пар проб щелеп та сироваток крові (тетрацикліновий маркер – антирабічні антитіла) шляхом мотивації мисливців для відбору і доставки проб біологічного матеріалу від диких м'ясоїдних тварин при відстрілі.

3. Забезпечити ранжування та зонування території України по неблагополуччю щодо сказу тварин та створити карти буферних зон для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу біля:

- мегаполісів (до 20 км – 35 принад на км²),
- благополучних зон,
- кордонів з іншими державами.

4. Актуалізація методології обрахунку кількості доз вакцини, відповідно до щільності диких м'ясоїдних тварин, після отримання достовірних даних щодо щільності диких м'ясоїдних тварин, зокрема лисиць. Для цього забезпечити звернення до незалежних та компетентних структур з метою достовірності обрахунку (розробки і імплементації методики обрахунку) щільності диких м'ясоїдних тварин в Україні.

5. Забезпечити сучасним оснащенням (люмінесцентні мікроскопи) та розхідними матеріалами вірусологічні та патоморфологічні відділи уповноважених лабораторій, якими проводяться діагностичні дослідження на сказ.

6. Забезпечити науковий супровід молекулярно-генетичних досліджень вірусу сказу з впровадженням сучасних методів лабораторної діагностики сказу (вірусовиділення в культурі клітин та полімеразно-ланцюгова реакція) на базі Референс-центру з діагностики хвороб тварин. Проводити перманентний нагляд ступені генетичної спорідненості ізолятів вірусу сказу від мажорних видів тварин, та їх георанжування з метою екстреного реагування в випадках появи нових варіантів вірусу сказу.

7. Забезпечити сучасним матеріальним оснащенням, необхідними умовами біобезпеки, витратними матеріалами, безкоштовною вакцинацією спеціалістів

групи-ризик – працівників, якими безпосередньо проводиться відбір та пересилання проб.

8. Сформувати робочі групи фахівців для розробки і гармонізації з міжнародними стандартами національної нормативно-правової бази щодо здійснення контролю сказу серед свійських та диких тварин, а саме:

- Методики проведення пероральної антирабічної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в Україні;

- Інструкції «Про заходи щодо боротьби зі сказом тварин в Україні»

- Національної програми щодо контролю сказу серед свійських і диких тварин в Україні на 2021-2030 рр.

9. Забезпечити тотальну ідентифікацію свійських тварин з тотальною вакцинацією свійських м'ясоїдних тварин із обов'язковим проведенням контролю ефективності вакцинації.

10. Проведення постійного інформування населення щодо небезпеки сказу диких та свійських тварин та посилення відповідальності власника за забезпечення здоров'я та благополуччя тварин, а також забезпечити санітарно-освітню роботу з населенням щодо заходів попередження сказу з боку медичних працівників та фахівців ветеринарної медицини.

11. Для безпритульних тварин: проведення максимальної ідентифікації тварин, менеджмент та гуманний контроль популяції. Налагодження системної вакцинації безпритульних тварин.

12. Пасивний нагляд повинен бути пріоритетом для Компетентного органу. Нагляд залежить від здатності компетентного органу залучати мисливців, фермерів та інших осіб, які проводять час у місцях проживання диких м'ясоїдних тварин, зокрема лисиць. Для того, щоб мати змогу приймати обґрунтовані рішення, оцінка даних нагляду є надзвичайно важливою. Компетентний орган повинен переконатися, що вони мають усі необхідні дані та знання для проведення цієї оцінки.

13. Необхідно налагодити системний збір достовірних даних, що допоможе в майбутньому провести специфічну для кожного виду тварин більш точну

кількісну оцінку ризиків та виявити конкретні фактори ризику, які сприяють поширенню сказу по території України.

14. Враховуючи, що під час оцінки впливу було визначено високу ймовірність неефективності системи проведення вакцинації свійських м'ясоїдних тварин та висока ймовірність не проведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин, що сприяє циркуляції вірусу сказу, рекомендовано провести якісну оцінку ризику поширення сказу серед свійських та сільськогосподарських тварин, включаючи безпритульних.

15. Забезпечити проведення спеціалізованих тренінгів та інформаційних кампаній серед спеціалістів ветеринарної медицини, а саме підвищення рівня кваліфікаційних навичок спеціалістів (як лабораторій так і управлінь Держпродспоживслужби в районах та областях) на місцях щодо відбору, пересилки та дослідження проб та контроль відповідних знань (включаючи симуляційні завдання).

Рекомендації за результатами оцінки ризиків поширення сказу серед свійських та сільськогосподарських тварин:

1. Сформувати та впровадити методологію ідентифікації свійських і безпритульних собак і котів. Для цього необхідним є звернення до незалежних та компетентних структур з метою достовірного обрахунку кількості свійських та безпритульних собак і котів в Україні.

2. Створити нормативні умови для забезпечення проведення постійної ідентифікації свійських тварин.

3. Забезпечити парентеральну вакцинацію свійських м'ясоїдних тварин проти сказу із розробкою та впровадженням системи достовірного контролю ефективності проведеної антирабічної вакцинації цих тварин, а саме:

- приведення планових показників вакцинації собак і котів, що визначені річними протиепізоотичними планами, у відповідність до реальної кількості свійських собак і котів в Україні;

- забезпечення системності антирабічної вакцинації (не менше 70 %) свійських собак і котів із щорічною ревакцинацією згідно нормативних документів;

- формування механізму із налагодження звітності до Держпродспоживслужби від приватних клінік ветеринарної медицини та притулків щодо проведеної антирабічної вакцинації собак та котів;

- розробка методології розрахунку вибірки собак і котів для проведення індивідуальної оцінки антирабічного імунітету та ефективності парентеральної вакцинації свійських м'ясоїдних тварин для достовірного скринінгу імунного статусу тварин та характеристики популяційного імунітету.

4. Забезпечити сучасним оснащенням (люмінесцентними мікроскопами) та розхідними матеріалами вірусологічні відділи уповноважених державних лабораторій Держпродспоживслужби, які проводять діагностичні дослідження патологічного матеріалу на сказ.

5. Забезпечити науковий супровід молекулярно-генетичних досліджень вірусу сказу з впровадженням сучасних методів лабораторної діагностики сказу (вірусовиділення в культурі клітин та полімеразно-ланцюгова реакція) на базі Референс-центру з діагностики хвороб тварин.

6. Забезпечити сучасним матеріальним оснащенням, необхідними умовами біобезпеки, витратними матеріалами, безкоштовною вакцинацією спеціалістів групи-ризиків – працівників, які безпосередньо проводять відбір та пересилання патологічного матеріалу, а також працюють з безпритульними тваринами.

7. Сформувати робочі групи фахівців для розробки і гармонізації з міжнародними стандартами національної нормативно-правової бази щодо здійснення контролю сказу серед свійських та сільськогосподарських тварин, а саме:

- Інструкції «Про заходи щодо боротьби та профілактики сказу тварин в Україні»;

- Національної програми (стратегії) контролю сказу серед свійських і диких тварин в Україні на 2021-2030 рр.

8. Збільшити кількість заходів для інформування населення щодо небезпеки сказу серед свійських тварин та посилення відповідальності власників тварин, а також забезпечити санітарно-освітню роботу з населенням щодо заходів попередження сказу з боку медичних працівників та фахівців ветеринарної медицини.

9. Для забезпечення профілактики сказу серед безпритульних тварин необхідним є проведення ідентифікації тварин, менеджмент та гуманний контроль популяції та налагодження системної вакцинації (ревакцинації) безпритульних собак та котів.

10. Для забезпечення профілактики сказу серед сільськогосподарських тварин та мінімізації економічних втрат необхідним є імплементація сучасних протоколів менеджменту та благополуччя ВРХ, ДРХ і коней, а також антирабічна профілактика сказу тварин, що перебувають в літній період на пасовищах.

11. Налагодження системного збору даних щодо кількості свійських собак і котів, кількості безпритульних собак і котів, перманентної серологічної оцінки напруженості антирабічного імунітету серед свійських і сільськогосподарських тварин, достовірної інформації щодо відсотку вакцинації сільськогосподарських, свійських та безпритульних м'ясоїдних тварин, в інформації щодо менеджменту безпритульних собак і котів, тощо.

12. Забезпечити проведення спеціалізованих тренінгів та інформаційних кампаній серед спеціалістів ветеринарної медицини щодо підвищення рівня кваліфікаційних навичок спеціалістів (лабораторій та регіональних управлінь Держпродспоживслужби) на місцях щодо імунізації свійських та сільськогосподарських тварин, відбору, пересилки та дослідження проб сироваток крові, тестування імунітету та контролю відповідних знань (в тому числі з симуляційними завданнями).

4.2. Удосконалення системи профілактики сказу серед диких м'ясоїдних тварин в Україні

Постійна перманентна напруженість епізоотичної ситуації зі сказу в Україні вимагає радикальних заходів, серед яких одне з основних місць займає пероральна імунізація диких м'ясоїдних тварин, ефективність якої доведена як в експериментальних, так і в польових умовах.

В Україні кампанії з пероральної імунізації лисиць проти сказу почали впроваджувати в польових умовах наприкінці 90-х років ХХ ст. Однак, через обмежені фінансові можливості цей захід здійснювали лише в областях з високою превалентністю сказу. Так, навесні 2001 року 80 тис. доз вакцини "RABIFOX" (Німеччина) було розподілено в 6 регіонах: Чернігівській, Сумській, Луганській, Черкаській, Київській та Полтавській областях. Вакцини розкладали пішки переважно біля лисячих нір. На жаль, у 2001 році кампанія вакцинації проводилася з недостатньою кількістю доз вакцин і не дала очікуваних результатів – зниження випадків сказу. У 2001-2003 роках пероральну вакцинацію диких м'ясоїдних проти сказу було впроваджено в Одеській області з використанням вакцини на основі штаму Внуково-32. Вакцинація не показала зниження випадків сказу. У 2002-2005 рр. в Полтавській області проведено три кампанії вакциною Рабівак ХТТ. Ці кампанії також не дали очікуваних результатів. У 2003-2004 роках проведено пероральну вакцинацію диких м'ясоїдних проти сказу рекомбінантною вакциною Раборал V-RG (Франція) в Джанкойському та Нижньогірському районах АР Крим. Дослідження цієї кампанії показало високий рівень споживання вакцини серед цільових типів тварин (більше 95% протягом 15 днів) та високий ступінь імунного захисту серед лисиць, що зменшило випадки сказу в цих районах.

На основі успішного проведення кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в багатьох європейських країнах та на території АР Крим з використанням рекомбінантної вакцини Raboral V-RG (Франція) в

Україні реалізовано масштабні кампанії з використанням рекомбінантної вакцини Броварабіс V-RG (Укрветпромпостач, Україна) з грудня 2006 р. З 2006 по 2014 рр. кампанії пероральної вакцинації були спрямовані на вісімнадцять областей. Проте проведення цих кампаній було нерегулярним, за винятком східних областей України (Харківська, Сумська, Полтавська, Луганська та Донецька області), де кампанії проводилися регулярно. Після цих кампаній кількість спалахів сказу зменшилася, особливо в Полтавській та Луганській областях України.

Крім того, враховуючи транскордонну проблему сказу, з 2012 року пероральна вакцинація лисиць почала проводитися й у західних областях України, на прикордонних з Польщею та Угорщиною територіях. Кампанії проводилися з поступовим збільшенням території (приблизно з 26 000 км² у 2012 році до понад 48 000 км² у 2016 році).

З метою удосконалення проведення кампаній з пероральної вакцинації лисиць проти сказу були розроблені методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу». Рекомендації враховували положення відповідного керівництва ЄС, а також сучасні аспекти здійснення повітряного розподілу принад з вакциною і методику фіксування точної локалізації приладами з GPS (Глобальна Система Позиціонування), що підвищить ефективність пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Звичайно, основу успіху пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу становить використання безпечних і високоімунних вакцин, які мають відповідати таким вимогам:

- створювати специфічний імунітет за перорального застосування;
- не викликати захворювання у тварин віком 3–6 місяців за перорального введення 10-и кратної дози;
- не виділяти вакцинного вірусу сказу зі слиною або іншими секретами;
- бути безпечними: а) для цільових видів тварин; б) для інших тварин, які можуть вживати принаду; в) для людини; г) для навколишнього

природного середовища;

- бути стабільними при зберіганні і термостабільними в польових умовах.

Під час розробки плану розкладання принад з вакциною необхідно передбачити, щоб усі території, незалежно від їх розміру та форми, рівномірно отримали визначену кількість принад. Тому, для розповсюдження вакцини важливо, щоб:

- усі ареали були оброблені, за винятком населених пунктів і великих водних просторів;
- принади з вакциною розкладені рівномірно в межах визначеної території.

На підставі наукових літературних джерел з досліджуваного питання, досвіду, набутому з кампаній пероральної вакцинації лисиць проти сказу в різних країнах, визначено, що мінімальна щільність принад повинна бути не менше ніж 20 доз/км². У випадку високої щільності популяції лисиць (більше однієї голови на 1000 га угідь), ендемічності сказу за рахунок збереження залишкових вогнищ інфекції в зоні проведення кампаній рекомендується застосування концентрації принад у межах 25–30/км² в поєднанні зі скороченням відстані між лініями польоту.

Дистанція між лініями польоту має велике значення, оскільки:

- лисиці зазвичай досліджують щодня лише 1/3–1/2 своєї території, що створює умови для споживання більшої кількості принад з вакциною нецільовими видами тварин;
- декілька лисиць можуть розділяти один ареал проживання (за високої щільності популяції лисиць);
- у приміських зонах розмір ареалів проживання лисячих родин може становити лише 25 га.

Використовуючи повітряний метод розповсюдження принад, сектори польоту визначають заздалегідь, з огляду на природні або штучні особливості ландшафту. Щоб гарантувати, що більшість лисячих територій отримала необхідну кількість принад, їхнє розповсюдження проходить уздовж паралельних ліній польоту.

Для підготовки польотів потрібні точні карти масштабом 1:250000 і супровід рейсів спеціалістами ветеринарної медицини. Для фіксування точної локалізації розподілу принад використовують прилади з GPS (рис. 4.1). Перед початком роботи виставляють всі необхідні параметри в GPS-системі пристрою для розповсюдження препаратів у твердій дозованій формі «Автовак» (кількість доз, ширина галсів, орієнтовна швидкість літака).



Пристрій для розповсюдження принад з вакциною «Автовак».



Система GPS CDU-4

Рис. 4.1 Пристрій «Автовак» для розповсюдження антирабічної вакцини для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин з системою GPS.

Принади завантажують в «Автовак» та персонал стежить за рівномірною їх подачею в заданому ритмі (відповідно до швидкості переміщення авіасудна відносно землі). «Автовак» обладнано системою GPS CDU-4 (GPS Control Distribution Unit gen.4) з файлами *.txt*, які в подальшому можуть бути використані для оцінки ефективності проведення кампаній з пероральної вакцинації лисиць проти сказу.

Територію області, яка підлягає обробці, поділяють на зони з визначенням ліній польоту авіатранспорту (рис. 4.2).

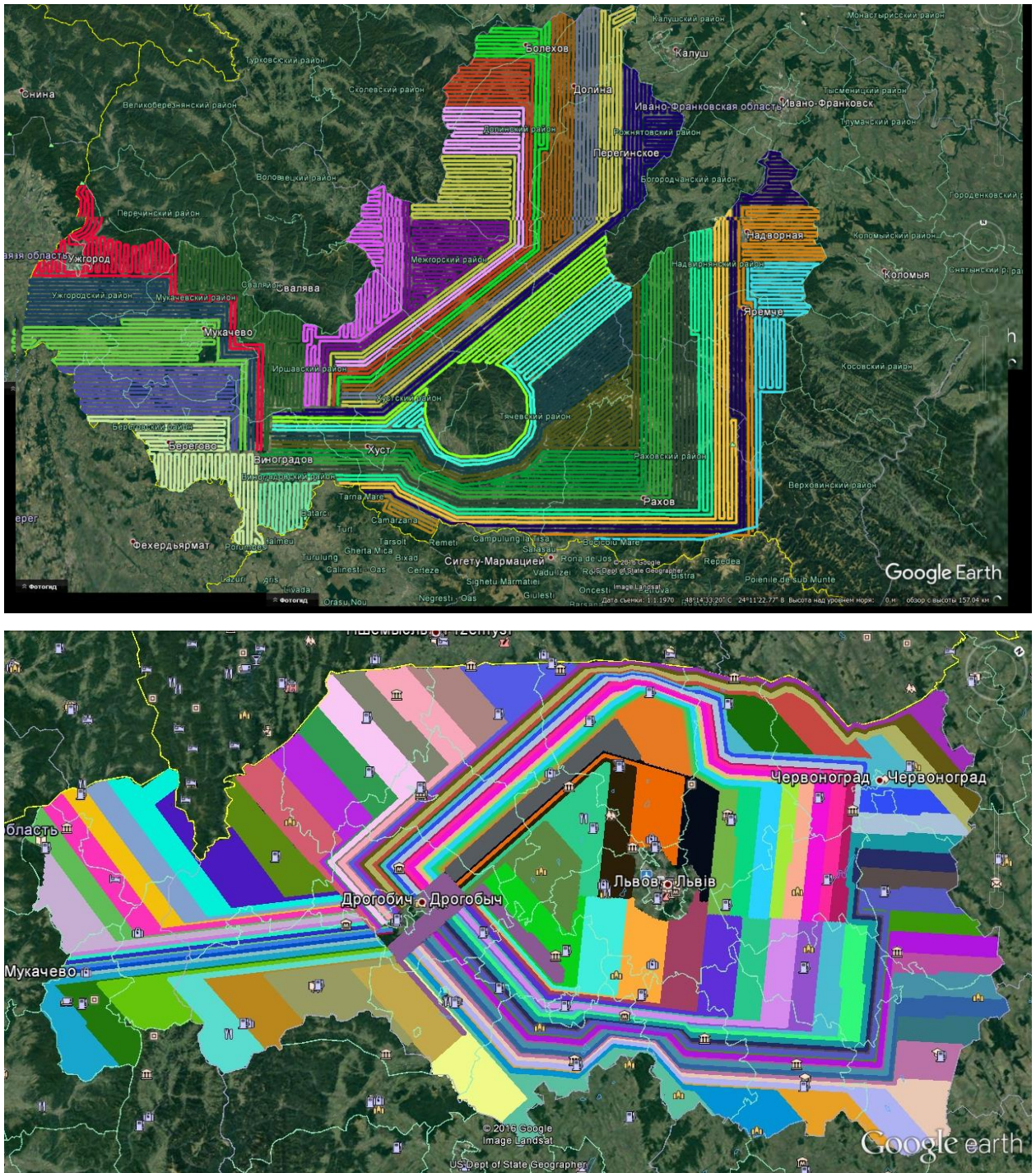


Рис. 4.2 Треки польотів літаків при здійсненні пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в західних областях України, що отримані з пристрою «Автовак» та візуалізовані програмою Google Earth Pro.

З метою забезпечення рівномірності розподілу припадків відстань між лініями польоту повітряного транспорту може становити близько 500 м. Залежно від складності рельєфу місцевості (наприклад, гірські райони),

допускається використання відстані між польотами до 1000 м.

Висота польоту повітряного транспорту залежить від його технічних характеристик, однак не вище 800 м.

Швидкість розкладання принад на пряму залежить від швидкості повітряного транспорту. Щоб правильно розрахувати рівномірність розкладання вакцини з авіа- та автотранспорту, необхідно скористатися формулами розрахунків, а саме:

$$D = A : 3600;$$

$$G = \frac{1000 : D}{B}$$

де, D – швидкість літака, автомобіля, м/с;

A – швидкість літака, автомобіля, м/год;

B – кількість принад, шт.;

G – інтервал випадання принад, с.

Спочатку обчислюють швидкість літака в секунду, а потім циклічність інтервалу випадання принад. За такого режиму їх розповсюдження забезпечується оптимальна відстань між приладами, тобто щільність доз вакцини на 1 км².

Отже, запропоновані методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу» досконально висвітлюють усі компоненти з планування та реалізації кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, визначають принципи застосування пристрою для розповсюдження препаратів у твердій дозованій формі «Автовак» за повітряного розподілу принад з вакциною.

4.3. Аналіз ефективності заходів боротьби зі сказом тварин в Україні

Заходи з боротьби зі сказом тварин в Україні регламентовані Законом України «Про ветеринарну медицину», Інструкцією про заходи щодо боротьби зі сказом тварин, а також щорічними Планами протиепізоотичних заходів з профілактики основних інфекційних та інвазійних хвороб тварин в Україні.

Стратегія боротьби зі сказом в Україні базується на впровадженні комплексу антирабічних ветеринарно-санітарних заходів, направлених на профілактику та ліквідацію сказу серед основних резервуарів даного захворювання і включає в себе: парентеральну і пероральну імунізацію та епізоотичний моніторинг.

Базовим ветеринарно-санітарним заходом направленим на профілактику та ліквідацію сказу є парентеральна імунізація (вакцинація) свійських тварин.

В Україні для парентеральної вакцинації свійських та сільськогосподарських тварин застосовується вакцина антирабічна рідка інактивована для імунізації тварин «RabiStar» та «RabiStar red», закупівля, яких здійснювалась за кошти державного бюджету. Головною перевагою цих вакцин є здатність формувати захисний рівень антитіл до вірусу сказу після одноразового введення.

За результатами проведених планових профілактичних заходів проти сказу у 2018–2020 роках щеплено 17,1 млн. свійських тварин, у тому числі: у 2018 році 5,6 млн., що становить 92,8 % від плану, у 2019 році – 5,8 млн. – 100 % плану та у 2020 році – 5,7 млн. – 100 % плану.

Враховуючи те, що планові показники формуються відповідно до статистичних даних, а також беручи до уваги відсутність ідентифікації свійських тварин, зокрема собак і котів, існує вірогідність неохоплення вакцинацією усього поголів'я, в першу чергу це стосується безпритульних собак та котів.

Постійне неблагополуччя території України щодо сказу тварин вимагає впровадження ефективних протиєпізоотичних заходів, серед яких основне місце відводиться пероральній імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, ефективність якої доведена як в експериментальних, так і в польових умовах.

Ефективність та доцільність впровадження в практику пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в Україні автоматизованої системи запису географічних координат дистрибуції принад з вакциною була врахована

в новій редакції Методичних рекомендацій «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу».

З 2018 року в Україні розпочато проведення широкомасштабних кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу (рис. 4.3). Для цього використовували антирабічні вакцини «Орісвак» та «Броварабіс V-RG» (ТОВ «Укрветпромпостач»).



Рис. 4.3 Територія розповсюдження принад з антирабічною вакциною «Орісвак» з використанням повітряного транспорту в 2018 році.

В 2019 році проведено кампанію з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин на площі 485 630,47 км². В 2020 році проведено кампанію з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин на площі 406 298,74 км², де використано 10 157 470 доз антирабічної вакцини «Орісвак».

Однак, кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в 2018-2020 рр. проводилися лише одноразово в рік (восени – вересень-грудень), хоча оптимальна модель цього протиепізоотичного заходу є дворазова, яку

проводять весною і восени. Така модель пероральної вакцинації диких тварин проти сказу використовувалася в усіх європейських програмах та показала свою ефективність, незалежно від щільності популяції лисиць, та призвела до ерадикації сказу в багатьох країнах.

Контроль ефективності пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу здійснюється завдяки активному спостереженню (моніторингу):

- епізоотологічний нагляд за зоною вакцинації;
- дослідження зубів лисиць на наявність біомаркеру – тетрацикліну;
- оцінка сироваток крові лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу.

4.3.1. Оцінка ефективності різних антирабічних вакцин для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в контрольованому експерименті

Перед широкомасштабним використанням будь-яких вакцин, в тому числі й антирабічних вакцин для пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, необхідною умовою є проведення контрольованих дослідів з визначення ефективності та безпечності.

В Україні біологічною промисловістю (ТОВ «Укрветпромстач») вироблялося дві пероральні антирабічні вакцини проти сказу для диких м'ясоїдних тварин: жива антирабічна вакцина «Орісвак» та рекомбінантна вакцина «Броварабіс V-RG», тому дослідження їхньої антигенної активності в контрольованому експерименті становило для нас науковий інтерес.

Дослідження проведені на чорнобурих лисицях (49 голів, які були розділені на дві групи: I група – 25 голів, II група – 24 голови). Одній групі тварин згодовували по одній дозі вакцини «Орісвак» (I група), іншій – «Броварабіс V-RG» (II група). Через 30 днів проведено відбір крові й отримані сироватки крові. Дослідження антирабічної активності сироваток крові проведені методами ІФА та FAVN-тест.

Дослідженнями встановлено, що впродовж однієї години споживання вакцини становило в I групі – 72%, у II групі – 66,7%. Через 3 години

споживання вакцини в I групі становило 100% (32% блістерів були прокушені, 68% блістер відсутній), у II групі – 100% (29% блістерів були пошкоджені, у 71% блістер відсутній). Отримані результати свідчать про високу привабливість принад антирабічних вакцин як «Орісвак», так і «Броварабіс V-RG», для лисиць. Однак відсутність блістера могла свідчити про його проковтування тваринами без прокусування.

Дослідження сироваток крові методом ІФА показало наступні результати: I група – 24 проби позитивні (титр антитіл до вірусу сказу $\geq 0,5$ МО/см³), одна проба негативна; II група – 18 проб позитивні (титр антитіл до вірусу сказу $\geq 0,5$ МО/см³), 6 проб негативні. Тобто, рівень сероконверсії до вірусу сказу в I групі становив 96%, а в II групі – 75% (табл. 4.1).

Таблиця 4.1

Оптична густина дослідних сироваток крові в ІФА

	1	2	3	4	5	6	7
A	0.224	0.863	0.724	0.724	0.772	0.628	0.674
B	0.198	0.677	0.898	0.898	0.695	0.738	2.198
C	2.491	0.751	0.691	0.691	0.594	0.651	2.458
D	2.543	0.514	0.743	0.543	0.573	0.543	0.563
E	1.258	0.793	0.958	0.558	0.888	0.878	0.878
F	1.789	0.813	0.789	2.716	0.769	0.649	2.789
G	2.358	0.568	0.858	0.958	0.685	2.543	2.358
H	0.618	0.800	0.725	0.674	0.986	0.526	2.620

Примітки: A1, B1 – позитивний контроль; C1, D1 – негативний контроль; E1, F1, G1 – контролю реакції; H1-H7 – дослідні зразки.

Усі 7 проб, в яких не виявлено антитіл до вірусу сказу, були отримані від лисиць, що спожили принаду з вакциною, однак блістер не був виявлений.

Використана для досліджень тест-система BioPro Rabies ELISA AbKit дає можливість встановити результат тільки якісно, тобто наявність антитіл вище

захисного рівня ($\geq 0,5$ МО/см³), або недостатній рівень антирабічних антитіл. Для доскональної індивідуальної оцінки напруженості антирабічного імунітету в чорнобурих лисиць після споживання однієї дози вакцин «Орісвак» та «Броварабіс V-RG» усі позитивні проби (42 сироватки крові) були досліджено методом FAVN-тест (табл. 4.2; табл. 4.3).

Таблиця 4.2

Титри антирабічних антитіл в сироватках крові чорнобурих лисиць після пероральної вакцинації вакциною «Орісвак» в FAVN-тест

Номер сироватки	Титр в МО/см ³	Номер сироватки	Титр в МО/см ³
1	31,55	13	41,59
2	41,59	14	18,15
3	1,15	15	41,59
4	31,55	16	41,59
5	41,59	17	41,59
6	41,59	18	6,01
7	23,93	19	122,74
8	7,92	20	13,77
9	41,59	21	13,77
10	41,59	22	41,59
11	41,59	24	23,93
12	41,59	25	31,55

Встановлено наступні рівні антирабічної активності сироваток крові тварин I групи («Орісвак»): 1,15 МО/см³ – 1 проба; 6,01 МО/см³ – 1 проба; 7,92 МО/см³ – 1 проба; 13,77 МО/см³ – 2 проби; 18,15 МО/см³ – 1 проба; 23,93 МО/см³ – 2 проби; 31,55 МО/см³ – 3 проби; 41,59 МО/см³ – 12 проб; 122,74 МО/см³ – 1 проба.

Таблиця 4.3

Титри антирабічних антитіл в сироватках крові чорнобурих лисиць після пероральної вакцинації вакциною «Броварабіс V-RG» в FAVN-тест

Номер сироватки	Титр в МО/см ³	Номер сироватки	Титр в МО/см ³
26	41,59	35	41,59
27	31,55	36	41,59
28	41,59	37	41,59
29	41,59	38	31,55
30	122,74	39	41,59
31	31,55	41	10,45
32	41,59	42	0,87
33	41,59	45	0,87
34	41,59	46	10,45

Для II групи («Броварабіс V-RG») встановлені в сироватках крові наступні значення антитіл до вірусу сказу: 0,87 МО/см³ – 2 проби; 10,45 МО/см³ – 2 проби; 31,55 МО/см³ – 3 проби; 41,59 МО/см³ – 10 проб; 122,74 МО/см³ – 1 проба.

Отже, за результатами оцінки споживання, обидві вакцини показали високу привабливість для цільових видів тварин (лисиць). Встановлено наявність антитіл до вірусу сказу в 96 % лисиць, яким згодовували вакцину «Орісвак». В 75 % лисиць, яким згодовували вакцину «Броварабіс V-RG», виявлено антитіла, що свідчить про високу антигенну активність обох антирабічних препаратів.

4.3.2. Нагляд за епізоотичною ситуацією зі сказу в зоні проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин

Епізоотичний нагляд за зоною здійснення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу містить дві складові:

- пасивний моніторинг – дослідження методом флуоресціюючих антитіл зразків мозку тварин, що підозрілі в захворюванні;
- активний моніторинг – дослідження зразків мозку лисиць, що були відстріляні в зоні проведення пероральної вакцинації).

Протягом 2018-2021 рр. (тривалість проведення широкомасштабних кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин на усій території України) епізоотична ситуація щодо сказу в Україні була напруженою із коливанням кількості випадків в різних областях (табл. 4.4).

Так, достовірної тенденції до зменшення кількості випадків сказу протягом 2018-2021 рр. відмічено в Дніпропетровській, Житомирській, Запорізькій, Сумській, Харківській, Херсонській та Чернігівській областях. В решті областей України не виявлено чіткої тенденції до зміни напруженості епізоотичної ситуації зі сказу протягом 2018-2021 рр.

Загалом виявлена тенденція до зменшення превалентності сказу тварин в Україні протягом чотирьох років. В 2019 році кількість лабораторно підтверджених випадків сказу була меншою на 479 випадків, або на 25,0 % порівняно з 2018 роком; в 2020 році на 160 випадків менше, або на 11,1 % порівняно з 2019 роком. В 2021 встановлено подальше зниження захворюваності, виявлено на 429 випадків менше порівняно з 2020 роком, або на 33,6 % менше.

Таблиця 4.4

**Результати пасивного і активного моніторингу (лабораторна діагностика)
сказу тварин в Україні в 2018-2021 рр.**

Регіони	Досліджень										
	2018			2019			2020			2021	
	ВСЬОГО	ПОЗИ- ТИВНО		ВСЬОГО	ПОЗИ- ТИВНО		ВСЬОГО	ПОЗИ- ТИВНО		ВСЬОГО	ПОЗИ- ТИВНО
Вінницька	1770	264		1962	346		1696	227		869	107
Волинська	707	23		858	20		416	24		616	26
Дніпропетровська	448	86		1323	26		1359	23		910	22
Донецька	206	59		246	75		476	108		171	56
Житомирська	680	99		968	68		832	52		768	45
Закарпатська	418	21		367	26		357	16		376	15
Запорізька	320	106		687	114		630	48		263	15
Івано-Франківська	764	23		657	20		759	25		655	18
Київська	469	50		737	19		600	114		984	66
Кіровоградська	415	153		886	64		948	82		893	43
Луганська	173	65		472	24		566	35		390	29
Львівська	1084	43		1524	27		1117	15		1178	20
Миколаївська	278	59		778	35		710	44		521	34
Одеська	233	46		752	37		798	46		760	43
Полтавська	933	43		1163	20		991	42		171	21
Рівненська	723	52		707	27		499	17		520	30
Сумська	276	81		706	19		426	11		405	3
Тернопільська	423	54		370	27		332	15		273	32
Харківська	363	109		666	37		442	30		582	26
Херсонська	603	46		922	12		705	15		491	10
Хмельницька	967	213		1296	122		1032	62		1112	89
Черкаська	622	116		1011	231		890	197		561	84
Чернівецька	226	6		341	25		340	10		327	5
Чернігівська	577	89		1604	12		673	4		693	1
м. Київ	182	10		89	4		72	15		78	8
Всього	13860	1916		21092	1437		17666	1277		14567	848

Зменшення кількості випадків сказу на території, на якій проводиться пероральна вакцинація диких м'ясоїдних тварин проти сказу, є одним з критеріїв позитивного впливу цих антирабічних протиепізоотичних заходів, однак потребує додаткових досліджень спалахів сказу серед тварин з використанням інструментів геоінформаційних систем та результатів молекулярно-генетичних характеристик ізолятів вірусу сказу.

4.3.3. Дослідження зубів диких м'ясоїдних тварин на наявність тетрациклінового маркера

Проаналізовано ефективність кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що проводилися в Україні в 2018-2020 рр.

Дослідження з виявлення біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин проводили методом флуоресцентної мікроскопії під люмінісцентним мікроскопом в ультрафіолетовому спектрі. У зрізах зубів позитивних зразків спостерігали свічення ліній тетрацикліну в дентині, цементі та фрагментах кісток навколо зуба (в усіх ділянках одночасно або лише в одній із ділянок). Всього проведено 31001 досліджень, з яких позитивних результатів на наявність біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних – 14646 (табл. 4.5).

Із даних таблиці 4.5, відмічаємо зниження у 2020 р. відсотку позитивних результатів (44,0 %) на 2,7 % відносно 2018 р., а в 2019 р. – найвищий показник наявності біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин (50,1 %) порівняно із 2018 та 2020 рр.

Таблиця 4.5

Результати досліджень наявності тетрациклінового маркера в зубах диких м'ясоїдних тварин в розрізі областей, 2018–2020 рр.

Область	Вік лисиць	2018			2019			2020		
		Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
Вінницька	Лисиця молода 0-1	323	86	26,6	226	74	32,7	59	33	55,9
	Старше 1 року	397	106	26,7	634	230	36,3	425	209	49,2
Волинська	Лисиця молода 0-1	-	-	-	458	39	24,7	-	-	-
	Старше 1 року	-	-	-	532	290	54,5	-	-	-
Донецька	Лисиця молода 0-1	49	32	65,3	35	21	60,0	23	9	39,1
	Старше 1 року	172	117	68,0	193	115	59,6	203	74	36,5
Дніпропетровська	Лисиця молода 0-1	203	138	68,0	220	123	55,9	188	97	51,6
	Старше 1 року	564	404	71,6	840	521	66,8	919	394	42,9
Житомирська	Лисиця молода 0-1	139	64	46,0	83	30	36,1	94	35	37,2
	Старше 1 року	353	121	34,3	422	192	50,5	421	187	44,4
Закарпатська	Лисиця молода 0-1 рік	6	1	16,6	36	16	44,4	29	15	51,7
	старше 1 року	8	6	75,0	257	122	47,5	190	88	46,3
Запорізька	Лисиця молода 0-1	81	56	69,1	88	49	55,7	61	20	32,8
	Старше 1 року	178	131	73,6	250	170	68,0	214	76	35,5
Івано-Франківська	Лисиця молода 0-1	243	62	25,5	88	34	38,6	63	34	54,0
	Старше 1 року	239	62	25,9	418	183	43,8	344	157	45,6
Київська	Лисиця молода 0-1	107	31	29,0	73	35	48,0	112	66	58,9
	Старше 1 року	171	28	16,4	349	164	47,0	322	133	41,3
Кіровоградська	Лисиця молода 0-1	76	43	56,6	259	144	55,6	100	61	61,0
	Старше 1 року	208	91	43,8	595	363	61,0	594	228	38,4
Луганська	Лисиця молода 0-1	39	17	43,6	101	49	48,5	128	41	32,0
	Старше 1 року	195	110	56,4	370	246	66,5	273	78	28,6
Львівська	Лисиця молода 0-1 рік	94	22	23,4	134	49	36,6	-	-	-
	Старше 1 року	262	112	42,7	521	269	51,6	-	-	-
Миколаївська	Лисиця молода 0-1	13	7	53,8	130	76	58,5	96	58	60,4
	Старше 1 року	68	47	69,1	345	188	54,5	360	137	38,0
Одеська	Лисиця молода 0-1	24	12	50,0	137	68	49,6	102	61	59,8
	Старше 1 року	38	30	78,9	356	177	49,8	530	260	49,1

Полтавська	Лисиця молода 0-1	114	31	27,2	144	45	31,2	121	64	52,9
	Старше 1 року	294	87	29,6	664	237	35,7	552	216	39,1
Рівненська	Лисиця молода 0-1	154	62	40,3	68	21	30,9	26	11	42,3
	Старше 1 року	258	70	27,1	244	83	34,0	241	94	39,0
Сумська	Лисиця молода 0-1	80	54	67,5	118	72	61,0	44	25	56,8
	Старше 1 року	321	258	80,4	476	350	73,5	311	149	47,9
Тернопільська	Лисиця молода 0-1	79	25	31,6	45	18	40,0	45	14	31,1
	Старше 1 року	155	31	20,0	221	135	61,1	199	83	41,7
Харківська	Лисиця молода 0-1	37	15	40,5	85	36	42,4	100	44	44,0
	Старше 1 року	160	58	36,3	274	162	59,1	303	107	35,3
Херсонська	Лисиця молода 0-1	55	34	61,8	122	76	62,3	119	67	56,3
	Старше 1 року	244	168	68,9	300	207	69,0	384	191	49,7
Хмельницька	Лисиця молода 0-1	250	70	28,0	180	72	40,0	108	62	57,4
	Старше 1 року	355	122	34,4	520	235	45,2	616	277	45,0
Черкаська	Лисиця молода 0-1	104	75	72,1	65	41	63,1	46	21	45,7
	Старше 1 року	156	92	59,0	231	162	70,1	246	67	27,2
Чернівецька	Лисиця молода 0-1	55	15	27,3	34	4	10,5	33	19	57,6
	Старше 1 року	87	16	18,4	190	58	30,5	176	72	40,9
Чернігівська	Лисиця молода 0-1	109	74	67,9	323	143	44,3	80	44	55,0
	Старше 1 року	358	289	80,7	724	409	56,5	548	283	51,6
Всього:		7675	3582	46,7	13178	6603	50,1	10148	4461	44,0

Для досліджень на наявність тетрациклінового маркеру в зубах лисиць після кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що була проведена в 2021 році, надіслано 10925 зразків щелеп, з яких позитивними було виявлено 5466 зразків, що становило 50,0 %.

4.3.4. Дослідження сироваток крові диких м'ясоїдних тварин на наявність антитіл до вірусу сказу

Проведено серологічні дослідження ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що проводилися в Україні в 2018-2020 рр. Окремо здійснено серологічну оцінку кампанії, що була проведена в 2021 році, так як в зв'язку із військовими діями, що розпочалися в 2022 році отримати, доставити і дослідити зразки в повній мірі не вдалося.

Одним з ключових етапів оцінки ефективності пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу є визначення напруженості антирабічного імунітету. Результати досліджень антирабічної активності сироваток крові диких м'ясоїдних тварин після трьох кампаній пероральної вакцинації представлені в табл. 4.6-4.8.

Протягом трьох років (2018-2020 рр.) було лабораторно досліджено 23190 сироваток крові диких м'ясоїдних тварин на наявність антитіл до вірусу сказу. Однак, здійснена оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу на території України показала неоднозначні результати. Так, в 2018 році було виявлено 37,7 % позитивних тварин за серологічними дослідженнями. Однак, в 2019 і 2020 роках відсоток позитивних сироваток крові був нижчий: 24,3 % та 18,6 % відповідно. Поясненням цієї ситуації може бути певна відмінність в інтерпретації результатів антирабічної активності сироваток крові лисиць при використанні тест-систем BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad, що виникла в 2018 році в різних лабораторіях, та, на нашу думку, призвела до завищених результатів в оцінці антирабічної активності сироваток крові лисиць в певних (східних і центральних) областях в 2018 р.

Таблиця 4.6

Антирабічний імунітет у диких м'ясоїдних тварин після кампанії з пероральної вакцинації 2018 р.

Область	Сироватки крові диких м'ясоїдних тварин		
	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
Вінницька	680	133	19,3
Волинська	-	-	-
Дніпропетровська	490	270	55,1
Донецька	214	96	44,8
Житомирська	380	126	33,1
Закарпатська	12	2	40,0
Запорізька	245	132	53,8
Івано-Франківська	443	162	36,6
Київська	56	12	21,4
Кіровоградська	286	121	42,3
Луганська	235	105	44,6
Львівська	248	109	21,5
Миколаївська	81	43	53,1
Одеська	63	29	46,0
Полтавська	380	88	23,2
Рівненська	187	40	21,4
Сумська	88	50	56,8
Тернопільська	70	19	27,1
Харківська	198	79	39,8
Херсонська	278	142	51,1
Хмельницька	350	97	27,7
Черкаська	228	69	30,2
Чернівецька	101	24	23,7
Чернігівська	214	133	62,2
Всього	5527	2081	37,7

Враховуючи це, були проведені порівняльні дослідження з характеристики порогових (граничних) позитивних значень титрів антитіл до вірусу сказу, що характеризують сероконверсію, за використання різних діагностичних тест-систем методом ІФА.

Таблиця 4.7

**Антирабічний імунітет у диких м'ясоїдних тварин після кампанії з
пероральної вакцинації 2019 р.**

Область	Сироватки крові диких м'ясоїдних тварин		
	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
Вінницька	860	49	5,7
Волинська	400	77	19,2
Дніпропетровська	204	77	37,7
Донецька	233	53	22,7
Житомирська	334	83	24,9
Закарпатська	22	5	22,7
Запорізька	347	126	36,3
Івано-Франківська	474	97	20,5
Київська	113	27	23,8
Кіровоградська	301	98	32,5
Луганська	309	73	23,6
Львівська	531	114	25,2
Миколаївська	481	66	13,7
Одеська	406	156	38,4
Полтавська	602	112	18,6
Рівненська	242	65	26,8
Сумська	200	95	47,5
Тернопільська	137	28	20,5
Харківська	364	118	32,4
Херсонська	387	117	30,2
Хмельницька	648	149	23,0
Черкаська	198	44	22,2
Чернівецька	193	20	10,3
Чернігівська	918	320	34,8
Всього	8904	2169	24,3

Таблиця 4.8

Антирабічний імунітет у диких м'ясоїдних тварин після кампанії з пероральної вакцинації 2020 р.

Область	Сироватки крові диких м'ясоїдних тварин		
	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
Вінницька	490	55	11,2
Волинська	-	-	-
Дніпропетровська	595	114	28,4
Донецька	226	22	9,7
Житомирська	268	91	34,0
Закарпатська	60	13	21,7
Запорізька	269	80	30,0
Івано-Франківська	407	51	12,5
Київська	257	16	6,2
Кіровоградська	678	153	22,6
Луганська	401	41	10,2
Львівська	-	-	-
Миколаївська	456	21	4,6
Одеська	658	153	23,1
Полтавська	670	177	26,4
Рівненська	206	44	21,4
Сумська	327	96	29,4
Тернопільська	155	7	4,5
Харківська	410	58	14,2
Херсонська	425	155	36,5
Хмельницька	799	66	8,3
Черкаська	143	14	9,8
Чернівецька	209	39	18,6
Чернігівська	650	166	25,5
Всього	8759	1632	18,6

Протокол постановки ELISA для визначення антирабічного імунітету з використанням комерційних тест-систем різних виробників має свої особливості та відмінності, що передбачено в настанові по застосуванню. Однак, відмінності в інтерпретації отриманих результатів можуть призвести до завищення, або заниження показників ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу (рис. 4.4).

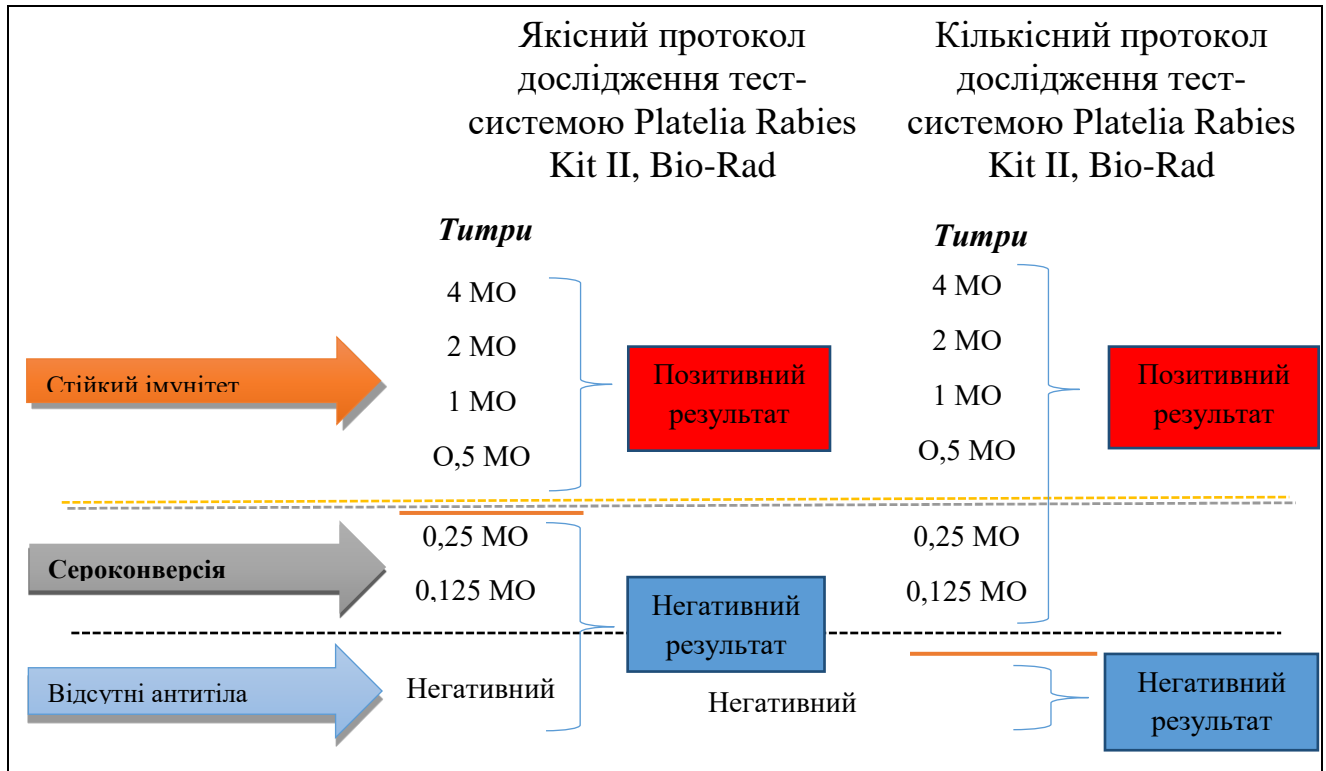


Рис. 4.4 Інтерпретація результатів досліджень сироваток крові від диких м'ясоїдних тварин після пероральної вакцинації проти сказу із застосуванням тест-набору Platelia Rabies II Kit (BIO-RAD).

Для дослідження використовували зразки сироваток крові лисиць. Проби надійшли до ДНДІЛДВСЕ для контролю ефективності пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Дослідження проведені з використанням наборів BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad.

У результаті досліджень тест-системою BioPro Rabies Elisa Ab було відібрано сироватки крові ($n=80$) у межах визначених порогових значень (після трьох повторів досліджень): $\geq 70\%$ блокування – 30 проб; від 40 до 70 % блокування – 35 зразків; $< 40\%$ (негативні сироватки крові з відхиленням відсотку блокування не більше 5 %) – 15 проб сироваток крові (табл. 4.9).

Тобто, згідно з настановою по застосуванні тест-системи, нами обрано 65 сироваток крові з титрами антитіл до вірусу сказу вище $0,5 \text{ MO}/\text{см}^3$, а 15 сироваток – з титрами антирабічних антитіл нижче $\text{MO}/\text{см}^3$.

Таблиця 4.9

Значення оптичної щільності та титрів антитіл за застосування для дослідження двох тест-систем для визначення антитіл до вірусу сказу методом ІФА

Тест-система BioPro				Тест-система BioRad		
Контрольні показники реакції, ОЩ	Вихідні показники дослідних зразків, ОЩ	Контрольні показники реакції, ОЩ	Вихідні показники дослідних зразків, ОЩ	Контрольні показники реакції, ОЩ	Вихідні показники дослідних зразків, ОЩ	Титри антитіл МО/см ³
Поз. 0,086	0,326	Поз. 0,096	0,289	Neg.: 0,012-0,013 0,5 МО/см ³ : 0,799-0,763. 4,0 МО/см ³ : 1,953-2,148. 2,0 МО/см ³ : 1,292-1,417.	0,563	0,4
Нег. 1,352	0,706	Нег. 1,312	0,937		0,100	0
40%=0,846	0,685	40%=0,826	0,975		0,100	0
70%=0,466	0,360	70%=0,461	0,323		0,505	0,4
	0,735		0,704		0,084	0
	0,871		0,879		0,013	0
	0,590		0,580		0,128	0
	0,837		0,969		0,034	0
	0,843		0,95		0,057	0
	0,553		0,523		0,291	0,3
	0,845		0,911		0,021	0
	0,353		0,434		0,673	0,5

Порівняльні дослідження сироваток крові, що були проведені тест-системою Platelia Rabies II BioRad, показало дещо відмінні результати. Для сироваток крові з відсотком блокування $\geq 70\%$: відповідний результат (дорівнювали чи були вище титру 0,50 МО/см³) – 93 % зразків (28 з 30 проб), сероконверсія від 0,125 до 0,50 МО/см³ склала 6,7 % (2 з 30 зразків). У сироватках крові з порогом блокування від 40 до 70 %: 6 негативних (17,1 %), 9 зразків з сероконверсією в межах 0,125-0,50 МО/см³ (25,7 %) та 20 з титрами $\geq 0,50$ МО/см³ (57,2 %). У сироватках крові з відсотком блокування $< 40\%$,

негативними були 9 зразків (60 %), однак виявлено сероконверсію в межах 0,125-0,50 МО/см³ у 6 пробах (40 %).

Отже, оцінкою антирабічної активності сироваток крові наборами BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad встановлено, що визначені виробниками порогові значення сероконверсії тотожні. Дослідження 80 проб сироваток крові показало 100 % відповідності у ранжуванні сироваток крові на позитивні (є сероконверсія) та негативні. Виявленні відмінності в групах сироваток крові можна пояснити низькою якістю сироваток крові, що можуть вплинути на результат досліджень.

Отримані нами результати свідчать, що обидві діагностичні тест-системи є цінним інструментом для діагностики антитіл до вірусу сказу у диких м'ясоїдних тварин, але їхнє поєднання дає змогу отримати розширенні результати.

Наступним етапом було проведення серологічної оцінки ефективності кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що була проведена восени 2021. Загалом було досліджено методом ІФА 9124 сироватки крові лисиць. 8141 сироватка крові із територій, на яких дистрибуція принад з вакциною здійснювалася з використання повітряного транспорту (табл. 4.10) та 983 сироватки крові із території з особливим режимом польотів (зона NOTAM), де дистрибуція принад з вакциною здійснювалася за допомогою автомобільного транспорту (табл. 4.11).

Таблиця 4.10

Результати досліджень сироваток крові від диких м'ясоїдних після пероральної вакцинації проти сказу в 2021 р.

Область	Кількість сироваток крові	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
Вінницька	452	14	3,1
Волинська	298	136	45,6
Дніпропетровська	424	133	31,4
Житомирська	358	39	10,8
Закарпатська	75	0	0,0
Запорізька	127	11	8,7
Івано-Франківська	449	30	6,7
Київська	269	23	8,6
Кіровоградська	717	97	13,5
Львівська	654	97	14,8
Полтавська	670	74	11,0
Миколаївська	469	8	1,7
Одеська	357	57	16,0
Рівненська	226	23	10,0
Сумська	239	69	28,9
Тернопільська	114	9	7,9
Харківська	119	34	28,6
Херсонська	271	57	21,0
Хмельницька	761	73	9,6
Черкаська	248	34	13,7
Чернівецька	200	2	1,0
Чернігівська	644	208	32,2
Всього	8141	1228	15,1

Таблиця 4.11

Результати досліджень сироваток крові від диких м'ясоїдних після пероральної вакцинації проти сказу в зоні NOTAM в 2021 р.

Область	Кількість досліджень	Кількість позитивних результатів	% позитивних результатів
1	2	3	$4 = (3/2) \times 100$
Дніпропетровська	120	24	20,0
Донецька	226	36	16,0
Запорізька	116	15	13,0
Луганська	400	44	11,0
Харківська	121	33	27,3
Всього	983	152	15,5

Здійснена серологічна оцінка ефективності кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що була проведена в 2021 році знову ж продемонструвала зменшення відсотку позитивних проб: 15,1 % для проб із територій, на яких дистрибуція принад з вакциною здійснювалася з використання повітряного транспорту, та 15,5 % для сироваток крові, що отримані від тварин, де дистрибуція принад з вакциною здійснювалася з використання наземного транспорту. Загальний відсоток позитивних проб сироваток крові становив 15,1 %.

Оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу шляхом дослідження сироваток крові лисиць в багатьох європейських країнах в 2019 році (вибрано довільно для порівняльного аналізу) показала відсоток позитивних проб в межах 15-53 % (рис. 4.5).

Однак, враховуючи те, що кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу в Україні протягом 2018-2021 рр. були проведені тільки один раз в рік, то, на нашу думку, отриманий відсоток позитивних до вірусу сказу сироваток крові лисиць на рівні 15,1-24,3 % є цілком очікуваним та прогнозованим результатом.

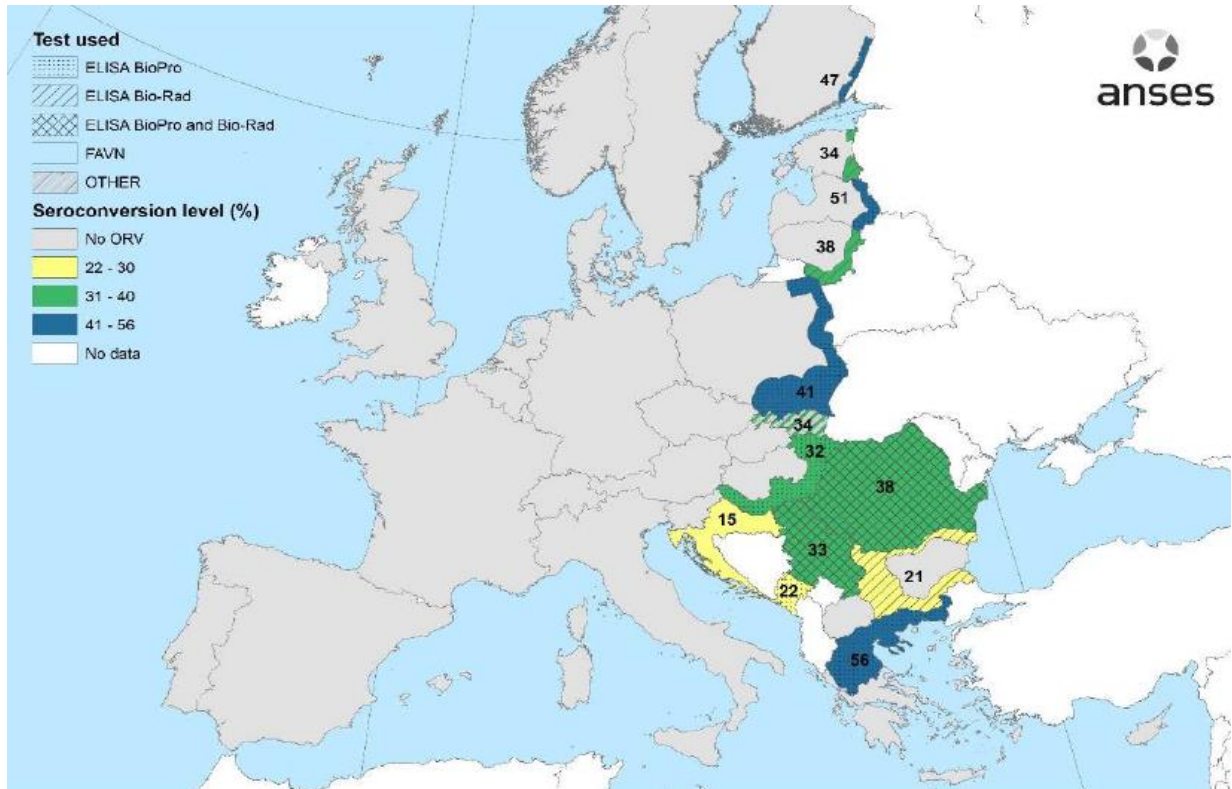


Рис. 4.5 Зони проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу та результати серологічної оцінки ефективності кампаній з пероральної вакцинації в країнах ЄС в 2019 році.

Отже, здійснена оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в 2018-2021 рр. виявила ефективність цього заходу, однак для досягнення належного результату, який забезпечить переривання епізоотичного ланцюга за рахунок формування необхідного антирабічного популяційного імунітету (не менше 50 %), необхідним є проведення кампаній двічі на рік – весною та восени, що зафіксовано в розроблених нами методичних рекомендаціях «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу».

Результати розділу 4 висвітлені в наукових працях [53, 59, 61, 337, 7, 14, 357].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

У розділі 4 висвітлено методичні особливості проведення профілактичних протиепізоотичних антирабічних заходів в Україні із аналізом ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних, свійських і сільськогосподарських тварин, оцінки ефективності проведених антирабічних заходів і рекомендаціями щодо управління виявленими ризиками в межах діючої системи профілактики та боротьби зі сказом тварин.

З метою удосконалення проведення кампаній пероральної вакцинації лисиць проти сказу були розроблені методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу». Рекомендації враховували положення відповідного керівництва ЄС, а також сучасні аспекти здійснення повітряного розподілу принад з вакциною і методику фіксування точної локалізації приладами з GPS (Глобальна Система Позиціонування), що підвищить ефективність пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

В розроблених методичних рекомендаціях враховані вимоги до антирабічних вакцин, що призначені для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, вимоги до планування та реалізації цього заходу, а також до контролю ефективності.

Запропоновані методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу» досконально висвітлюють усі компоненти з планування та реалізації кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, визначають принципи застосування пристрою для розповсюдження препаратів у твердій дозованій формі «Автовак» за повітряного розподілу принад з вакциною.

Були проведені дослідження з оцінки ефективності різних антирабічних вакцин для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин в контрольованому експерименті, що є також вимогою, що передбачено методичними рекомендаціями.

За результатами оцінки споживання, обидві дослідні вакцини («Орісвак» та «Броварабіс V-RG») показали високу привабливість для цільових видів тварин (лисиць). Встановлено наявність антитіл до вірусу сказу в 96 % лисиць, яким згодовували вакцину «Орісвак». В 75 % лисиць, яким згодовували вакцину «Броварабіс V-RG», виявлено антитіла, що свідчить про високу антигенну активність обох антирабічних препаратів.

Відповідно до критеріїв, що визначені методичними рекомендаціями, в Україні в 2018-2021 рр. були проведені широкомасштабні кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Тому, нами проведено контроль ефективності цих кампаній за трьома визначеними складовими:

- нагляд за епізоотичною ситуацією зі сказу в зоні проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин;
- дослідження зубів диких м'ясоїдних тварин на наявність тетрациклінового маркеру;
- дослідження сироваток крові диких м'ясоїдних тварин на наявність антитіл до вірусу сказу.

Нагляд за напруженістю епізоотичної ситуації зі сказу виявив тенденцію до зменшення превалентності сказу тварин в Україні. В 2019 році кількість лабораторно підтверджених випадків сказу була меншою на 479 випадків, або на 25,0 % порівняно з 2018 роком; в 2020 році на 160 випадків менше, або на 11,1 % порівняно з 2019 роком. В 2021 встановлено подальше зниження захворюваності, виявлено на 429 випадків менше порівняно з 2020 роком, або на 33,6 % менше.

Зменшення кількості випадків сказу на території, на якій проводиться пероральна вакцинація диких м'ясоїдних тварин проти сказу, є одним з критеріїв позитивного впливу цих антирабічних протиєпізоотичних заходів.

Дослідження з виявлення біомаркеру тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин проводили методом флуоресцентної мікроскопії. Всього проведено 31001 досліджень, з яких позитивних результатів на наявність біомаркеру тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних – 14646. Найвищий

показник наявності біомаркеру тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин (50,1 %) був виявлений в 2019 році.

Здійснена оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу на території України показала неоднозначні результати. Так, в 2018 році було виявлено 37,7 % позитивних тварин за серологічними дослідженнями. Однак, в 2019 і 2020 роках відсоток позитивних сироваток крові був нижчий: 24,3 % та 18,6 % відповідно. Поясненням цієї ситуації може бути певна відмінність в інтерпретації результатів антирабічної активності сироваток крові лисиць при використанні тест-систем BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad, що виникла в 2018 році в різних лабораторіях, та, на нашу думку, призвела до завищених результатів в оцінці антирабічної активності сироваток крові лисиць в певних (східних і центральних) областях в 2018 р.

Здійснена серологічна оцінка ефективності кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що була проведена в 2021 році знову ж продемонструвала зменшення відсотку позитивних проб: 15,1 % для проб із територій, на яких дистрибуція принад з вакциною здійснювалася з використання повітряного транспорту, та 15,5 % для сироваток крові, що отримані від тварин, де дистрибуція принад з вакциною здійснювалася з використання наземного транспорту. Загальний відсоток позитивних проб сироваток крові становив 15,1 %.

Враховуючи високі значення позитивних сироваток крові за результатами проведення кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що була проведена в 2018 році, були здійснені порівняльні дослідження з характеристики порогових (граничних) позитивних значень титрів антитіл до вірусу сказу, що характеризують сероконверсію, за використання різних діагностичних тест-систем методом ІФА.

Оцінкою антирабічної активності сироваток крові наборами BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad встановлено, що визначені виробниками порогові значення сероконверсії тотожні. Дослідження 80 проб сироваток крові

показало 100 % відповідності у ранжуванні сироваток крові на позитивні (є сероконверсія) та негативні. Виявленні відмінності в групах сироваток крові можна пояснити низькою якістю сироваток крові, що можуть вплинути на результат досліджень.

Отримані нами результати свідчать, що обидві діагностичні тест-системи є цінним інструментом для діагностики антитіл до вірусу сказу у диких м'ясоїдних тварин, що забезпечує достовірний серологічний контроль ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

Порівняльний аналіз оцінки серологічної ефективності кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що проводяться на території країн ЄС, показав відсоток позитивних проб в межах 15-53 %. Враховуючи те, що кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу в Україні протягом 2018-2021 рр. були проведені тільки один раз в рік, то, на нашу думку, отриманий відсоток позитивних до вірусу сказу сироваток крові лисиць на рівні 15,1-24,3 % є цілком очікуваним та прогнозованим результатом.

Отже, здійснена оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в 2018-2021 рр. виявила ефективність цього заходу, однак для досягнення належного результату, який забезпечить переривання епізоотичного ланцюга за рахунок формування необхідного антирабічного популяційного імунітету (не менше 50 %), необхідним є проведення кампаній двічі на рік – весною та восени.

РОЗДІЛ 5. ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ

5.1. Отримання антигену вірусу сказу

Враховуючи те, що отримання, очистка, інактивація та оцінка біологічних характеристик отриманого антигену є початковою ланкою за гіперімунізації тварин, цей етап став першим у серії наших експериментів, кінцевою метою яких була розробка технологічного регламенту з виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу». Проведення цих досліджень передбачає певні етапи, а саме: отримання культурального вірусу сказу, його очистка, концентрування, інактивація та перевірка імуногенної активності.

Отримання культуральної вірусомісної рідини.

В якості антигену вірусу сказу нами був обраний для культивування вакцинний штам вірусу сказу Щолково-51 К. Обґрунтуванням його використання є те, що вакцинний штам Щолково-51 К розмножується у перещеплюваній лінії культури клітин ВНК-21/13, яка володіє відносною невибагливістю до умов культивування та забезпечує репродукцію вірусу в високих інфекційних титрах. Цей штам вірусу сказу є похідним штаму PV, відноситься до I генотипу ліссавірусів, стабільно зберігає свої антигенні, імуногенні та генетичні властивості.

Оскільки штам Щолково-51 К зберігався в ліофілізованому стані протягом тривалого часу, важливе значення має його періодичне поновлення та перевірка інфекційної активності з використанням чутливої лабораторної моделі.

Поновлення штаму проводили шляхом пасажування в стаціонарному моношарі культури перещеплюваних клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10) з наступною перевіркою інфекційної активності на білих мишах.

З цією метою проводили відновлення ліофілізованого вірусу ФСБ до попереднього об'єму. Зараження культури клітин вірусом сказу проводили через 24 години після посіву культури (за умови сформованого моношару), попередньо видаливши ростове середовище. Після адсорбції вірусу протягом 60

хв у культуральні матраси вносили підтримуюче середовище та продовжували культивування за температури $37\pm 0,5$ °C, 5 % CO₂, 95 % вологості.

Культуральний матеріал відбирали на 5-ту добу культивування, матраси піддавали двократному заморожуванню-відтаюванню, та відбирали проби культуральної вірусомісної суспензії для перевірки бактеріальної та грибової контамінації, а також для визначення титру інфекційної активності.

Таким чином було проведено 6 пасажів вірусу сказу, штаму Щолково-51 К, в культурі клітин ВНК-21/13, щоразу визначаючи інфекційну активність. Результати дослідження відображені на рис. 5.1.

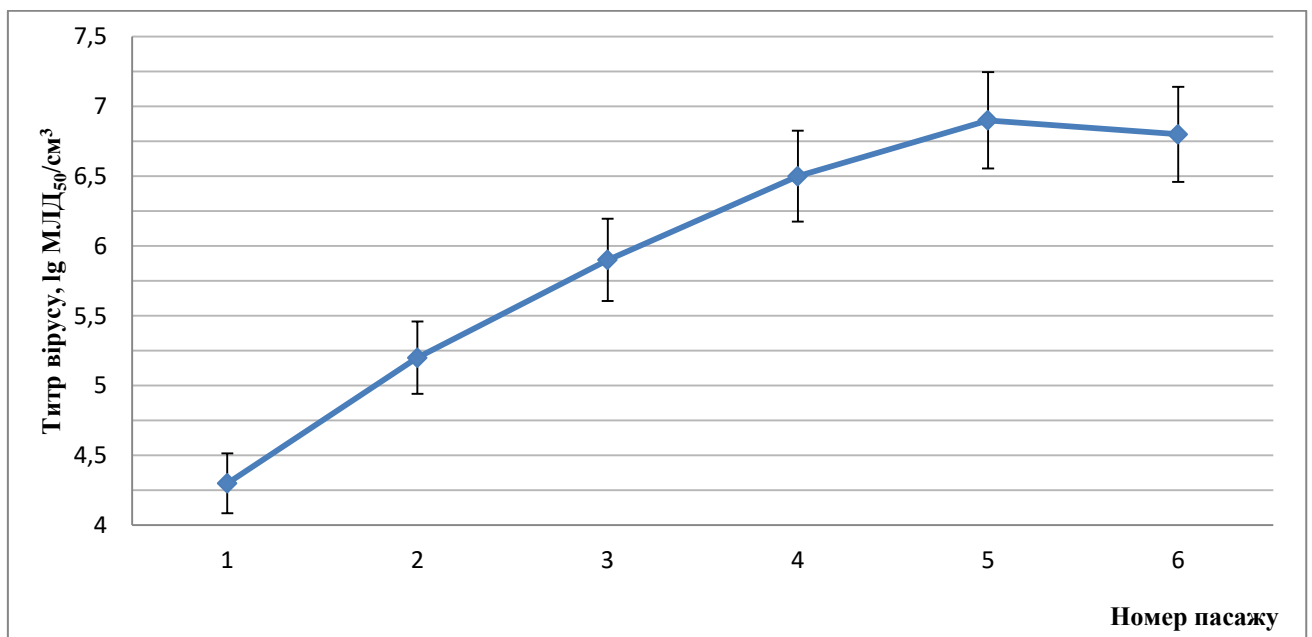


Рис. 5.1 Інфекційна активність вірусу сказу штаму Щолково-51 К в культурі клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10) протягом шести пасажів.

Визначення інфекційної активності штаму Щолково-51 К на рівні першого пасажу в культурі клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10), показало титр вірусу $4,3\pm 0,2$ lg МЛД₅₀/см³, що є на $2,2$ lgМЛД₅₀/см³ нижчим за значення інфекційної активності, яке було визначено перед закладанням на зберігання ($6,5\pm 0,2$ lgМЛД₅₀/см³). Поясненням різниці інфекційної активності між вихідним титром та визначеним після першого пасажу в культурі клітин, може бути тривале зберігання ліофілізованого вірусу, а також недостатній кріо- та

ксеропротекторний рівень середовища, яке використовувалось для сублімаційного висушування.

Далі продовжене пасажування вірусу сказу штаму Щолково-51 К із контролем активності кожного пасажу. В результаті, як видно з рис. 5.1, отримали поступове підвищення титру вірусу сказу: на рівні другого пасажу титр становив $5,2 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а третього – $5,9 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Починаючи з четвертого пасажу отримали сталі результати титру інфекційної активності вірусу сказу штаму Щолково-51 К – $6,5\text{--}6,8 \pm 0,2 \lg \text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$. Для подальших досліджень використовували вірусомісну рідину, яку отримали в п'ятому і шостому пасажах.

Концентрування і очистка антигену вірусу сказу.

В результаті репродукції вірусу сказу штаму Щолково-51 К в культурі клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10), отримана вірусомісна суспензія із баластними білками самої культури клітин та залишками білків фетальної сироватки крові ВРХ, що додавалася до культурального середовища, кількість яких впливає на якість кінцевого препарату. Оскільки застосування антигену з такого матеріалу може призвести до виникнення алергічних реакцій у тварин-продуцентів і до синтезу неспецифічних антитіл на сторонні білки, доцільно проводити очистку культурального антигенного препарату від домішок.

На підставі вивчених умов вирощування та отримання вірусу сказу з високою інфекційною активністю, підбирали умови його очищення і концентрування. Для цього проводили центрифугування вірусомісної рідини впродовж 30 хвилин за 3000 об/хв, надосадову рідину відбирали (елюат 1), а осад ресуспендували в мінімальному об'ємі ФСБ і піддавали заморожуванню-відтаюванню для остаточного вивільнення внутрішньоклітинного вірусу. Повторне центрифугування осаду проводили в аналогічному режимі.

Далі, отриману в результаті центрифугування надосадову рідину, змішували з елюатом 1 і проводили визначення інфекційної активності шляхом титрування на білих мишах та вмісту загального білку за методом Лоурі. Титр вірусу сказу після центрифугування був у межах вихідних значень – $6,9 \pm 0,2$

$\lg\text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$. Вміст білку в вірусовмісному матеріалі до центрифугування був на рівні $4,17\pm 0,3$ г/100 см^3 , а після очищення рівень загального білку вірусовмісної суспензії зменшився до $1,78\pm 0,2$ г/100 см^3 . Тобто, після центрифугування рівень загального білку в культуральній вірусовмісній суспензії зменшився на 57,3 % за рахунок видалення тканинного детриту, що не вплинуло на рівень інфекційної активності.

Наступним етапом досліджень було здійснення концентрування вірусного антигену. Для цього до вірусовмісної суспензії додавали ПЕГ з молекулярною масою 6000 до 1, 2, 4, 6, 8-и % в кінцевій концентрації, інкубували за температури 4 ± 2 °С впродовж 24 годин із наступним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Після цього відбирали осад, проводили його ресуспендування 0,02 М ФСБ (рН 7,2 – 7,4) та оцінку інфекційної активності шляхом титрування на білих мишах. Результати представлені в табл. 5.1.

Як видно з результатів наведених в табл. 5.1, оптимальним для концентрування культуральної вірусовмісної суспензії вірусу сказу штаму Щолково-51 К є застосування 6 % ПЕГ-6000 в поєднанні з низькошвидкісним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Використання цього режиму дало змогу отримати вірусовмісну суспензію із інфекційною активністю $7,49\pm 0,2$ \lg $\text{МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

Таблиця 5.1

Концентрування антигену вірусу сказу

Вірусомісний матеріал	Сконцентровано за загальним об'ємом, разів	Титр вірусу, lg МЛД ₅₀ /см ³
ВС + 1 % ПЕГ-6000	4,0	7,02±0,2*
ВС + 2 % ПЕГ-6000	4,4	6,99±0,2*
ВС + 4 % ПЕГ-6000	5,0	7,19±0,2
ВС + 6 % ПЕГ-6000	6,2	7,49±0,2**
ВС + 8 % ПЕГ-6000	6,4	7,42±0,2**
Не концентрована вірусомісна суспензія	-	6,85±0,2

Примітки: ВС – вірус сказу; * - різниця достовірна відносно титру штаму Щолково-51 К концентрованого 6 % ПЕГ-6000 при $p \leq 0,05$; ** - різниця достовірна відносно титру неконцентрованої суспензії штаму Щолково-51 К при $p \leq 0,05$.

Наступним дослідом було дослідження впливу тривалості осадження за природної седиментації протягом 48 і 72 годин порівняно із інкубацією впродовж 24 годин із наступним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Аналогічно попереднім дослідом проводили відбір осаду, його ресуспензування ФСБ та оцінку інфекційної активності шляхом титрування на білих мишах (табл. 5.2).

В результаті дослідження впливу експозиції 6% ПЕГ-6000 на концентрування вірусу сказу Щолково-51 К, з'ясували, що за експозиції 48 та 72 год титр вірусу становив 6,89-6,96 lg МЛД₅₀/см³, що є достовірно нижчим показником ніж титр вірусу сказу штаму з 6 % ПЕГ-6000 після інкубації впродовж 24 год та центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв.

Таблиця 5.2

Перевірка інфекційної активності вихідного вірусомісного матеріалу та концентрованого ПЕГ-6000 за різного часу експозиції

Досліджуваний біологічний матеріал	Сконцентровано за загальним об'ємом, разів	Титр вірусу, lgМЛД ₅₀ /см ³
ВС + 6% ПЕГ-6000 (24 год) + центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв	6,2	7,49±0,2*
ВС + 6% ПЕГ-6000 (48 год)	2,8	6,89±0,2**
ВС + 6% ПЕГ-6000 (72 год)	3,8	6,96±0,2**
Вихідна вірусомісна суспензія	-	6,76±0,2

Примітки: ВС – вірус сказу; * - різниця достовірна відносно титру неконцентрованої суспензії штаму Щолково-51 К при $p \leq 0,05$; ** - різниця достовірна відносно титру суспензії штаму Щолково-51 К концентрованої 6 % ПЕГ-6000 з низькошвидкісним центрифугуванням при $p \leq 0,05$.

Оскільки, найвищу інфекційну активність містила проба культуральної суспензії концентрована ПЕГ-6000 до 6 % в кінцевій концентрації після низькошвидкісного центрифугування протягом 20 хвилин при 3000 об/хв, то подальшу роботу проводили саме з цим зразком.

Інактивація вірусу сказу.

Для інактивації отриманої нами концентрованої очищеної культуральної суспензії вірусу сказу штаму Щолково-51 К ми застосовували β-пропіолактон, оскільки він є рекомендованим ВООЗ як стандартний інактивуючий агент за виробництва антирабічних вакцин [359, 360].

β-пропіолактон (результат взаємодії формальдегіду (CH₂O) з кетеном (CH₂=C=O)) широко застосовують в якості інактиванту вірусів для виготовлення вакцин. Реагент є нестійким у водних розчинах і легко гідролізується з утворенням нешкідливих речовин: гідроакрилової і β-оксипропіонової кислот. Однак, інактивація вірусу β-пропіолактоном залежить

від його концентрації, температури взаємодії та концентрації білку у вірусомісній суспензії.

Для дослідження використовували β -пропіолактон виробництва Serva (Німеччина) із ступенем очистки 98,5 %, який застосовували в кінцевій концентрації 1:1000, 1:4000, 1:8000 та 1:10000, інактивацію проводили впродовж 24 годин за температури 4°C. Також, з метою наукового пошуку та порівняння ефективності, нами застосовано перекис водню (H_2O_2), який є альтернативним недорогим агентом для інактивації вірусу. Для цього застосовували 30 % водний розчин H_2O_2 , який вносили до вірусомісної суспензії в кінцевій концентрації 3 % і витримували за температури 4°C впродовж 1, 2, 3 і 4 годин. Після закінчення терміну інкубації, для звільнення від залишків перекису водню, до зразків суспензії антигену вірусу сказу додавали розчин ферменту каталази (оксидоредуктаза із бичачої печінки – 11000 ОД/мг) в кінцевій концентрації 12,5 ОД/см³. Після закінчення вказаного терміну взаємодії вірусу сказу з інактивантом, проби досліджували на повноту інактивації (наявність живого вірусу) методом інтрацеребральної інокуляції матеріалу білим мишам в об'ємі 0,03 см³. Облік проводили із врахуванням специфічної загибелі лабораторних тварин починаючи з п'ятої доби досліджу. Якщо були відсутні клінічні ознаки сказу серед дослідних мишей і вони залишалися живими після інокуляції протягом 14 діб (період спостереження), то вважали що відбулася повна інактивація вірусу. У випадку виявлення клінічних ознак сказу в мишей, або їхньої відсутності, але гибелі тварини, з головного мозку готували 20 % мозкову суспензію і проводили другий пасаж на білих мишах.

Результати дослідження залишкової інфекційної активності вірусу сказу за використання β -пропіолактону визначали залежно від використаної концентрації, за використання перекису водню – залежно від часу експозиції. Результати досліджень представлені в табл. 5.3.

Таблиця 5.3

Залишкова інфекційна активність вірусу сказу залежно від використаної концентрації β -пропіолактону та терміну експозиції вірусомісного матеріалу з H_2O_2

Препарат	Наявність / титр вірус сказу після інактивації, lg МЛД ₅₀ /см ³				Титр вірусу, lg МЛД ₅₀ /см ³
	1:1000	1:4000	1:8000	1:10000	
β -пропіолактон	-	-	-	+ / 1,1	7,49±0,2
	1 год	2 год	3 год	4 год	
H_2O_2	+ / 2,7	-	-	-	

Примітки: - - вірусу сказу не виявлено; + - специфічна гибель мишей.

Результати дослідження показали, що β -пропіолактон із ступенем очистки 98,5 % впродовж 24 год за температури 4°C повністю інактивує вірус сказу в культуральній суспензії у концентраціях 1:1000 та 1:4000 та 1:8000.

β -пропіолактон в концентрації 1:10000 суттєво знижував інфекційну активність вірусу сказу, однак після закінчення терміну експозиції була встановлена залишкова інфекційна активність на рівні 1,1 lg MLD₅₀/см³.

Дослідами встановлено повну інактивацію вірусу сказу розчином перекису водню в кінцевій концентрації 3,0 % протягом 2-4 годин. Впливу 3,0 % перекису водню протягом 60-и хвилин було недостатньо для усунення інфекційності вірусу сказу. В контрольній групі тварин, яким було інокульовано неінактивованій вірус сказу, спостерігали 100%-у смертність. Інфекційний титр вірусу, що використано для досліджень становив 7,49±0,2lg MLD₅₀/см³.

Отже, для інактивації вірусу сказу в культуральній вірусомісній суспензії придатний β -пропіолактон у концентрації 1:1000 та 1:4000 та 1:8000 із експозицією 24 години та водний розчин перекису водню в кінцевій концентрації 3,0 % і експозиції 2 години. Однак, враховуючи рекомендації, які визначені в Методах лабораторної діагностики сказу (2005) і відсутність

досліджень впливу перекису водню на протективно значимі антигенні детермінанти вірусу сказу, для подальших досліджень було використано антиген вірусу сказу, який інактивували β -пропіолактоном в концентрації 1:4000.

Перевірка імуногенної активності отриманого антигенного препарату.

Визначення імуногенної активності антирабічних вакцин для ветеринарного та медичного застосування проводиться об'ємним методом, розробленим в Національних інститутах здоров'я США (НИН). В якості чутливої лабораторної моделі використовують білих мишей. Принцип методу полягає в порівнянні ED_{50} досліджуваного вакцинного препарату з ED_{50} еталонної вакцини, яку виготовлять в Національному інституті біологічних стандартів і контролю, або ж із антирабічною вакциною із відомою імуногенною активністю.

Також, відповідно до Європейської фармакопеї 9.0, імуногенна активність інактивованого вірусу сказу була оцінена за рівнем синтезу антирабічних антитіл при експериментальній вакцинації білих мишей.

Постановку тесту НИН здійснювали за стандартною методикою (двократна внутрішньочеревна імунізація та контрольне інтрацеребральне зараження робочим розведенням вірусу сказу CVS-11 із титром інфекційної активності заражаючої дози в межах 12-50 $LD_{50}/0,03 \text{ см}^3$). В якості порівняльної (еталонної) вакцини використано антирабічну вакцину «Рабістар» серія 060614, виробництва «Укрветпромпостач» з імуногенною активністю 6,96 $MO/\text{см}^3$. Спостереження за мишами здійснювали впродовж 14 днів. Відмічали усіх загиблих, однак вважали специфічною гибель будь-якої миші з ознаками перебігу паралітичної форми сказу (парези, паралічі, судоми) починаючи з 5-ої доби після зараження. Результати дослідження відображені в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

ED₅₀ інактивованої вірусомісної суспензії за результатами тесту НІН

Біологічний препарат	Розведення	К-сть тварин	К-сть тварин на початок реєстрації специфічної загибелі	Абсолютні показники		- lg ED ₅₀
				загинуло, гол.	вижило, гол.	
Дослідний вакцинний препарат	1:5	15	15	1	14	1,23
	1:25	15	14	4	11	
	1:125	15	15	7	8	
	1:625	15	15	15	0	
Рабістар, серія 060614	1:5	15	13	0	13	1,85
	1:25	15	15	5	10	
	1:125	15	15	8	7	
	1:625	15	15	15	0	

За результатами математичних обрахунків визначено lgED₅₀ дослідного препарату на рівні 1,23, що на 0,62 нижче цього ж показника контрольної вакцини. Оскільки «Рабістар» є комерційним вакцинним препаратом, який вміщує ад'ювант гідроокис алюмінію – компонент, який дозволяє підвищити гуморальну відповідь організму за рахунок депонуючого ефекту в місці введення вакцини, тому, на нашу думку, отримані результати є задовільними.

Враховуючи те, що імуногенна активність антирабічної вакцини «Рабістар» (серія № 060614) відповідно паспорту становила 6,96 МО/доза, то розроблений нами антигенний препарат володів імуногенністю 4,63 МО/см³.

Для дослідження імунної відповіді на введення концентрованої очищеної інактивованої вірусомісної суспензії штаму Щолково-51 К використано 10 білих мишей, кожній з яких інокулювали інтраперитоніально по 0,5 см³ дослідного зразку антигену вірусу сказу на 0-у та 7-у добу. Кров, для дослідження титрів антитіл до вірусу сказу, відбирали на 14-у, 21-у і 27-у добу

досліді, досліджували методом ТФ-ІФА об'єднані проби сироваток крові мишей.

За отриманими показниками оптичної щільності стандартних сироваток сформували регресійну криву для визначення титрів антитіл до вірусу сказу в дослідних сироватках крові. Титри антитіл до вірусу сказу у вакцинованих мишей визначали за показниками оптичної щільності сироваток крові із нанесенням результатів на регресійну криву, яку побудували за значеннями оптичної щільності референтних сироваток ВООЗТ ($0,5 \text{ МО/см}^3$, 4 МО/см^3) та ВООЗ (30 МО/см^3). Результати відображені на рис. 5.2.

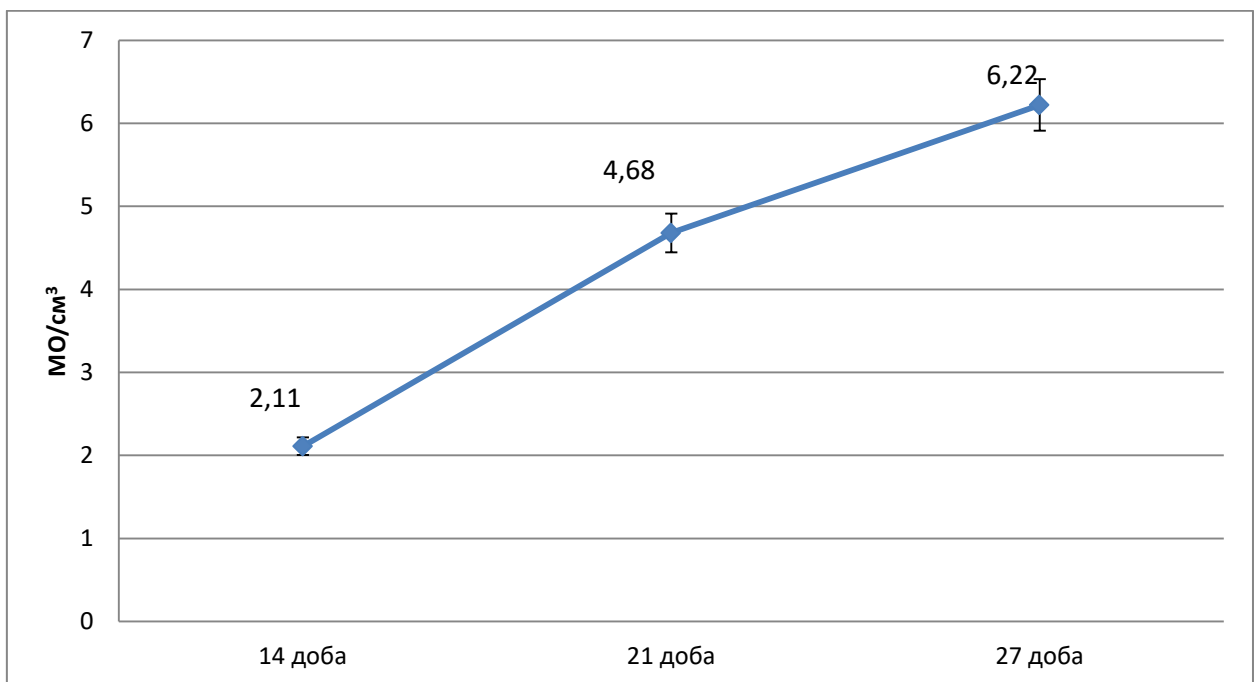


Рис. 5.2 Титри антирабічних антитіл об'єднаних проб сироваток крові білих мишей після інтраперитоніальної інокуляції дослідного зразку антигену вірусу сказу.

В результаті досліджень об'єднаних проб сироваток крові в ТФ-ІФА визначено, що на 14-у добу досліді, титр антитіл до вірусу сказу у сироватках крові лабораторних тварин становив $2,11 \text{ МО/см}^3$, що свідчить про формування достатнього протективного рівня, оскільки мінімальний захисний титр антитіл до вірусу сказу, за рекомендаціями ВООЗТ, повинен становити не менше $0,5 \text{ МО/см}^3$.

На 21-у добу виявили титри антитіл на рівні 4,68 МО/см³, що є більш ніж у двічі вище від показника титру встановленого на 14-у добу. На 27-у добу досліді встановлено подальше підвищення титру антитіл до вірусу сказу. Титр антирабічних антитіл об'єднаної проби сироваток крові білих мишей підвищився до 6,22 МО/см³, що є підтвердженням високої імуногенної активності отриманого нами інактивованого концентрованого очищеного зразку вірусу сказу штаму Щолково-51 К.

5.2. Розробка методики гіперімунізації тварин для отримання антирабічних сироваток

Аналіз літературних джерел вказує на те, що застосування різноманітних імуномодуючих препаратів за будь-якої вакцинації (в тому числі й антирабічної) забезпечує підвищення клітинної та специфічної гуморальної відповіді макроорганізму на введення антигену. З точки зору впливу антигену на організм фактично можна стверджувати про підвищення його біологічної активності, що викликає підвищення імунного статусу тварин-продуцентів гіперімунних сироваток крові. Враховуючи це, для нас становило науковий інтерес проведення серії дослідів щодо визначення впливу різних імуностимулюючих препаратів за антирабічної вакцинації з метою подальшого їхнього впровадження у схему гіперімунізації тварин для отримання гіперімунної антирабічної сироватки.

Підбір оптимального імуностимулюючого препарату в якості ад'юванту антирабічної вакцини.

З метою підбору оптимального імуностимулюючого препарату для розробки та застосування в схемі гіперімунізації, використовували імуностимулюючий препарат «Фоспреніл». Дослідження препарату проводили шляхом комбінованого введення разом із антирабічною вакциною «Рабістар» безпородним білим мишам, масою 9–11 г. Вакцину вводили інтраперитоніально по 0,5 см³ в розведеннях 1:5, 1:25 і 1:125, а «Фоспреніл» внутрішньом'язово по 2 мкл/гол. Контрольну групу тварин щеплювали лише вакциною «Рабістар» в

аналогічних розведеннях. Усім тваринам обох груп проводили ревакцинацію через 7 діб, а на 14-у добу досліду здійснювали і/ц зараження референс-штамом вірусу сказу CVS в об'ємі 0,03 см³. За результатами титрування та обрахунку заражаючої дози вірусу сказу, що була взята в досліді, встановлено її значення в 125,9 МЛД₅₀/гол. Результати представлені в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

Вплив препарату «Фоспреніл» за антирабічної вакцинації білих мишей

Вакцина / препарат	Розведе- ння	Кількість мишей взятих в досліді	Кількість мишей на початок реєстрації специфічної загибелі	Абсолютні показники	
				загинуло	вижило
Рабістар (контроль)	1:5	12	12	0	12
	1:25	9	9	4	5
	1:125	9	8	8	0
Рабістар + Фоспреніл	1:5	12	12	1	11
	1:25	9	8	5	3
	1:125	9	9	9	0

Показник ефективної дози (ЕД₅₀) антирабічної вакцини «Рабістар» для мишей при використанні заражаючої дози вірусу в 125,9 МЛД₅₀/гол становив 0,74, а при комбінованому застосуванні вакцини разом з препаратом «Фоспреніл» значення ЕД₅₀ було 0,56. Тобто, при визначенні ефективності препарату «Фоспреніл» в дозі 2 мкл/гол згідно настанови до використання, в якості ад'юванту антирабічної вакцини, підвищення специфічного захисту антирабічної вакцини не спостерігали.

Аналізуючи отримані результати, слід зауважити, що у лабораторних мишей досить швидкий обмін речовин, тому, можливо, поясненням отриманих результатів є обрана нами доза препарату, яка використана в досліді. Цієї дози виявилось недостатньою для прояву імуностимулюючої дії на макроорганізм за антирабічної вакцинації. Враховуючи отримані результати, у другій серії

дослідів вирішено використати збільшені дози «Фоспренілу» (4 та 8 мкл/гол), паралельно, у порівняльному аспекті, використавши імуностимулюючі препарати «Ронколейкін» – рекомбінантний ІЛ-2 (100 та 200 МО/гол) і «РБС» – комплекс біологічно активних речовин тваринної тканини (2 мкл/гол).

Препарати «РБС» і «Фоспреніл» ін'єктували внутрішньом'язово, а «Ронколейкін» – підшкірно, згідно настанов до використання препаратів. На 7-у добу досліду провели ревакцинацію білих мишей, а інтрацеребральне зараження вірусом сказу – на 14-у добу. Інфікуюча доза вірусу сказу, що використана в досліді, становила 125,9 МЛД₅₀/гол. (табл. 5.6).

Отримані результати порівнювали за показником ED₅₀, який розраховували за формулою Sперман-Кärber та за імуногенністю антирабічної вакцини.

Із двох груп тварин, яким ін'єктували «Фоспреніл», показник ED₅₀ був вищий на 15 % у групі тварин, яким застосовували препарат у дозі 4 мкл/гол, порівняно із контрольною групою тварин (вакцина «Рабістар»). У групі тварин з дозою препарату 8 мкл/гол цей показник складав 1,46, що на 0,06 нижче ніж у контрольної групи тварин.

Ефективну дію мав препарат «РБС». Показник 50 % ефективної дози був на рівні 1,65, що на 0,13 (9 %) вище ніж у контрольної групи тварин, але, водночас, на 0,1 нижче, ніж у тій групі тварин, якій застосовували «Фоспреніл» у дозі 4 мкл/гол.

Імуностимулюючий препарат «Ронколейкін» не вплинув на ефективність антирабічної вакцинації. Показник ED₅₀ в обох групах тварин був нижчим ніж у тварин контрольної групи.

Таблиця 5.6

**Вплив препаратів «Фоспреніл», «Ронколейкін» і «РБС» на ефективність
антирабічної вакцинації білих мишей**

Вакцина / препарат	Розведення	К-ть мишей на початок реєстрації специфічної загибелі	Абсолютні показники		– ЕД ₅₀
			загинуло	вижило	
Рабістар (контроль)	1:5	8	2	6	1,52
	1:25	9	3	6	
	1:125	8	6	2	
Рабістар + Фоспреніл (4 мкл/гол)	1:5	18	3	15	1,75
	1:25	9	3	6	
	1:125	10	5	5	
Рабістар + Ронколейкін (100 МО/гол)	1:5	15	5	10	1,16
	1:25	8	5	3	
	1:125	9	8	1	
Рабістар + РБС (2 мкл/гол)	1:5	14	1	13	1,65
	1:25	7	2	5	
	1:125	9	7	2	
Рабістар + Ронколейкін (200 МО/гол)	1:5	20	8	12	1,39
	1:25	9	5	4	
	1:125	9	5	4	
Рабістар + Фоспреніл (8 мкл/гол)	1:5	17	3	14	1,46
	1:25	8	5	3	
	1:125	8	5	3	

Імуногенна активність антирабічної вакцини «Рабістар» (серія №060614) становила 6,96 МО/доза. У дослідних груп тварин, яким ін'єктували

«Фоспреніл» (4 мкл/гол) і «РБС» разом з вакциною, імуногенність антирабічної вакцини зростає до 11,8 МО/доза та 9,39 МО/доза відповідно (рис. 5.3).

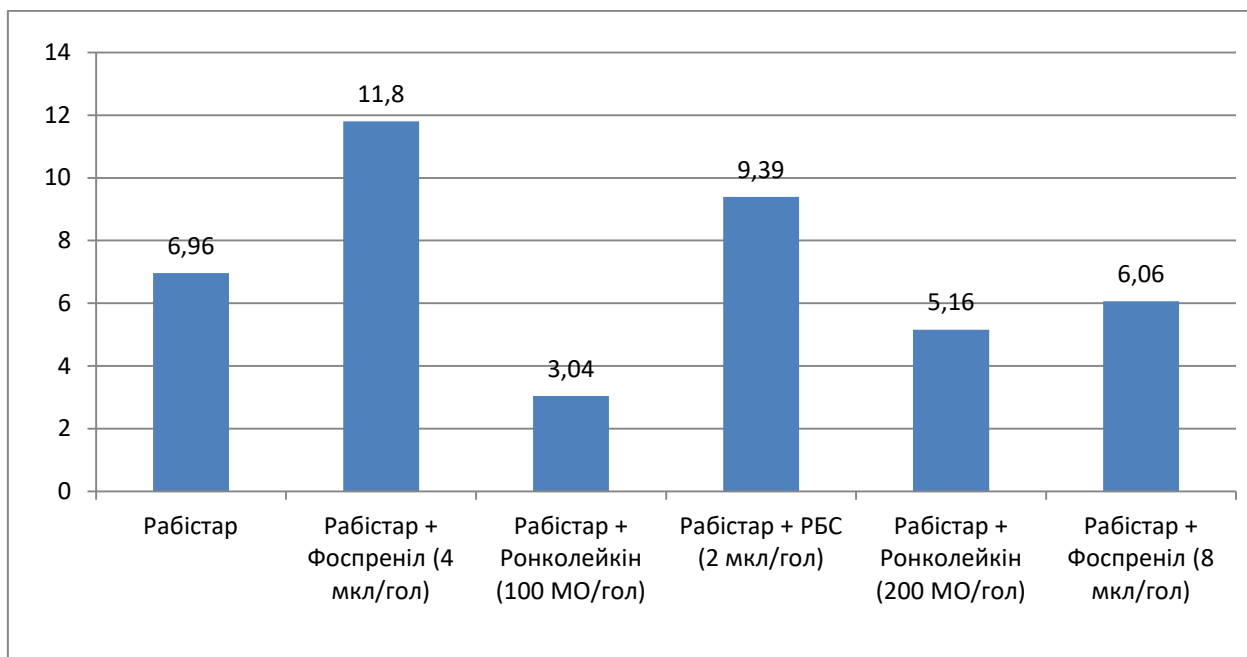


Рис. 5.3 Індекс імуногенної активності антирабічної вакцини «Рабістар» при застосуванні різних імуностимуляторів.

Таким чином, проведені дослідження продемонстрували підвищення імуногенної активності антирабічної вакцини на моделі лабораторних тварин в разі застосування препаратів «РБС» і «Фоспреніл» (доза 4 мкл/гол). Доведено, що введення вищої та нижчої дози препарату «Фоспреніл» не впливало на підвищення рівня виживаності білих мишей після інфікування летальною дозою вірусу сказу.

Вибір тварин-донорів гіперімунної антирабічної сироватки крові.

Для підбору тварин-продуцентів антирабічної гіперімунної сироватки крові нами були відібрані такі види тварин: кролі (породи шиншила) і мурчаки. Тварини були клінічно здорові та не щеплені проти сказу раніше.

Було сформовано дві дослідні групи тварин: кролі – 7 голів, мурчаки – 10 голів. Групи сформовано з різностатевих тварин однієї породи та одного віку, їх утримували у віварії Інституту ветеринарної медицини НААН. Корм та вода були доступні *ad libitum*.

Кожній із дослідних груп тварин було введено на 0 та 21 добу отриманий нами інактивованих культуральний антиген на основі штаму вірусу сказу Щолково–51 К. Ін'єктували 0,5 см³ антигену внутрішньом'язово в ділянку лопатки та по 0,1 см³ внутрішньошкірно в 5 точок вздовж хребта. Паралельно вводили внутрішньом'язово тваринам імуностимулюючий препарат «Фоспреніл» в дозі 0,05 см³/кг маси тіла. На 28-у добу дослідів відбирали кров для визначення рівня антирабічних антитіл методом твердофазного імуоферментного аналізу (ТФ-ІФА) з використанням тест-системи BIO RAD Platelia Rabies Kit II із додатковим введенням у якості контролю Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини.

При дослідженні проб сироваток крові після ґрундімунізації (0 і 21 доба) виявили, що тварини першої групи (кролі) мали середній титр рабічних антитіл $21,43 \pm 1,96$ МО/см³ (рис. 5.4).

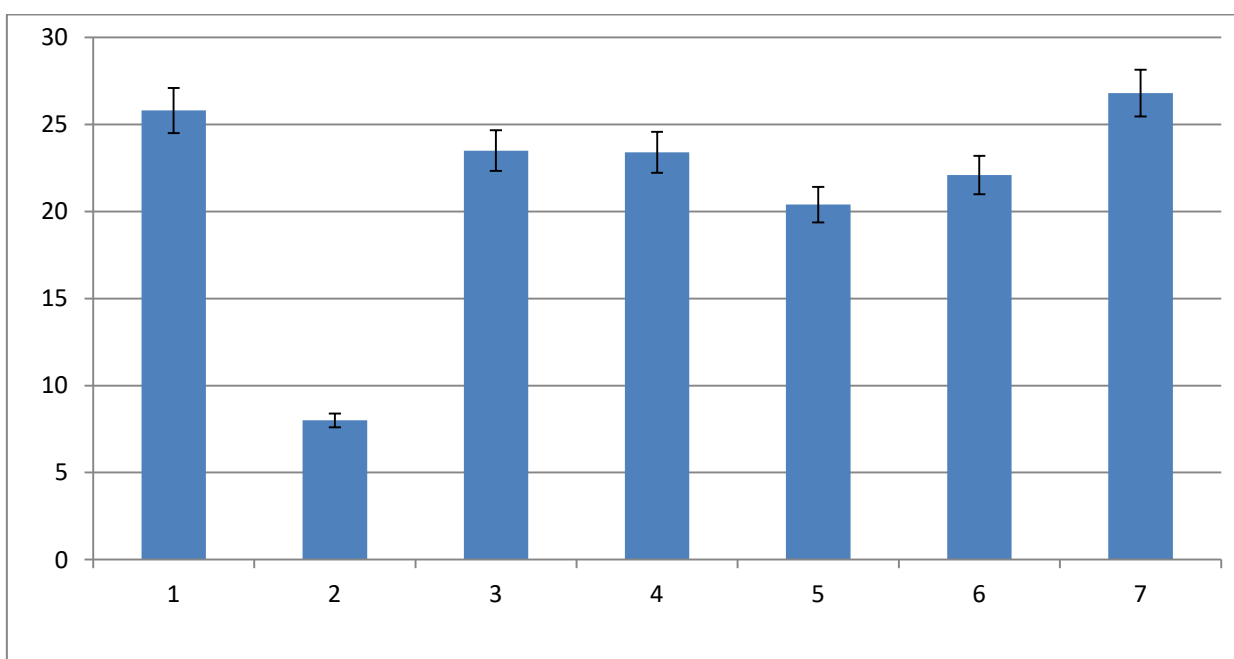


Рис. 5.4 Титри антитіл до вірусу сказу в індивідуальних пробах сироваток крові кролів на 28-у добу після комбінованої двократної імунізації дослідним антигеном вірусу сказу з препаратом «Фоспреніл».

Дослідження проб сироваток крові мурчаків показало, що титр специфічних до вірусу сказу антитіл коливався в межах від 7,2 до 13,5 МО/см³.

В цілому по групі середній титр антирабічних антитіл становив $10,88 \pm 0,82$ МО/см³. Результати дослідження сироваток крові мурчаків методом ТФ-ІФА відображені на рис. 5.5.

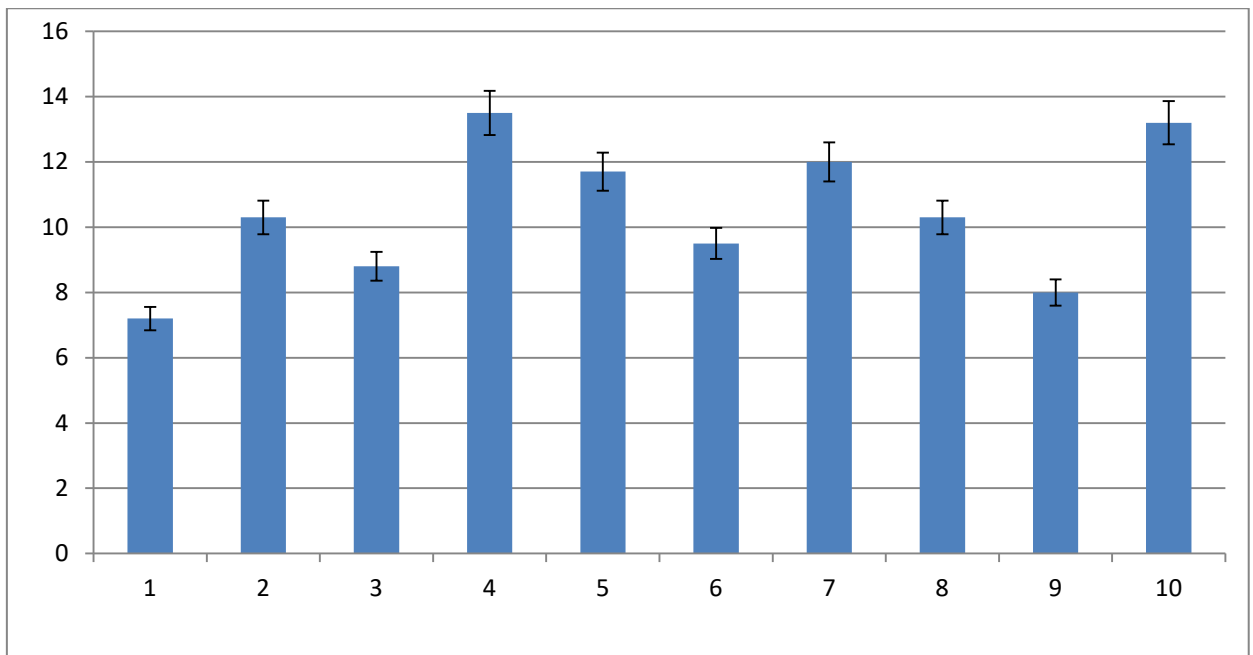


Рис. 5.5. Титри антитіл до вірусу сказу в індивідуальних пробах сироваток крові мурчаків на 28-у добу після комбінованої двократної імунізації дослідним антигеном вірусу сказу з препаратом «Фоспреніл».

Отже, проведені дослідження проб сироваток крові кролів і мурчаків після двократної комбінованої імунізації (0 та 21 доба) показали, що висока специфічна імунна відповідь на комплекс «культуральний антиген вірусу сказу+ імуностимулюючий препарат» була у кролів. У групі тварин, яку склали мурчаки, імунна відповідь була порівняно низька (середнє значення титрів антирабічних антитіл – $10,88 \pm 0,82$ МО/см³).

Група дослідних тварин, яку склали кролі, мала високі титри антитіл – $21,43 \pm 1,96$ МО/см³, однак в цій групі була виявлена сироватка крові від кроля № 2, титр антирабічних антитіл якої становив $8,0$ МО/см³, в той час як в інших тварин групи перевищував $20,0$ МО/см³. Без врахування сироватки крові № 2 середній титр антитіл до вірусу сказу в кролів становив $23,67 \pm 0,83$ МО/см³. Нижчий рівень антитіл до вірусу сказу в кроля № 2, порівняно з іншими

тваринами групи, можна пояснити зниженою реактивністю організму на введення антигену вірусу сказу. В зв'язку з відсутністю доцільності здійснення подальшої імунізації цієї тварини, на цьому етапі її було виведено з досліджу.

Для подальшого застосування в схемі антирабічної гіперімунізації було вирішено використовувати кролів, оскільки вони демонстрували високу імунну відповідь, а також є кращою лабораторною моделлю для проведення необхідних нам дослідів з отримання антирабічного імуноглобуліну.

Розробка схеми гіперімунізації тварин.

Для отримання гіперімумної сироватки крові у схемі використано дорослих кролів, масою 2,4–2,7 кг. Інактивованій концентрований антиген вводили комбіновано: 0,5 см³ внутрішньом'язово в одну точку і по 0,1 см³ внутрішньошкірно в п'ять точок. Імуностимулятор «Фоспреніл» у дозі 4 мкл/кг вводили внутрішньом'язово перед щепленням і на 21-у і 49-у добу імунізації. Ін'єкції на 0-у та 21-у добу досліджу проводили з метою ґрундімунізації та для проміжної оцінки напруженості антирабічного імунітету на 28-у добу методом ТФ-ІФА. За результатами дослідження сироваток крові від кролів для подальшої імунізації відбирали тварин із титрами антитіл до вірусу сказу вище 20 МО/см³.

Третю і четверту імунізації за схемою здійснювали на 35-у і 49-у добу відповідно, відбір крові та отримання специфічної гіперімумної сироватки крові – на 63-ю добу. Схема гіперімунізації тварин наведена у табл. 5.7.

Таблиця 5.7

Схема отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові на кролях

Доба введення	Спосіб імунізації (об'єм/кількість введень)		Фоспреніл, см ³
	Внутрішньошкірно, см ³	Внутрішньом'язово, см ³	
0	0,1/5	0,5/1	0,125
21	0,1/5	0,5/1	0,125
35	0,1/5	0,5/1	-
49	0,1/5	0,5/1	0,125
63 (Відбір крові)	-	-	-

Після завершення циклу гіперімунізації кролів, проводили дослідження проб сироваток крові на вміст антирабічних антитіл методом ТФ-ІФА. Для оцінки вірус нейтралізуючої активності отриманих гіперімунних сироваток крові кролів проведені дослідження в реакції нейтралізації на білих мишах. Результати дослідження наведені у табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Титри антитіл до вірусу сказу в сироватках крові кролів після застосування схеми гіперімунізації, n=3

№ сироватки	Титр антитіл, МО/см ³	
	ІФА	РН
1	194±12,3	183±15,6
2	246±8,9	262±22,5
3	235±14,5	214±18,4
4	218±7,8	185±10,8
5	182±5,5	167±12,6
6	219±9,0	210±9,7
Об'єднана проба	212±10,4	185±9,2

Після отримання результатів титрування кожної сироватки крові провели дослідження об'єднаної проби, антирабічна активність якої становила $185 \pm 9,2$ МО/см³ в РН і $212 \pm 10,4$ МО/см³ в ТФ-ІФА.

Таким чином, застосування в схемі гіперімунізації імуностимулюючого препарату «Фоспреніл» у комплексі з культуральним концентрованим ПЕГ антигеном вірусу сказу штаму Щолково-51 К, дало змогу отримати гіперімунну сироватку крові з високим титром антитіл до вірусу сказу.

Отже, відповідно до отриманих результатів маємо підстави вважати, що запропонований нами спосіб та схема придатні для отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові, так як схема розрахована на короткий період часу (63 доби), адже тривале застосування імуностимулюючих препаратів та антигенне навантаження виснажують організм тварин-продуцентів.

Результати підрозділів 5.1 і 5.2 висвітлені в наукових працях [26, 27, 39, 28, 29].

5.3. Отримання дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну

Оцінка існуючої системи лабораторної діагностики сказу в Україні.

Передумовою проведених нами досліджень було з'ясування ролі РПФ для діагностики сказу в Україні, а також визначення кількості діагностичних досліджень на сказ, що проводяться регіональними лабораторіям ДПССУ.

Згідно звітних документів, в Україні кількість діагностичних досліджень на сказ в регіональних лабораторіях ветеринарної медицини характеризується певними коливаннями. Динаміка зміни кількості діагностичних досліджень відображена на рис. 5.6.

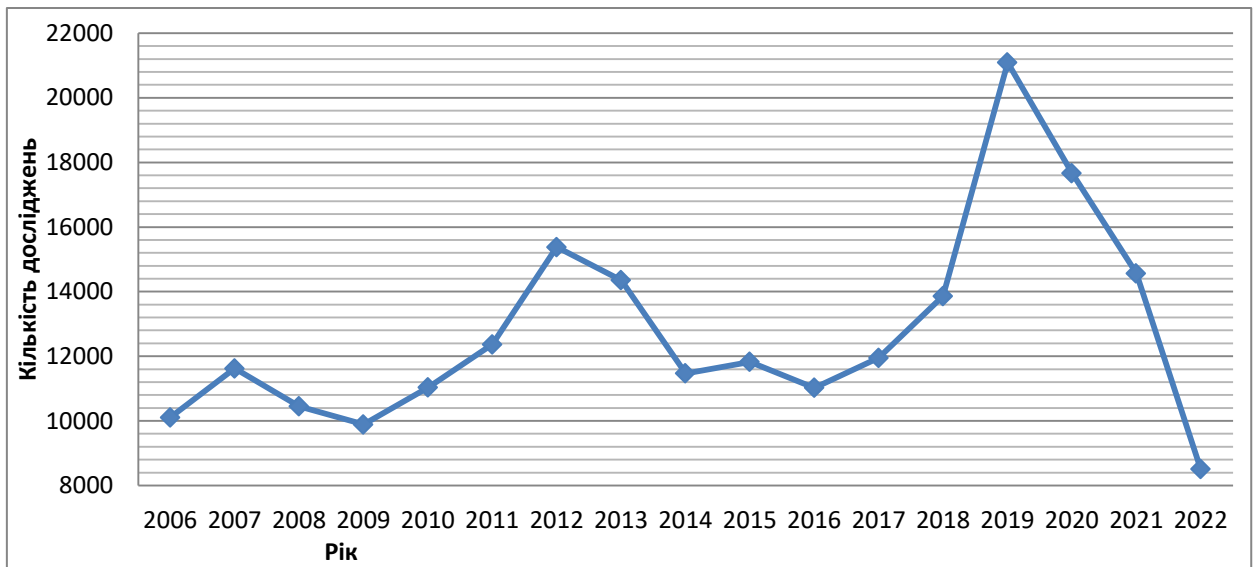


Рис. 5.6 Загальна кількість досліджень на сказ в Україні протягом 2006 – 2022 рр.

Протягом 2006 – 2010 рр. щорічно в обласних і регіональних лабораторіях ветеринарної медицини було досліджено близько 10 – 11 тисяч патологічних матеріалів з підозрою на сказ, в той час як протягом 2011 – 2016 рр. здійснювалося 11 – 15 тисяч діагностичних досліджень щороку.

В 2012, 2013 та з 2018-2021 рр. збільшення кількості лабораторних досліджень пов'язане із проведенням в Україні широкомасштабних кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, а саме: відстрілу лисиць в зоні проведення цього протиепізоотичного заходу та дослідження мозку методом МФА, як елементу контролю ефективності кампанії. Відсутність кампанії з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу та відсутність необхідності здійснення контролю ефективності цього заходу, а також ведення бойових дій та окупація в 2022 році частини території України стали причинами зменшення кількості діагностичних досліджень на сказ. Загалом досліджено в 2022 році 8506 зразків головного мозку тварин, що є найнижчим показником кількості проведених діагностичних лабораторних досліджень патологічного матеріалу з підозрою на сказ за останні 20 років.

В 2011-2018 рр. спостерігається тенденція щодо підвищення кількості негативних на сказ діагнозів відносно загальної кількості виконаних

досліджень, в той час як кількість позитивних на сказ діагнозів зменшилась відносно досліджень проведених у 2006 – 2010 рр.: 9,5-13,9 % та 17,0-25,2 % відповідно. В 2019-2022 рр. знову зменшується частка позитивних на сказ діагнозів, що пов'язане з великою кількістю досліджень на сказ проб головного мозку від відстріляних лисиць для контролю ефективності пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу. Протягом цих років частка позитивних на сказ діагнозів становила 5,8-7,2 %. Відсоткове співвідношення кількості позитивних та негативних досліджень на сказ наведено на рис. 5.7.

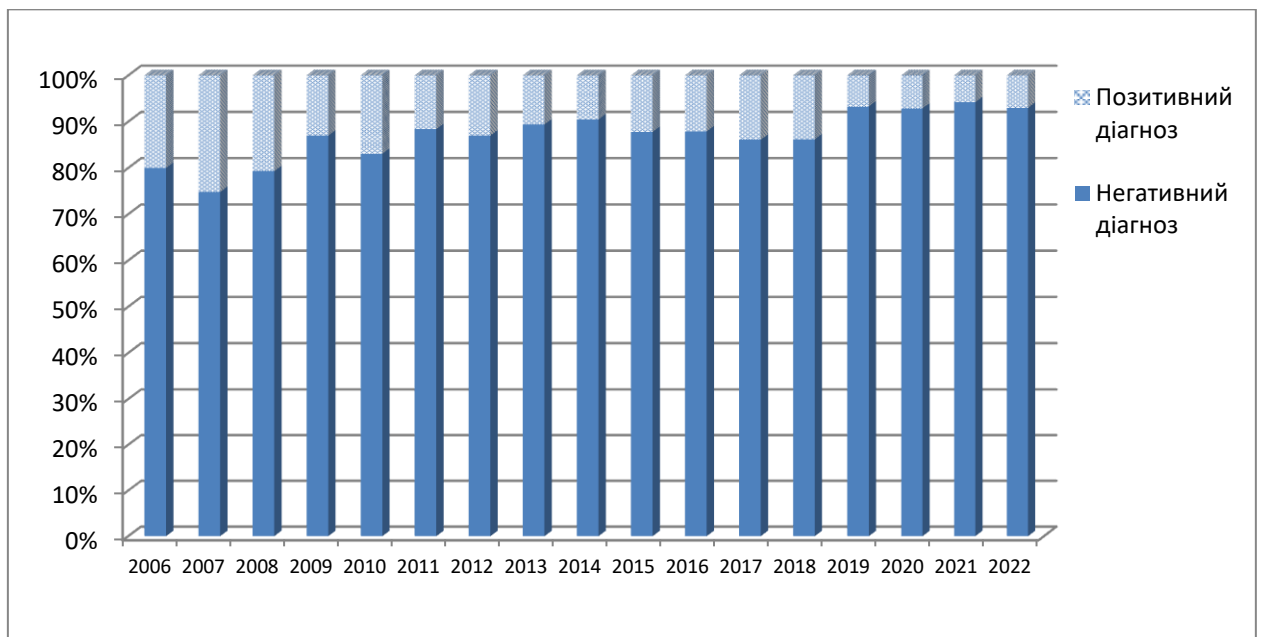


Рис. 5.7 Відсоткове співвідношення кількості позитивних та негативних досліджень на сказ в Україні за 2006 – 2022 рр.

Провівши аналіз супровідних листів до патологічних матеріалів від тварин зі складу колекції вуличних ізолятів вірусу сказу лабораторії нейроінфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН, які надійшли до лабораторії в період з 2009 по 2013 рік, встановлено, що основним методом діагностики сказу в обласних лабораторіях ветеринарної медицини України є РПФ. У випадку отримання сумнівних результатів, проводиться постановка біологічної проби на білих мишах. Із наявних 1362-х супровідних листів до патологічних матеріалів вказують на постановку остаточного діагнозу за біологічною пробю лише 75, що складає близько 5,5 %. Тобто, 94,5 % встановлених остаточних результатів в

Україні здійснюється постановкою РПФ, що свідчить про високу діагностичну цінність цього методу.

Виділення фракції імуноглобулінів гіперімунної антирабічної сироватки.

Для роботи використовували сироватку крові кролів зі специфічною активністю в ТФ-ІФА $212 \pm 10,4$ МО/см³ та в РН на білих мишах – $185 \pm 9,2$ МО/см³ відповідно до активності Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини.

Концентрування отриманої антирабічної гіперімунної сироватки проводили шляхом висолювання білків сульфатом амонію.

Після концентрування сироватки, імуноглобуліни виділяли за допомогою гельпроникаючої хроматографії в HPLS (Pharmacia) відповідно до вимог виробника.

Повторне дослідження активності імунобіологічного препарату проводили *in vivo* в РН на білих мишах. Крім цього, для оцінки антирабічної активності препарату застосовували ТФ-ІФА, використовуючи тест-систему для виявлення антитіл до збудника сказу BIO RAD Platelia Rabies Kit II із додатковим застосуванням у якості контролю Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини.

В результаті виділення антирабічного імуноглобуліну із концентрованої сироватки крові імунізованих кролів отримали зразок, який був досліджений в РН на білих мишах і методом ТФ-ІФА. Встановлено, що титри антитіл до вірусу сказу знаходилися на рівні $327,0 \pm 48$ МО/см³ в РН та $391,6 \pm 64$ МО/см³ в ТФ-ІФА.

Оскільки для кон'югації антирабічного імуноглобуліну з флуорохромом потрібно проводити розрахунки за концентрацією білку, ми проводили визначення його вмісту. В результаті встановили, що вміст білку в сконцентрованій сироватці крові був на рівні $28,2$ мг/см³.

Розробка схеми кон'югації, очистка від незв'язаного флуорохрому.

На цьому етапі досліджень перед нами стояло завдання підібрати оптимальні умови для кон'югації отриманого імуноглобуліну з сироватки крові гіперімунізованих кролів із ФІТЦ.

Відомо, що приєднання ФІТЦ до білку відбувається в лужному середовищі з рН реакційної суміші близько 9,0, тому для початку ми здійснили дослідження динаміки зміни концентрації водневих іонів під час реакції кон'югації, застосовуючи рекомендоване співвідношення білку до ФІТЦ (1 мг/100 мг).

В ході дослідження було помічено, що через 10 хвилин після додавання флуорохрому до розчину імуноглобуліну відбувалося зниження рН середовища на 1 – 1,2, через 30 хв після початку реакції рН знизилось ще на 0,3 – 0,5. На 6-у та 12-у годину кон'югації рівень рН залишався сталим. Тому, для нас становило науковий інтерес визначення якості кінцевого препарату за коригування рН середовища під час кон'югації (на 10-у та 30-у хв реакції) та без нього.

Оскільки, після закінчення кон'югації в реакційній суміші міститься певна частина незв'язаного флуорохрому, який не прореагував з імуноглобуліном, то для попередження неспецифічного світіння діагностикуму в РПФ проводили відділення незв'язаного флуорохрому гель-фільтрацією на колонках із сефадексом G-25. Кількість розчину ФІТЦ-імуноглобулінів для гельфільтрації брали із розрахунку 15 – 25 % від об'єму колонки. Елюцію проводили стартовим буферним розчином (0,01 М ФБР, рН 7,2 – 7,4) зі швидкістю потоку 30 – 60 см³ на годину.

При проходженні розчину в колонці відбувалося чітке розділення ФІТЦ-імуноглобулінів і незв'язаного флуорохрому, при цьому ФІТЦ – імуноглобуліни виходять першими, тому для подальших досліджень використовували саме першу фракцію.

Після очистки від незв'язаного флуорохрому, нами було отримано два зразки флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну – виготовлений за

стандартною схемою та з коригованим рН. Для порівняння якості отриманих кон'югатів проводили постановку РПФ.

Дослідження кон'югатів в реакції прямої імунофлуоресценції показало, що більш активним виявився зразок, під час виготовлення якого використовували коригування рівня водневих іонів, оскільки найвищим розведенням, за якого спостерігали наявність характерних для вірусу сказу яскравих жовто-зелених включень в нейронах та поза їх межами, було 1:16. Інший досліджуваний зразок мав на порядок нижчу активність. Це свідчить про те, що за відсутності коригування рН в перші хвилини реакції, значна частина барвника не реагує з білком.

Наступним етапом досліджень був підбір оптимальної кількості флуорохрому. Для мічення використовували розчин імуноглобуліну з концентрацією білку $28,2 \text{ мг/см}^3$ та ФІТЦ із розрахунку 1; 1,5 і 2 мг на 100 мг білку, кон'югацію проводили за температури 4°C впродовж 18 год за постійного перемішування на магнітній мішалці та коригуванням рН середовища в перші 30 хв реакції.

Після реакції кон'югації, нами було отримано 3 зразки флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну для дослідження в РПФ з різною концентрацією флуорохрому, які й використовували для подальших досліджень.

Визначення активності та специфічності дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в РПФ.

Перед нами постало завдання дослідити отримані зразки ФАГ за такими показниками, як активність та специфічність.

Кон'югований імуноглобулін вважають активним за наявності в позитивних тест-препаратах, оброблених цим же флуоресціюючим імунобіологічним препаратом в робочому розведенні не менше 1:8, специфічного жовто-зеленого світіння при оцінці інтенсивності флуоресценції на три – чотири хрести, тобто це розведення вважають «фарбуючим» титром препарату.

Діагностикуми вважають специфічними при виявленні у позитивних тест-препаратах, оброблених ФАГ в робочому розведенні, специфічного яскравого жовто-зеленого світіння включень цитоплазми клітин, які мають різну форму та розміри. В негативних тест-препаратах знаходять тьмяну сіро-зелену флуоресценцію цитоплазми клітин.

Дослідження активності та специфічності дослідних зразків флуоресціюючого імуноглобуліну проводили в РПФ, паралельно визначали робоче розведення кон'югатів (досліджували двократні розведення від 1:2 до 1:128).

Як контрольний діагностичний препарат застосовували флуоресціюючий антирабічний глобулін – ФАГ (глобулін антирабічний флуоресціюючий «РАБИТЕСТ-РІФ (RABITEST-FAT)», виробництва Біотестлабораторія, Україна) в робочому розведенні 1:16.

Постановку реакції імунофлуоресценції здійснювали із застосуванням модифікованого (без ацетону) нами методу фіксації мазків-відбитків мозкової тканини.

Люмінесцентну мікроскопію проводили за допомогою мікроскопу ZEISS Axio Lab.A1 за збільшення $\times 10 - 40$ та $\times 100$ під імерсійною системою.

Зведені результати дослідження отриманого ФАГ в РПФ наведені в табл. 5.9.

Дослідження мазків-відбитків головного мозку білих мишей, попередньо інфікованих вірусом сказу (штам CVS), фарбованих контрольним препаратом ФАГ (1:16), показало яскраве жовто-зелене світіння достатньої кількості гранул округлої форми в різних полях зору мікроскопу, що дало змогу оцінити проби в чотири хрести (рис. 5.8.)

Таблиця 5.9

**Визначення специфічності, чутливості та активності дослідних зразків
ФАГ в РПФ**

Досліджуваний препарат	Робоче розведення	Результат в РПФ, інтенсивність флуоресценції	
		Позитивний на сказ пат. матеріал	Негативний на сказ пат. матеріал
ФАГ з концентрацією ФІТЦ 1 мг/100 мг білку	1:2	++++	-
	1:4	++++	-
	1:8	++++	-
	1:16	++++	-
	1:32	++	-
	1:64	++	-
	1:128	-	-
ФАГ з концентрацією ФІТЦ 1,5 мг/100 мг білку	1:2	++++	-
	1:4	++++	-
	1:8	++++	-
	1:16	++++	-
	1:32	++++	-
	1:64	++	-
	1:128	-	-
ФАГ з концентрацією ФІТЦ 2 мг/100 мг білку	1:2	++++	-
	1:4	++++	-
	1:8	++++	-
	1:16	++++	-
	1:32	++++	-
	1:64	++	-
	1:128	-	-
Контроль	1:16	++++	-

Негативний контроль – мазок-відбиток з мозку здорової білої лабораторної миші, раніше не вакцинованої проти сказу, при люмінесцентній мікроскопії включень подібного світіння не мав. Сама ж мозкова тканина світилась зеленуватим кольором (рис. 5.9).

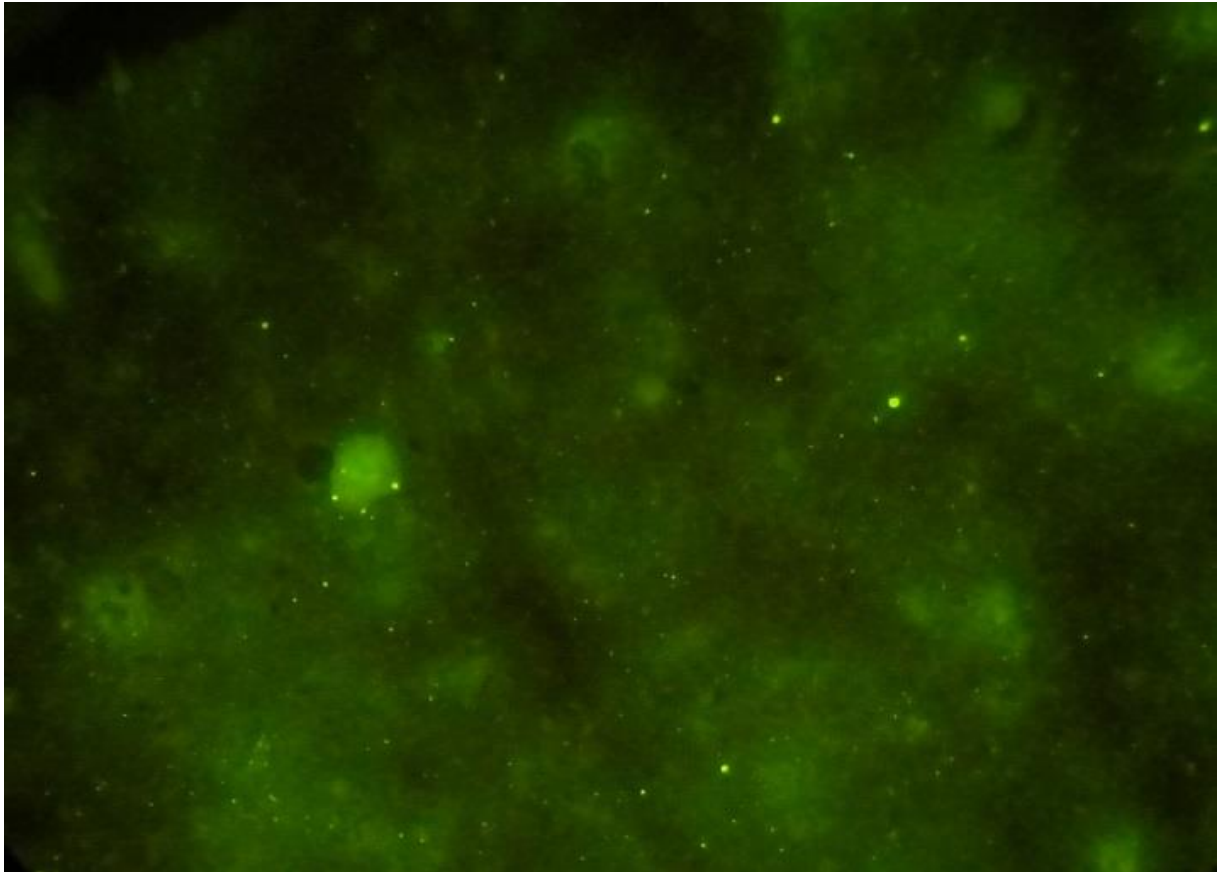


Рис. 5.8 Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований контрольним ФАГ, розведення 1:16, збільш. x200).

Усі дослідні зразки флуоресціюючого імуноглобуліну в розведенні 1:2 та 1:4, при люмінесцентній мікроскопії позитивного та негативного на сказ матеріалу, мали надзвичайно яскраве світіння фону, що значно затрудняло постановку діагнозу. Результати мікроскопії відображені на рис 5.10 і 5.11.

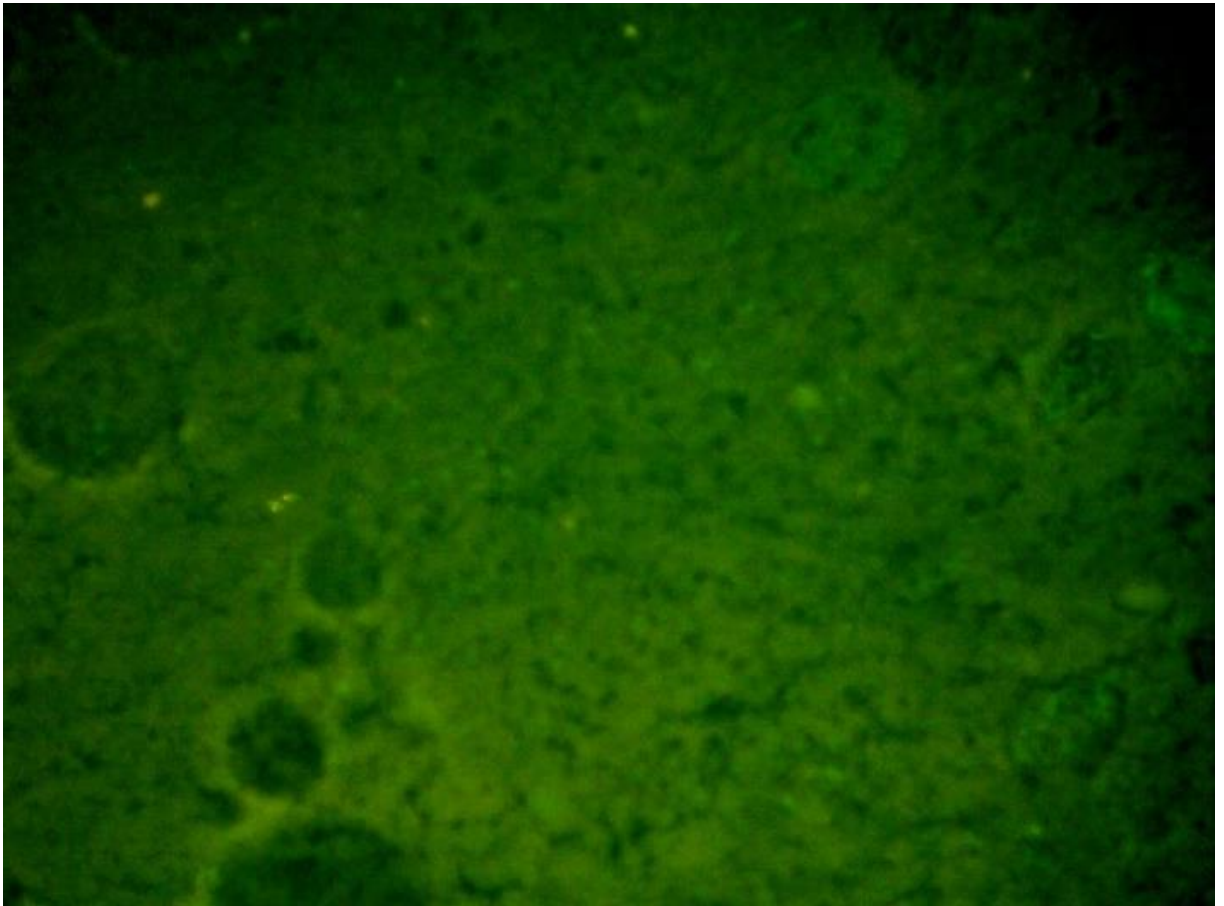


Рис. 5.9 Негативний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований контрольним ФАГ, розведення 1:16, збільш. x200).

У фарбованих позитивних на сказ препаратах дослідними ФАГ, в розведенні 1:8, мозкова тканина світилась тусклим, сірувато-жовтим чи зеленуватим кольором. Антиген вірусу сказу виявляли в нейронах і за межами клітин у вигляді яскравих зелених гранул різної форми (округлої, овальної) і величини – від ледь помітних до 15 – 20 мкм в діаметрі. Негативний на сказ патологічний матеріал, фарбований дослідними ФАГ у цьому ж розведенні, не мав ознак світіння характерних для антигену вірусу сказу.

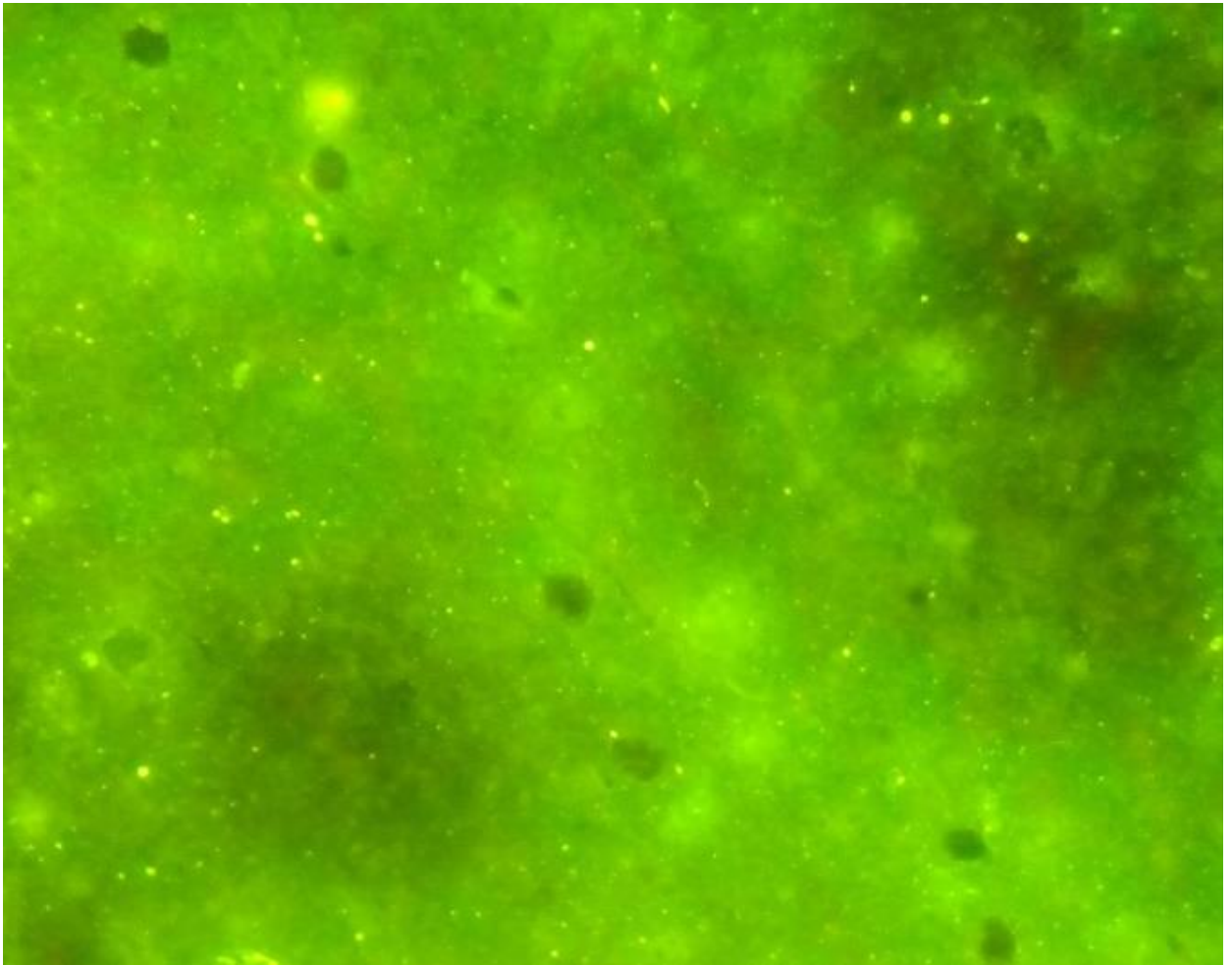


Рис. 5.10 Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований дослідним ФАГ, розведення 1:2, збільш. x200).

У тест-препаратах позитивного на сказ матеріалу, фарбованих дослідними ФАГ в розведенні 1:16, відмічали наявність характерних яскравих жовто-зелених включень в нейронах та поза межами їх, у кількості 10 і більше в одному полі зору за збільшення x20, що є достатнім для оцінки світіння в чотири хрести та постановки позитивного діагнозу на сказ. Фон фарбованих мазків був тьмяно-зеленим, на якому чітко відмічали специфічне світіння.

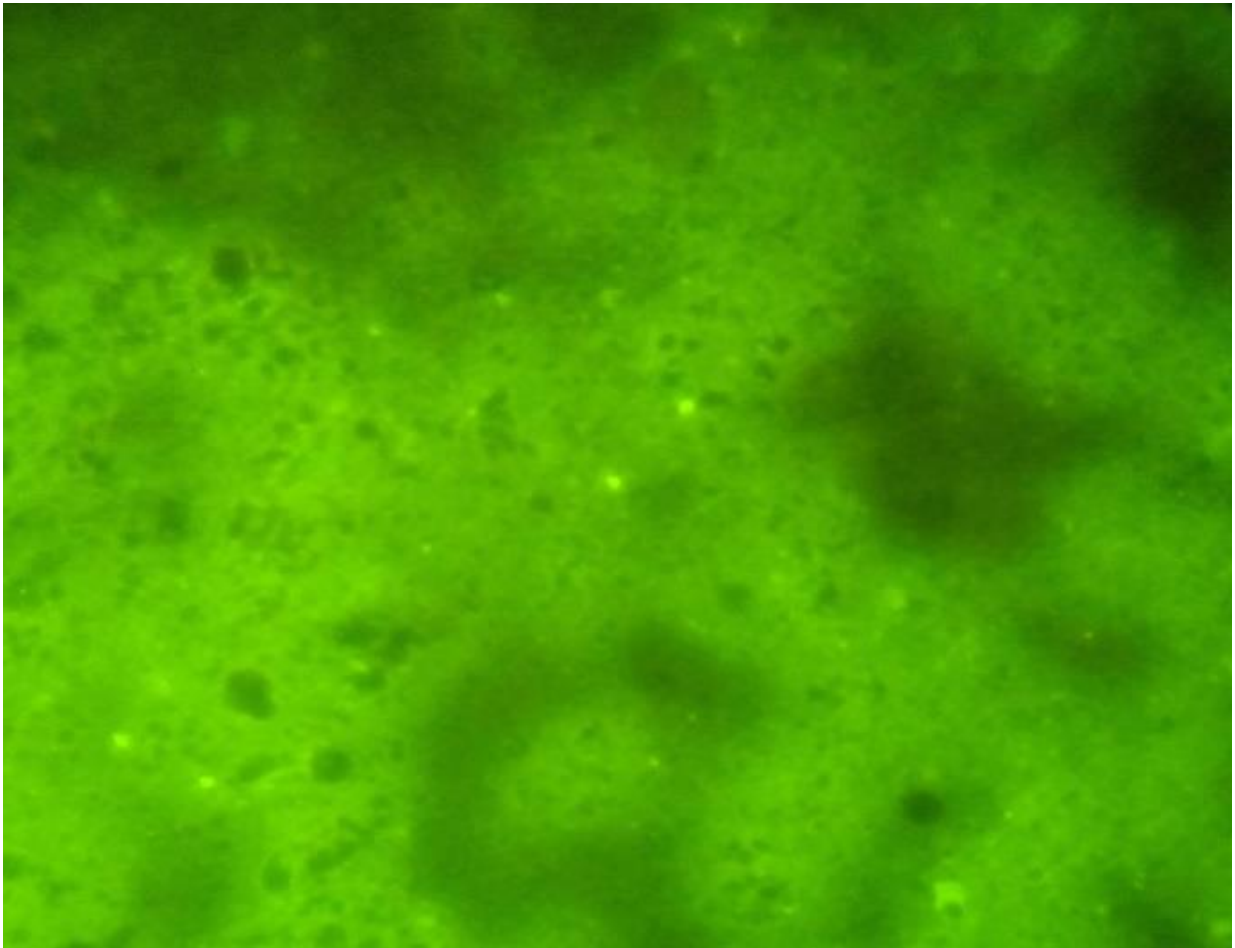


Рис. 5.11 Негативний на сказ пат. матеріал (мазок пофарбований дослідним ФАГ, розведення 1:2, збільш. x200).

Люмінесцентна мікроскопія мазків-відбитків головного мозку білих мишей, заражених референс-штамом вірусу сказу CVS, які були фарбовані дослідними ФАГ з концентрацією ФІТЦ 1,5 та 2 мг/100 мг білку, в розведеннях 1:16 та 1:32 також показала виражені включення характерного розміру та форми в клітинах та за їх межами з яскравим жовто-зеленим світінням в чотири хрести, однак за розведення 1:64 були виявлені лише поодинокі включення зі специфічним світінням (рис. 5.12).

За фарбування позитивних на сказ препаратів ФАГ з концентрацією ФІТЦ 1 мг/100 мг білку в розведенні 1:32 інтенсивність світіння виявляли на рівні одного-двох хрестів (рис. 5.13).

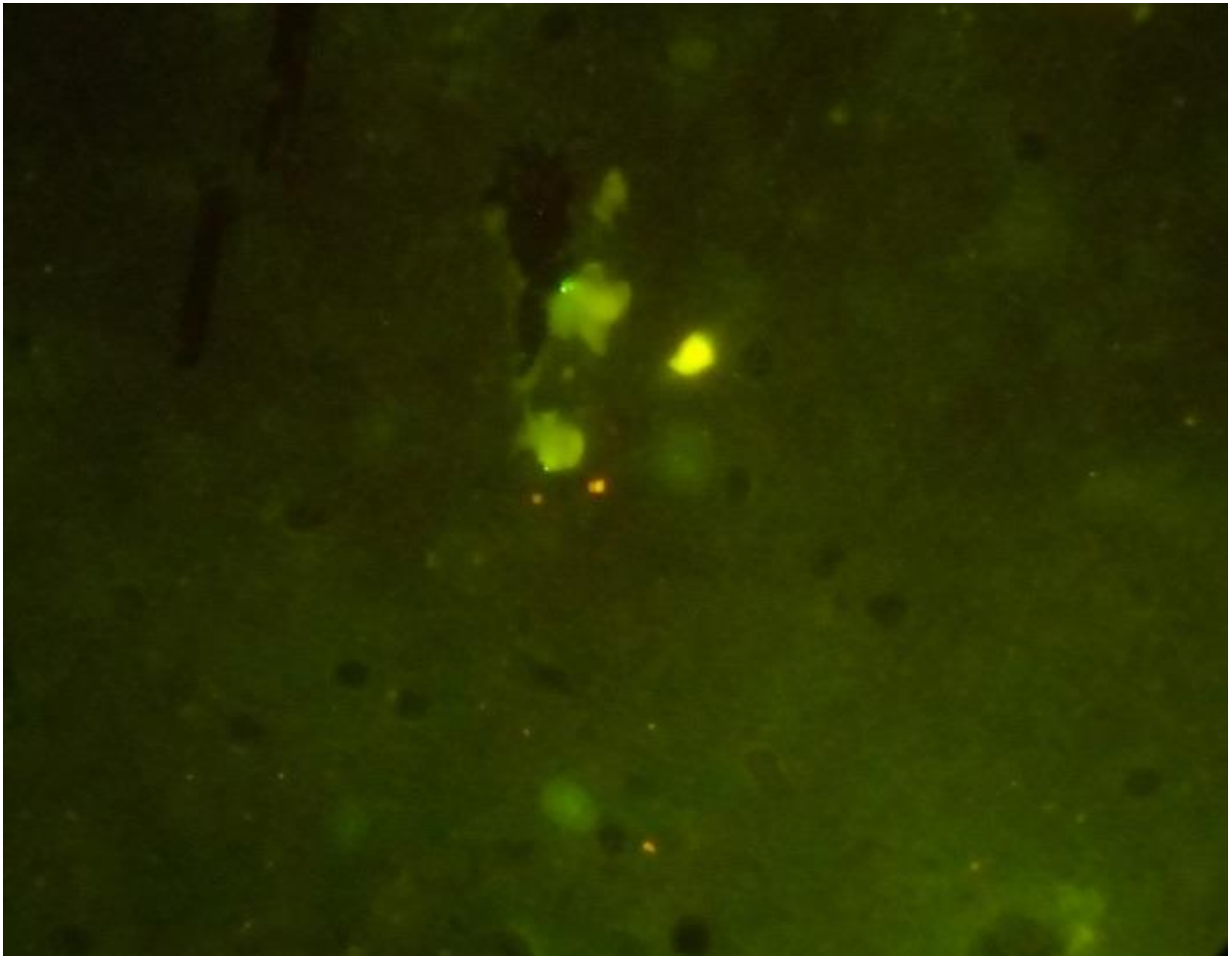


Рис. 5.12 Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок фарбований дослідним ФАГ, розведення 1:64, збільш. x 400).

На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що всі отримані нами зразки флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну є придатними для досліджень патологічного матеріалу на сказ в РПФ.

Оскільки за люмінесцентної мікроскопії тест-препаратів позитивного на сказ патологічного матеріалу, за збільшення x20 виявляли специфічне світіння антигену вірусу сказу у вигляді яскравих включень зелено-жовтого кольору, а негативний контрольний препарат не мав специфічного для вірусу сказу світіння, можна стверджувати, що застосовані нами позитивний та негативний контрольні препарати є якісними.

Доведено, що оптимальна концентрація ФІТЦ для реакції кон'югації з антирабічним імуноглобуліном складає 1,5 мг/100 мг білку, оскільки за кон'югації специфічного білку з вищою концентрацією флуорохрому, в

результаті, отримали аналогічний за якістю препарат. Отриманий дослідний зразок діагностичного препарату мав «фарбуючий» титр 1:32.

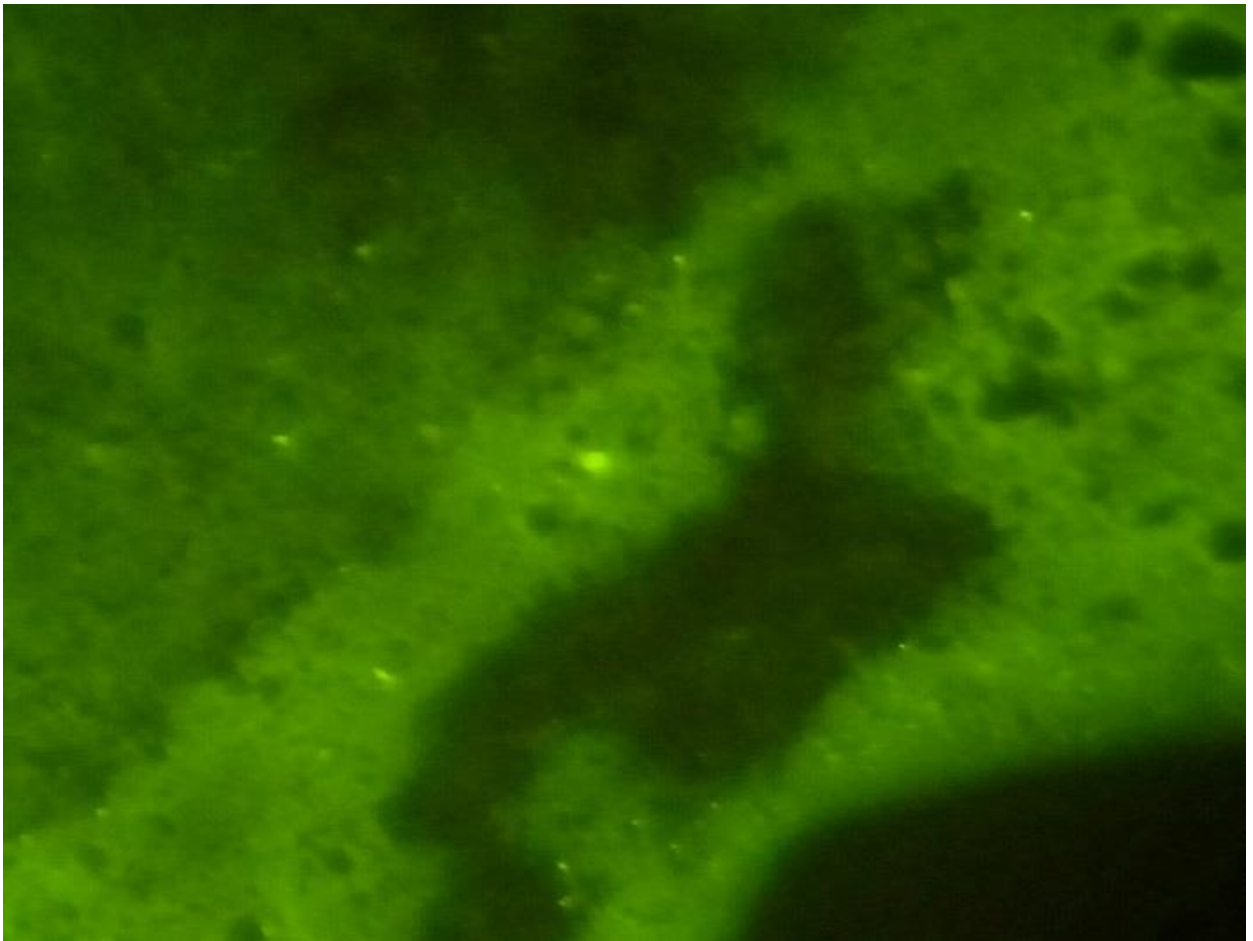


Рис. 5.13 Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок фарбований дослідним ФАГ, розведення 1:32, збільш. х 400).

Отже, дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну є активним, чутливим та специфічним до вірусу сказу.

Ліофілізація антирабічного флуоресціюючого імуноглобуліну.

Основним методом стабілізації та пролонгації специфічної дії багатьох імунобіологічних препаратів, що забезпечує збереження їх активності на тривалий час, є ліофільне висушування. Значними перевагами цього методу є те, що в результаті ліофілізації знижується маса препарату та припиняється ріст мікробних контамінантів. Крім того, ліофільно висушені імунобіологічні препарати можна зберігати за температури 2 – 8 °С.

В якості стабілізуючого середовища для ліофільного висушування кон'югату використовували підібране та апробоване нами середовище для Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну, яке містить сахарозу, гліцин, желатин та 0,1М ФСБ (рН 7,2 – 7,4) в рівних кількостях. В асептичних умовах фасували кон'югат, позитивний і негативний контрольні препарати у флакони по 1 см³ з розрахунку на 8 частин препарату 2 частини захисного середовища.

Після заморожування препаратів за температури $-80\pm 0,5$ °С впродовж 10 год, проводили їх висушування у вакуумно-сушильній установці Alpha 1 – 4, виробництва фірми Martin Christ GmbH (Німеччина).

Для дослідження відбирали по одному флакону кожного препарату. За візуального огляду виявили, що в усіх зразках була сформована специфічна таблетка. Масова частка вологи в препаратах була в межах 1 – 4%, вміст ампул повністю розчинявся впродовж 1 хвилини.

Далі, для визначення активності та чутливості кон'югату, проводили постановку РПФ із застосуванням фізичного методу фіксації мазків-відбитків мозкової тканини.

Рівень чутливості ФАГ вважали його робочим розведенням. Робочим вважали розведення кон'югату на порядок нижче «фарбуючого» титру, за якого знаходять яскраве жовто-зелене світіння цитоплазми клітин позитивних тест-препаратів з інтенсивністю на три – чотири хрести.

За результатами люмінесцентної мікроскопії мазків мозкової тканини, фарбованої діагностикомом з розробленої нами тест-системи в розведенні 1:16, виявляли специфічне для вірусу сказу жовто-зелене світіння гранул округлої та овальної форми різних розмірів, яке візуально оцінили в чотири хрести, негативний до вірусу сказу мазок не мав ознак специфічного світіння, фон був зафарбований в темно-зелений колір.

Отже, «фарбуючий титр» дослідного ФАГ, повторно дослідженого після ліофілізації, складав 1:16, а робоче розведення кон'югату – 1:8.

Для відсоткового вираження діагностичної чутливості (DSe) та діагностичної специфічності (DSp) отриманого діагностикуму досліджували в РПФ 60 зразків головного мозку від різних видів тварин із підтвердженим діагнозом на сказ із колекції патологічних матеріалів лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН та 5 негативних на сказ патологічних матеріалів.

За тестування 60 завідомих позитивних на сказ зразків, виявили позитивними в РПФ 58. Два зразки мали світіння на рівні 1 – 2 хрестів, тобто сумнівний результат реакції, тому були зараховані до негативних, оскільки дослідження передбачає лише наявність позитивного та негативного результатів. Негативний на сказ діагноз 5-ти досліджуваних в РПФ зразків був на 100% підтверджений.

Отже, діагностична чутливість (DSe) виготовленого нами кон'югату, за результатами математичних обчислень, складала 96,6%, а діагностична специфічність (DSp) – 100% (згідно норм вказаних в WOAH Manual, 2023 [286] вказані показники мають становити не менше 95%).

За результатами проведених досліджень розроблено технологічний регламент виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу» (затверджений Вченою радою ІВМ, протокол № 10 від 11 жовтня 2016 р.).

Результати підрозділу 5.3 висвітлені в наукових працях [293, 51, 30, 32].

5.4. Отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць

Перспективним методом отримання специфічного імуноглобуліну є використання Ig Y, виділеного з яєць птахів, оскільки Ig Y є домінуючим класом антитіл в сироватці крові, який продукується після Ig M за первинної гуморальної відповіді і є головним ізотипом за вторинної імунної відповіді, що визначає його функціональну схожість з Ig G ссавців.

Отримання специфічних до вірусу сказу Ig Y з перепелиних яєць та їхня оцінка в серологічних тестах (ІФА, РН та FAVN-тест).

Для отримання Ig Y з перепелиних яєць першим етапом було проведення гіперімунізації перепілок. Для цього було сформовано дві групи 6-місячних перепелів, яким використовували наступні антигени вірусу сказу:

1 група (зразок 1) – інактивована антирабічна вакцина IndiRab, виробництва Bharat Biotech International Limited (Індія). Імунізуючий антиген – штам G 52 Wistar;

2 група (зразок 2) – інактивований β -пропіолактоном позбавлений тканинного детриту вірус сказу, штам CVS-11 (отриманий у лабораторних умовах в культурі клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10), вихідний інфекційний титр вірусу $6,23 \pm 0,11$ ТКІД₅₀/0,05 см³).

Для першої імунізації відбирали препарати по 0,5 см³ додавали рівний об'єм повного ад'юванту Фрейнда (Imject). Ретельно перемішували до утворення однорідної емульсії білого кольору. Препарати антигену вводили внутрішньом'язово, в грудну частину в декілька точок. На 10 і 20 день імунізацію повторювали, антигени готували аналогічно як і при першій імунізації, але з додаванням неповного ад'юванту Фрейнда (Imject).

Починаючи з 35-ї доби від першої імунізації почали відбір яєць, з яких після проведення виділення, очистки та концентрування Ig Y були отримані два зразки імуноглобулінів:

- зразок № 1 (G 52 Wistar) з концентрацією 30,0 мг/см³;
- зразок № 2 (CVS-11) з концентрацією 19,5 мг/см³.

Специфічність виділених антитіл перевірили непрямим варіантом ІФА, використовуючи відповідні антигени для сенсibilізації планшет (табл. 5.10).

Таблиця 5.10

Специфічна активність антирабічних Ig Y в ІФА

№ з\п	Жовткові антитіла, Ig Y	Антигени		
		G 52 Wistar	CVS-11	G:N
1.	Ig Y G 52 Wistar	0,226	1,012	0,037
2.	Ig Y CVS-11	0,158	1,541	0,337
3.	Ig Y DS1802 (негативний контроль)	0,014	0,145	0,035

З результатів представлених в табл. 5.10 видно позитивну кореляцію між антигеном, який використовували для імунізації та специфічною імунною відповіддю, що підтверджувало наявність антирабічних антитіл в отриманих зразках, при цьому встановлено найбільший показник титру антитіл при використанні як антигену вірусу сказу штаму CVS-11. Крім того, саме антитіла проти лабораторного штаму CVS-11 реагували також із рекомбінантним химерним пептидом вірусу сказу G:N, що містить віруснейтралізуючі епітопи глікопротеїну та нуклеопротеїну вірусу сказу.

Враховуючи отримані позитивні результати в скринінгових дослідженнях методом ІФА, наступним етапом була оцінка безпосередньої віруснейтралізуючої активності концентрованих (Ig Y G 52 Wistar 30 мг/см³ і Ig Y CVS-11 19,5 мг/см³) дослідних зразків антирабічних Ig Y (табл. 5.11).

Так, при дослідженні в РН на білих мишах зразок № 1 володів специфічною активністю на рівні 26,25 МО/см³, а зразок № 2 – 81,25 МО/см³ порівняно із Другим міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну людини.

Таблиця 5.11

Специфічна активність концентрованих Ig Y в РН на білих мишах

Імуноглобулін	Розведення	Абсолютні дані, гол		Ефективна доза, - lg ED ₅₀	Титр антитіл, МО
		загинуло	вижило		
Ig Y G 52 Wistar	1:200	0	14	3,10	81,25
	1:400	0	14		
	1:800	0	14		
	1:1600	12	2		
Ig Y CVS-11	1:200	4	10	2,62	26,25
	1:400	6	8		
	1:800	10	4		
	1:1600	14	0		
Другий міжнародний стандарт антирабічного Ig (30 МО/см ³)	1:200	4	10	2,68	30,00
	1:400	6	8		
	1:800	12	2		
	1:1600	8	4		

Дослідження концентрованих дослідних зразків антирабічних Ig Y в FAVN-тест продемонструвало тотожні результати: титр зразку 1 був в межах 23,39-30,83 МО/см³, а зразку № 2 70,63-93,10 МО/см³ відносно стандартної позитивної антирабічної сироватки крові ВООЗТ.

Отримання, перевірка активності та специфічності антирабічних ФІТЦ-глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць.

Наступним етапом досліджень було встановлення можливості використання антирабічних Ig Y у діагностиці сказу тварин. Для цього дослідні зразки антирабічного Ig Y після мічення ФІТЦ і очистки досліджували в РПФ. В фарбованих препаратах мозкова тканина світилась тусклим, сірвато-жовтим чи зеленуватим кольором. Антиген вірусу сказу виявляли в нейронах і за

межами клітин у вигляді яскравих зелених гранул різної форми (округлої, овальної) і величини – від ледь помітних до 15-20 мкм в діаметрі.

Дослідження мазків-відбитків головного мозку білих мишей, попередньо інфікованих вірусом сказу (штам CVS), фарбованих контрольним препаратом – ФАГ (глобулін антирабічний флуоресціюючий «РАБІТЕСТ-РІФ (RABITEST-FAT)», виробництва Біотестлабораторія, Україна), показало яскраве жовто-зелене світіння достатньої кількості гранул округлої форми в різних полях зору мікроскопу, що дало змогу оцінити проби в чотири хрести. Негативний контроль – мазок-відбиток з мозку здорової білої лабораторної миші, раніше не вакцинованої проти сказу, при люмінесцентній мікроскопії включень подібного світіння не мав. Сама ж мозкова тканина світилась зеленуватим кольором.

Дослідний зразок Ig Y CVS-11 в розведенні 1:2 при люмінесцентній мікроскопії позитивного на сказ матеріалу мав виражені включення характерного розміру та форми в клітинах та за їх межами з яскравим жовто-зеленим світінням в чотири хрести (рис. 5.14).

При дослідженні під люмінесцентним мікроскопом позитивного матеріалу на сказ покрашеного флуоресціюючим Ig Y CVS-11 в розведенні 1:4 виявляли поодинокі яскраво жовто-зелені світіння. В подальших двократних розведеннях (1:8 і 1:16) не було виявлено включень з характерним світінням, на підставі чого можна зробити висновок, що Ig Y CVS-11 має робоче розведення лише 1:2.

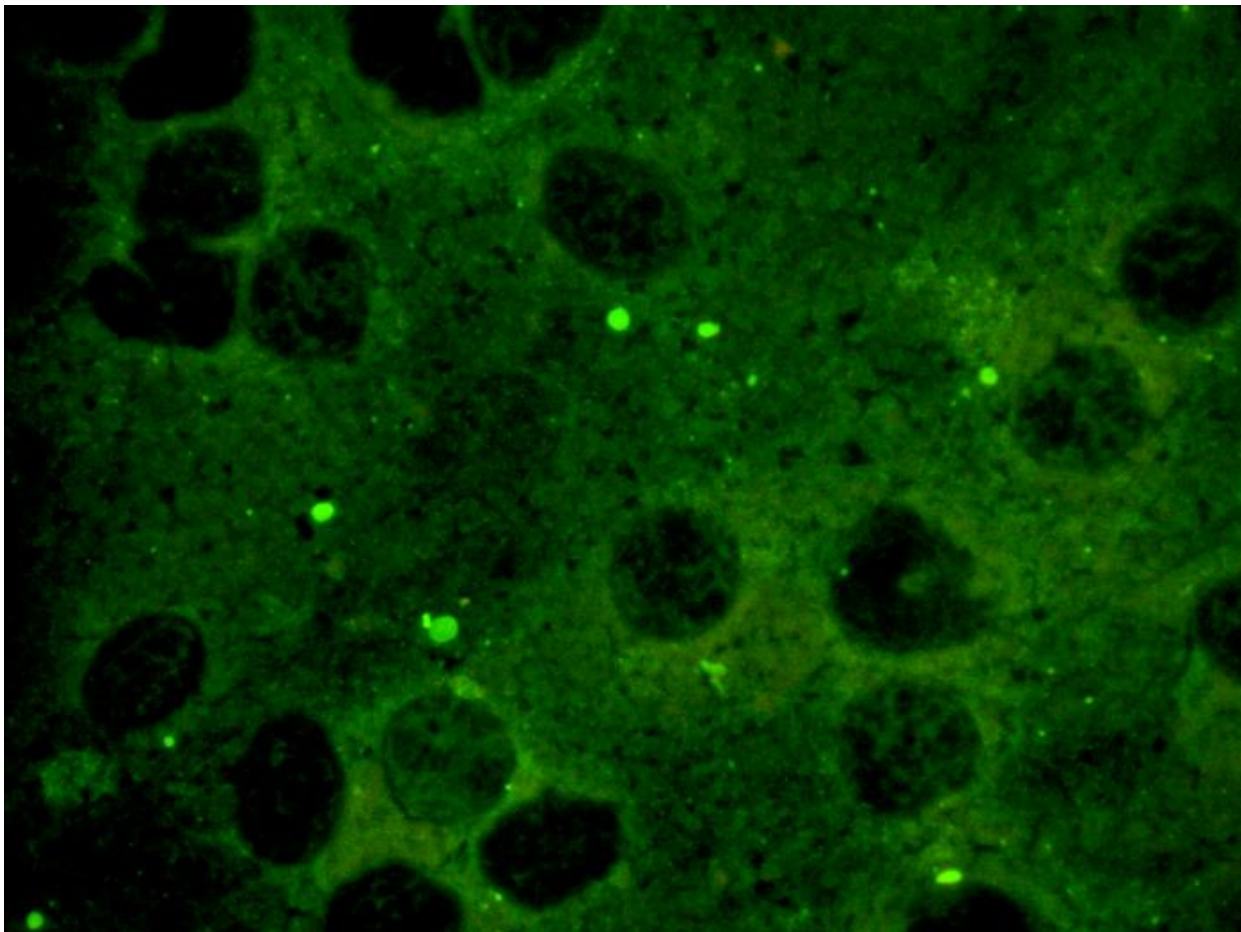


Рис. 5.14 Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок покрашений ФІТЦ-Ig Y CVS-11, робоче розведення 1:2, збільш. x1000).

Негативний на сказ патологічний матеріал покрашений флуоресціюючим імуноглобуліном не мав ознак світіння характерних для антигену вірусу сказу (рис. 5.15).

Флуоресціюючий імуноглобулін Ig Y G 52 Wistar в усіх розведеннях був неактивним.

Аналізуючи отримані результати, варто зазначити, що дослідження в РПФ зразків антирабічних Ig Y з перепелиних яєць мічених ФІТЦ показали специфічність Ig Y отриманого на антиген вірусу сказу штаму CVS-11, однак із недостатньою активністю робочого розведення – лише 1:2.

Проведена нами інша серія дослідів щодо отримання антирабічних Ig Y з курячих яєць за розробленою схемою гіперімунації взагалі не продемонструвало перспективності цього підходу. Схема гіперімунації була

наступна: 0 день – по 1 см^3 (1:1 20 % суспензія інактивованого вірусу сказу, штам CVS-11 + повний ад'ювант Фрейнда); 14 день – по 1 см^3 (1:1 20 % суспензія інактивованого вірусу сказу, штам CVS-11 + неповний ад'ювант Фрейнда); 28 день – по 1 см^3 (1:1 20 % суспензія інактивованого вірусу сказу, штам CVS-11 + неповний ад'ювант Фрейнда); 60 день – 1 см^3 (1:1 20 % суспензія інактивованого вірусу сказу, штам CVS-11 + повний ад'ювант Фрейнда).

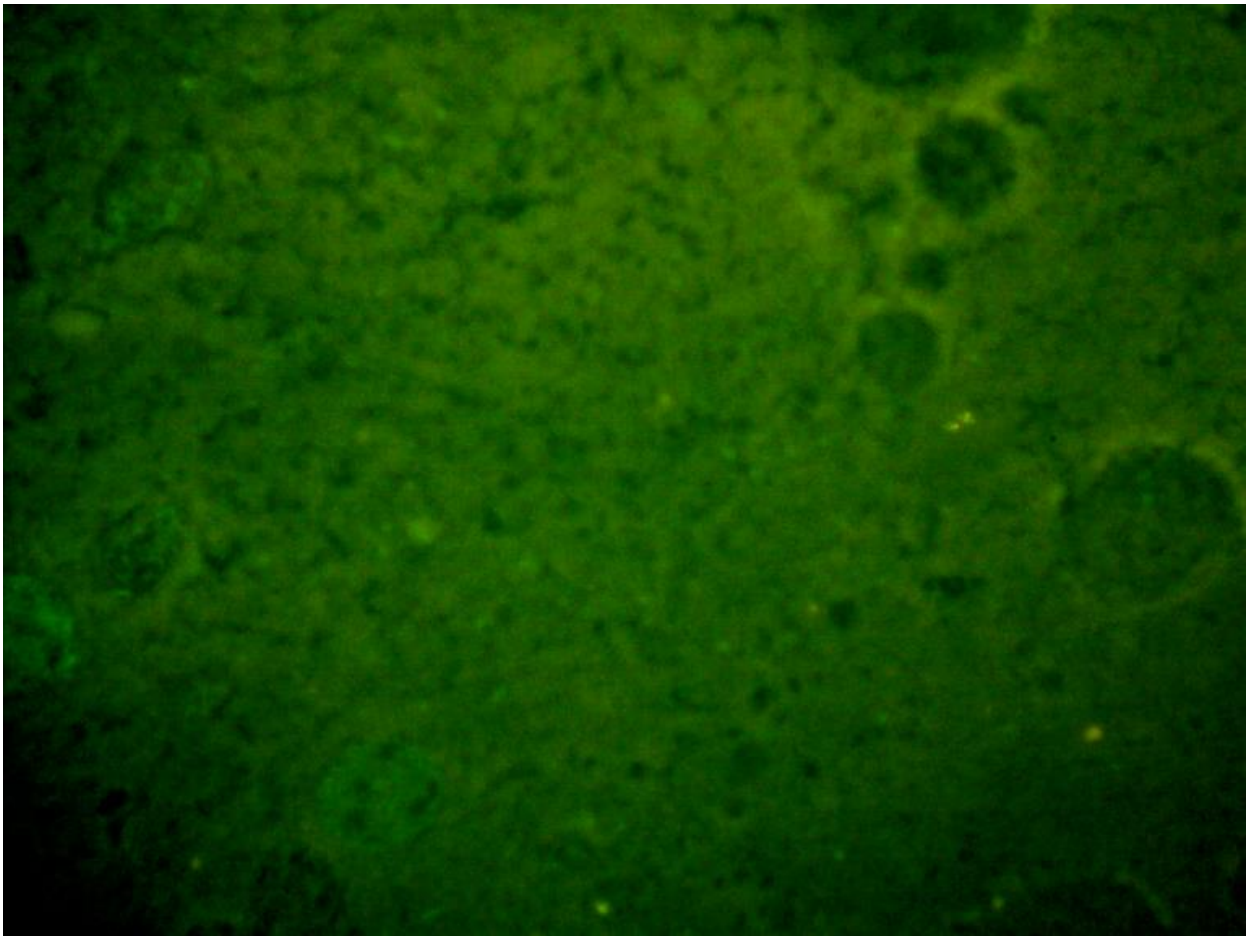


Рис. 5.15 Негативний на сказ пат. матеріал (мазок покрашений ФІТЦ-Ig Y CVS-11, робоче розведення 1:2, збільш. x1000).

Після очистки і концентрування антирабічних Ig Y з курячих яєць перевіряли титр дослідних зразків у реакції FAVN-тест. Однак, найвищий титр до вірусу сказу усіх дослідних зразків протягом усього періоду спостереження (90 днів після останнього введення суспензії інактивованого вірусу сказу штаму

CVS-11) становив $6,01 \text{ МО/см}^3$, що є недостатнім для проведення кон'югування з ФІТЦ.

Отже, проведені нами дослідження встановили принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу. Однак впровадження цього підходу в промислове виробництво вимагає проведення додаткових досліджень задля удосконалення схеми гіперімунізації птиці, а також вимагає методики і принципів очистки і концентрування отриманих з яєць специфічних імуноглобулінів.

Результати підрозділу 5.4 висвітлені в науковій праці [43].

5.5. Порівняльна характеристика фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної діагностики сказу

Передумовою для проведення порівняльних досліджень фіксації мазків-відбитків як підготовчого етапу РПФ стало визначена необхідність в ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу» застосування ацетону. Так як ацетон є прекурсором, це вимагає спеціальних дозволів та умов його зберігання, відпуску та утилізації, що додає навантаження для лабораторних фахівців при здійсненні фіксації мазків-відбитків.

Для дослідження використовували 65 зразків головного мозку тварин із колекції патологічних матеріалів лабораторії нейроінфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН. Всі патологічні матеріали були визнані позитивними на сказ в РПФ регіональними лабораторіями ветеринарної медицини. Крім того, у 60-ти з них був підтверджений діагноз ЗТ-ПЛР з використанням праймерів, які комплементарні до гену нуклеопротеїну вірусу сказу JW6DPL (позиція 660-641) та JW12 (позиція 55-73).

З кожного патологічного матеріалу робили 4 мазки-відбитки з двох різних ділянок мозку (по 2 відбитки на скельце). Фіксацію мазків-відбитків проводили за двома методиками:

- фізичний: висушували двократно проводячи скельце з обох боків над полум'ям спиртівки;
- хімічний: занурювали в ацетон за температури – 20 °С на 30 хв.

Далі проводили дослідження відповідно до Методів лабораторної діагностики сказу [121].

Мазки-відбитки фарбували глобуліном антирабічним флуоресціюючим «РАБИТЕСТ-РІФ (RABITEST-FAT)» (Біотестлабораторія, Україна). Люмінесцентну мікроскопію проводили в день фарбування мазків при збільшенні x200, x400 та під імерсійною системою при збільшенні x1000 за допомогою мікроскопу Leica (Німеччина). Результат дослідження на сказ вважали позитивним за наявності в досліджуваних препаратах специфічного світіння з інтенсивністю 3 – 4 хрести.

В результаті тестування 65-ти зразків патологічного матеріалу, які попередньо були досліджені в РПФ в обласних лабораторіях ветеринарної медицини, а у 60-ти випадках діагноз був підтверджений методом ЗТ-ПЛР, з'ясували, що за фіксації мазків-відбитків мозкової тканини ацетоном та над полум'ям спиртівки отримали тотожні результати (табл. 5.12).

Таблиця 5.12

Дослідження патологічного матеріалу в РПФ за фіксації мазків-відбитків мозкової тканини різними методами

Результат реакції	Фіксація мазків-відбитків ацетоном	Фіксація мазків-відбитків над полум'ям спиртівки	Результат дослідження в ЗТ-ПЛР
Позитивний	60	60	60
Негативний	2	4	5
Сумнівний	3	1	-

60 зразків із 65-ти досліджуваних виявились позитивними на сказ за фіксації обома методами, на відміну від результатів отриманих в регіональних лабораторіях ветеринарної медицини. Цей факт можна пояснити тим, що РПФ є суб'єктивною реакцією, тому багато в чому результат залежить від досвіду та кваліфікації дослідника, а також від вибраної для дослідження ділянки головного мозку.

Із 5-ти зразків, які були визнані негативними на сказ методом ЗТ-ПЛР, негативними в РПФ виявились 2 зразки за фіксації ацетоном та 4 за фіксації над полум'ям спиртівки. Сумнівним результат вважали у трьох зразках, які були фіксовані ацетоном та у одного, який був фіксований над полум'ям спиртівки.

Отримані результати свідчать про ідентичність якості мазків-відбитків за фіксації обома способами. Однак, фіксація над полум'ям спиртівки значно скорочує час постановки реакції та не потребує використання ацетону, який є небезпечною хімічною речовиною, що вимагає спеціальних заходів для його зберігання, обробки та утилізації.

Результати підрозділу 5.5 висвітлені в науковій праці [294].

5.6. Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні

В Україні рутинна лабораторна діагностика сказу проводиться виключно в регіональних лабораторіях Держпродспоживслужби та Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ). Усі регіональні лабораторії Держпродспоживслужби та ДНДІЛДВСЕ акредитовані відповідно до вимог міжнародного стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ISO/IEC 17025:2017, IDT)», що є невід'ємною складовою процедури визнання результатів випробувань, які вони здійснюють.

Спираючись на практику зарубіжних органів з акредитації, враховуючи вимоги нормативних документів, в тому числі міжнародних, одним із головних критеріїв оцінки технічної компетентності лабораторій при акредитації відповідно ДСТУ ISO/IEC 17025 є результати їхньої участі в раундах міжлабораторних порівняльних випробувань (МПВ). МПВ – це комплекс заходів, що складається з організації, проведення та оцінки випробувань на однакових або подібних контрольних зразках двома або більше лабораторіями відповідно до заданих умов.

Перевірка професійного рівня – це використання окремими лабораторіями результатів МПВ для визначення рівня виконання вимог стандартів ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 або ДСТУ EN ISO 15189:2015 щодо якості результатів певних випробувань, калібрувань, досліджень. Тому участь в раундах МПВ є обов'язковим та невід'ємним елементом зовнішнього контролю якості досліджень у випробувальній або калібрувальній лабораторії та відіграють важливу роль як під час акредитації лабораторії, так і під час її функціонування.

Участь у програмах перевірки професійного рівня надає лабораторіям-учасникам можливість оцінити їхню спроможність отримувати вірогідні результати випробувань, постійно демонструвати високий рівень проведення

випробувань і підвищити якість результатів випробувань, калібрувань, досліджень. Також участь у програмах МПВ надає можливість удосконалювати власні внутрішні процедури контролю достовірності результатів у лабораторіях, надаючи додаткову зовнішню оцінку їх спроможностей щодо вимірювань, калібрувань, досліджень.

В Україні проводяться національні раунди МПВ, з яких провідним у галузі ветеринарної медицини є програма «ВЕТ-ТЕСТ», що включена до офіційного переліку національних координаторів та програм МПВ Національного агентства з акредитації України (<https://naau.org.ua/reyestr-akreditovanih-ooov>), а розробником і координатором цієї програми є ДНДІЛДВСЕ. Програма «ВЕТ-ТЕСТ» охоплює численні показники безпечності продуктів харчування та кормів, а також лабораторну діагностику захворювань тварин інфекційної етіології, що проводиться відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014. «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації лабораторій (EN ISO/IEC 17043:2010, IDT)».

Одним із базових елементів належної реалізації програми «ВЕТ-ТЕСТ» є створення та науково-експертна оцінка придатності контрольних зразків, а саме: однорідність, стабільність, спосіб відбору проб, ідентифікація і маркування, правила поводження зі зразками, встановлення критеріїв точності оцінки результатів.

До 2019 року контрольні зразки для раундів МПВ виготовлялися з наявних позитивних зразків біологічного матеріалу (польових матеріалів), що надходили на лабораторні дослідження при підозрі на сказ тварин. Однак, забезпечення необхідної якості контрольних зразків, за результатами наших наукових досліджень, є можливим лише за використання стандартизованих процедур та матеріалів. Основним таким матеріалом може бути референс-штам вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR-959, «ChallengeVirus Standard»).

Для проведення раунду МПВ «Виявлення антигену збудника сказу» нами було визначено матрицю. В якості матриці обрано мазки-відбитки з суспензії

головного мозку білих мишей, найменування показника – відсутність або наявність антигену вірусу сказу.

Для отримання «якісного» вірусу сказу з мозкової суспензії із мінімальною кількістю дефектних інтерферуючих часток (ді-часток) проведено отримання та визначення інфекційної активності референс-штаму вірусу сказу CVS–11 в культурі клітин ВНК-21 С13 (табл. 5.13).

Таблиця 5.13

Інфекційна активність вірусу сказу, штам CVS-11 (ATCC VR 959) в культурі клітин ВНК–21 С13 (ATCC CCL-10), n=3, M±m

№ п/п	№ пасажу вірусу	Log розведення	Кількість позитивних лунок	Титр вірусу, TCID ₅₀	
				/ 0,05 см ³	/ 1,0 см ³
1	6 пасаж	4,80	4	5,10	6,40
2		4,20	7	4,95	6,25
3		4,80	4	5,10	6,40
Середнє значення		-	-	-	6,35±0,06

Титруванням встановлено, що інфекційна активність вірусу сказу (штам CVS-11) 6-го пасажу становила 6,35±0,06 TCID₅₀/см³.

Розрахункова інфікуюча доза вірусу сказу для зараження лабораторних мишей становить 100 TCID₅₀ на голову. Для обчислення відповідного розведення вірусу від визначеного інфекційного титру (6,35±0,06 TCID₅₀/см³) значення зменшували на log 100 та log зменшення об'єму до 0,03 см³ (об'єм вірусомісної суспензії при інфікуванні однієї миші). У результаті отримали значення 2,83, що відповідає розведенню вірусу 1:676, тобто при такому розведенні в 0,03 см³ міститься 100 TCID₅₀ вірусу сказу штаму CVS–11.

Наступним етапом було проведення інфікування білих мишей, отримання мозкової суспензії та виготовлення мазків-відбитків. Загибель білих мишей спостерігали у дослідній групі, що становило 100 % – на 6 (2/10), 7 (7/8) та 8

(1/1) добу з характерними клінічними ознаками. У контрольній групі стан тварин був задовільний упродовж дослідження.

Після отримання мозкової суспензії від тварин контрольної та дослідної груп провели ідентифікацію вірусу сказу в РПІФ з використанням FITC Anti-Rabies Globulin Kit (рис. 5.16) та тест-систему ФАГ «РАБІТЕСТ-РІФ (RABITEST-FAT)» (рис. 5.17).

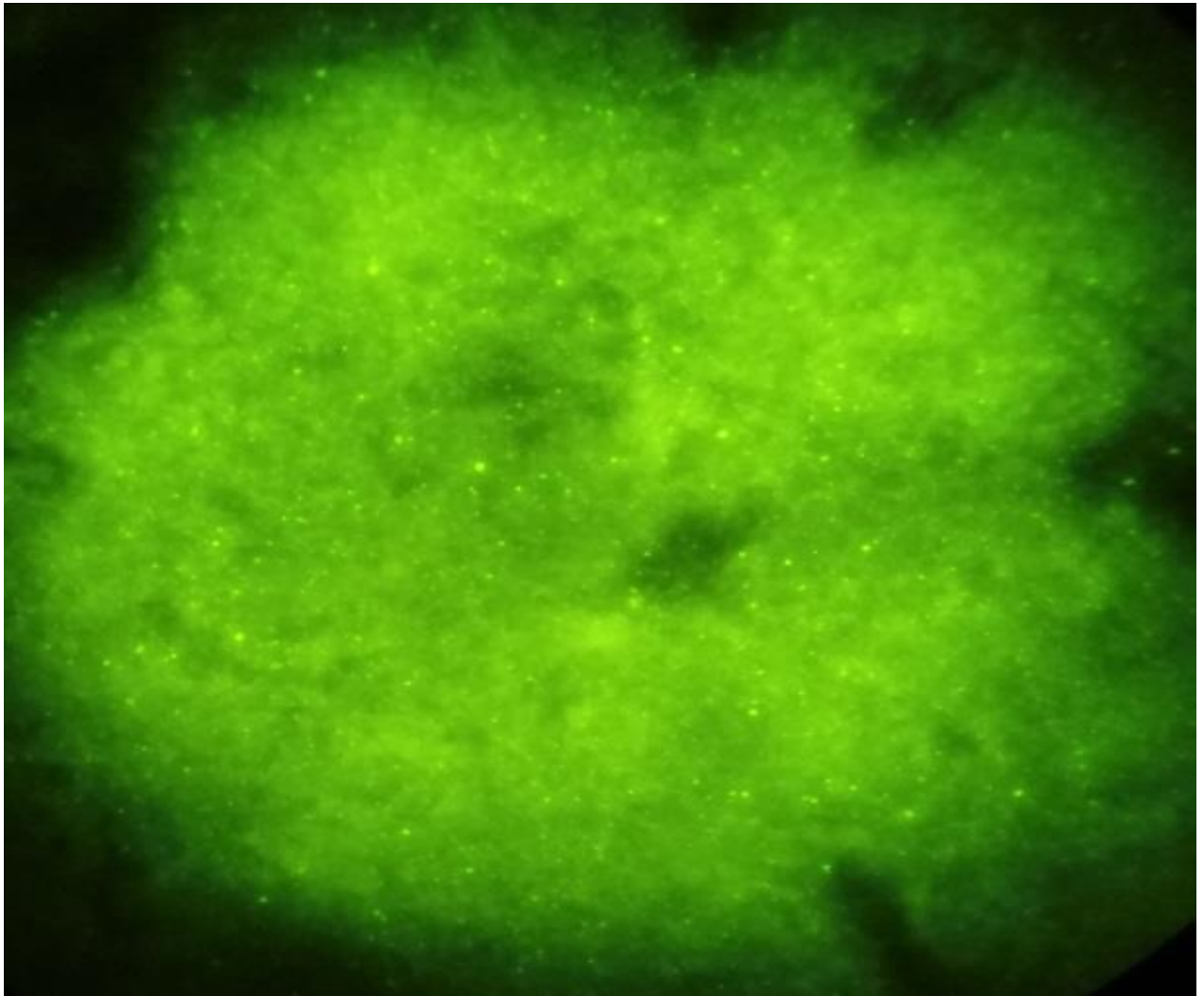


Рис 5.16 Люмінісцентна мікроскопія мазків-відбитків (мазок фарбований FITC Anti-Rabies GlobulinKit, розведення 1:40, збільш. x 200).

У мазках-відбитках позитивного на сказ матеріалу відмічали наявність характерних яскравих жовто-зелених включень у кількості 10 і більше в одному полі зору за збільшення x200, що є достатнім для оцінки світіння в чотири хрести та постановки позитивного діагнозу на сказ. Фон фарбованих мазків був

тьмяно-зеленим, на якому чітко відмічали специфічне світіння. Негативний на сказ патологічний матеріал (контрольна група) не мав ознак характерного світіння.

Враховуючи придатність матеріалу, було виготовлено 120 контрольних зразків: 90 мазків-відбитків з позитивного матеріалу та 30 негативних контрольних зразків.

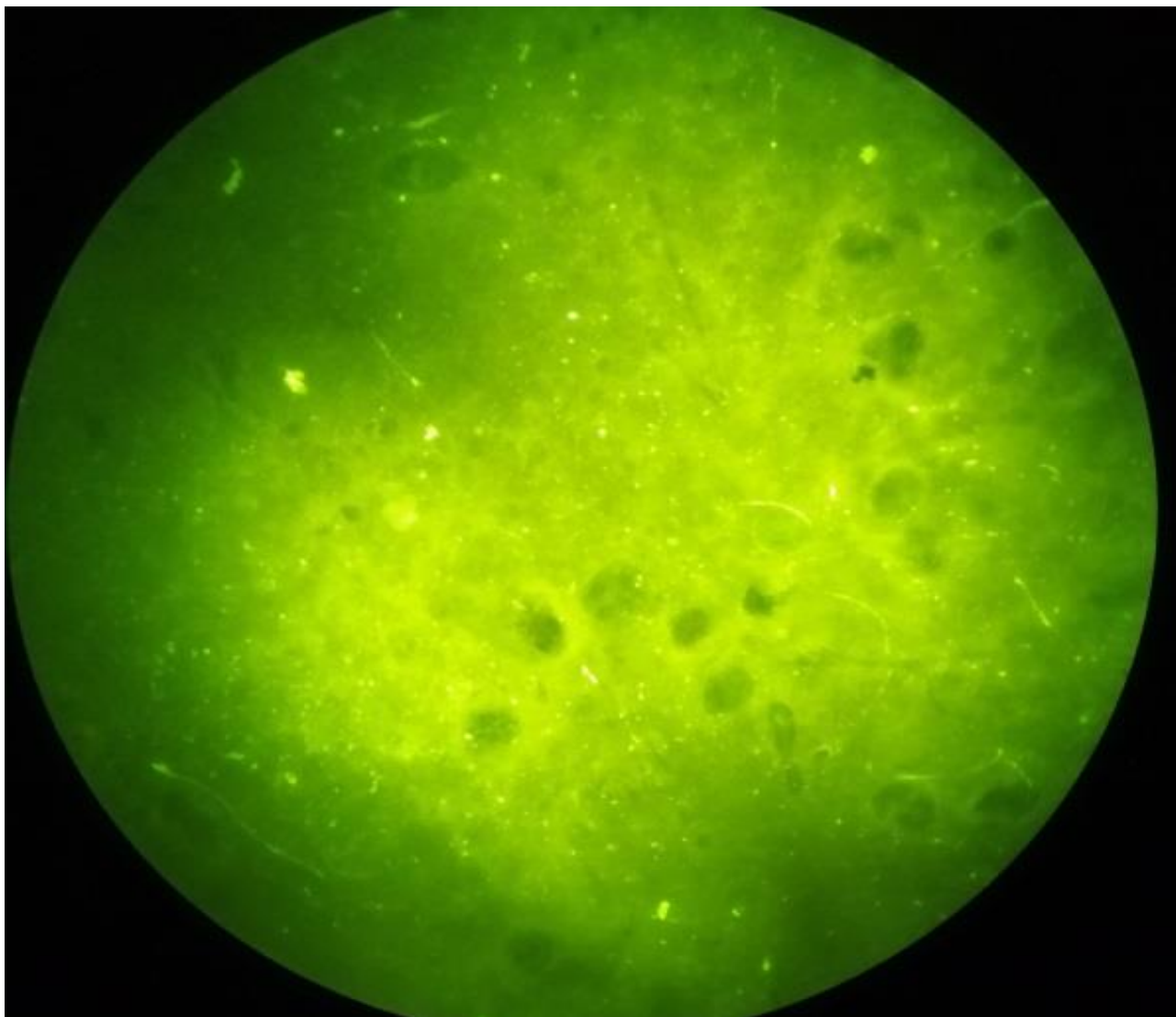


Рис 5.17 Люмінісцентна мікроскопія мазків-відбитків (мазок фарбований ФАГ «РАБІТЕСТ-РІФ (RABITEST-FAT)»), розведення 1:16, збільш. x 200).

Для забезпечення достовірності результатів, характеристику виготовлених контрольних зразків проводили одночасно три фахівці із закодованими значеннями (табл. 5.14).

Таблиця 5.14

Характеристика контрольних зразків та оцінка матриці

№ п/п	Прописне значення контрольного зразку	Результат			Якісна діагностична оцінка	Однорідність
		1	2	3		
1	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
2	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
3	Негативний	Н	Н	Н	–	задовільна
4	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
5	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
6	Негативний	Н	Н	Н	–	задовільна
7	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
8	Позитивний	П	П	П	++++	задовільна
10	Негативний	Н	Н	Н	–	задовільна

Примітки: П – позитивний мазок-відбиток; Н – негативний мазок-відбиток.

Усі виготовленні контрольні зразки, що були досліджені, відповідали своїм прописним значенням та були придатними для проведення раунду. Результати, отримані трьома фахівцями при одночасному дослідженні були тотожними. Усі препарати були однорідними та якість контрольних зразків усіма дослідниками суб'єктивно оцінена як «задовільна».

Одним з обов'язкових елементів характеристикації контрольних зразків є визначення стабільності. Дослідження проводили відповідно до актуалізованої робочої інструкції: в умовах зберігання контрольних зразків і моделюючи умови транспортування за температури $+4\pm 2$ °С. Дослідження стабільності довільно обраних трьох контрольних зразків (2 позитивні та 1 негативний) проводилися в проміжок часу між його розподілом і впродовж всього рекомендованого терміну дослідження лабораторіями-учасницями (табл. 5.15).

Таблиця 5.15

Визначення стабільності контрольних зразків

№ п/п	Доба	Умови зберігання	Контрольний зразок	Результат	Оцінка препарату, +/-	Якість препарату
1	Перший день видачі зразків учасникам	– 18±2 °С	Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Негативний	Негативний	–	задовільна
2	10 день	+ 4±2 °С	Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Негативний	Негативний	–	задовільна
3	10 день	– 18±2 °С	Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Негативний	Негативний	–	задовільна
4	Останній день досліджень учасниками	– 18±2 °С	Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Позитивний	Позитивний	++++	задовільна
			Негативний	Негативний	–	задовільна

Проведені дослідження показали, що створені контрольні зразки є стабільними протягом проведення раунду не залежно від температурного режиму зберігання (мінус 18 ± 2 °C або $+ 4 \pm 2$ °C).

Результати проведених досліджень з характеристикації контрольних зразків були визнані задовільними у 2021 р., що було підставою визнання результатів раунду МПВ «Виявлення антигену збудника сказу».

В 2021 році участь у раунді № 2165 «Виявлення антигену збудника сказу» прийняли 18 лабораторій. Разом з контрольними зразками учасники МПВ отримували «Інструкцію для учасників» та «Протокол учасника» для надання результатів випробувань. Отримані результати випробувань контрольних зразків надсилались координатору (ДНДІЛДВСЕ) та порівнювалися з приписними значеннями. Результат вважався задовільним, у випадку, якщо результати випробувань лабораторії-учасника співпадали з приписним значенням. Усі учасники раунду № 2165 «Виявлення антигену збудника сказу» дослідили контрольні зразки, вчасно надали координатору результати відповідно до встановленої форми та отримали результат «ВІДПОВІДАЄ».

Отже, впроваджені нами методичні підходи створили умови для розширення сфери акредитації Випробувального центру ДНДІЛДВСЕ відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014 на показник «Виявлення антигену збудника сказу». В 2021 і 2022 році раунд МПВ «Виявлення антигену збудника сказу» було проведено відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014. «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації лабораторій (EN ISO/IEC 17043:2010, IDT)».

Результати підрозділу 5.5 висвітлені в науковій праці [68].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 5

У ході розробки схеми отримання високоактивного антигену вірусу сказу нами було здійснено кілька технологічних етапів. За результатами експериментальних досліджень, отримали вірусомісну суспензію на основі вакцинного штаму Щолково-51К вірусу сказу, шляхом його культивування в культурі клітин ВНК-21/13. Титр інфекційної активності вірусу після шести пасажів у культурі клітин становив $6,8 \text{ MLD}_{50}/\text{cm}^3$.

Наступним кроком було очищення вірусомісної рідини від клітинного детриту та баластних білків, яке здійснювали низькошвидкісним центрифугуванням, та концентрування вірусу. З цією метою нами підібрано ПЕГ з молекулярною масою 6000 до 6% впродовж 24 год за температури $+4$ $+8^\circ\text{C}$ з наступним низькошвидкісним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. В результаті концентрування встановлено титр вірусу сказу на рівні $7,49 \pm 0,2 \text{ MLD}_{50}/\text{cm}^3$.

Для інактивації вірусу використано стандартний інактивант – β -пропіолактон, виробництва Serva (Німеччина) в концентрації 1:4000 за температурного режиму $+4^\circ\text{C}$ з витримуванням впродовж 24 год. Використаний нами режим інактивації забезпечує повне усунення інфекційної здатності вірусу. Також показано принципову можливість застосування перекису водню, (H_2O_2) в кінцевій концентрації 3%, в якості інактиванта вірусу сказу, однак метод потребує подальшого досконалого вивчення.

Перевірка отриманого біопрепарату в тесті НІН дала змогу визначити показник ED_{50} на рівні 1,23, імуногенна активність становила $4,2 \text{ MO}/\text{cm}^3$. Дослідження динаміки формування титрів антитіл до вірусу сказу у лабораторних мишей, імунізованих отриманим нами препаратом, показала, що на 27 добу дослідження цей показник становив $6,22 \text{ MO}/\text{cm}^3$, що є прямим доказом високої імуногенної активності біологічного препарату, використаного для імунізації.

В результаті досліджень, для розробки схеми гіперімунізації нами було підібрано імуностимулюючий препарат «Фоспреніл» в дозі 4 мкл/гол., який, за

експериментального введення білим мишам разом з антирабічною вакциною, підвищував її показник ED₅₀ на 15%, а імуногенність вакцини підвищилась із 6,96 МО/см³ до 11,8 МО/см³.

Встановлено, що оптимальним видом тварин для проведення антирабічної гіперімуназації є кролі, оскільки вони демонстрували високу імунну відповідь на введення культурального антигену вірусу сказу комбіновано з імуностимулюючим препаратом. Середній титр антитіл по групі тварин після ґрундімуназації становив 21,43±1,96 МО/см³.

Розроблено схему гіперімуназації, яка полягає у чотирикратному комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в п'ять точок по 0,1 см³ і внутрішньом'язово в одну точку 0,5 см³ отриманого нами культурального антигену вірусу сказу. Ін'єкції «Фоспренілу» проводяться за добу до імуназації та на 21-у та 49-у добу досліду.

Інокуляція антигену для ґрундімуназації здійснюється на 0 та 21-у добу, після чого на 28-у добу досліду проводиться відбір крові для визначення рівня антирабічних антитіл. За результатами дослідження для подальшої імуназації відбираються кролі з титрами вище 20 МО/см³. Третя та четверта імуназації здійснюються на 35-у та 49-у добу відповідно, відбір крові та отримання специфічної сироватки – на 63-ю добу.

Проведене дослідження об'єднаної проби сироваток крові кролів після завершення гіперімуназації вказує на високі титри антитіл до вірусу сказу – 185±9,2 МО/см³ в РН і 212±10,4 МО/см³ в ТФ-ІФА.

Отже, для розробки кон'югату для діагностики сказу в РПФ, нами було проведено ряд досліджень:

- сконцентровано антирабічну гіперімунну сироватку крові кролів – титри антитіл до вірусу сказу знаходилися на рівні 327,0±48 МО/см³ в РН та 391,6±64 МО/см³ в ТФ-ІФА;
- встановлено, що оптимальною концентрацією ФІТЦ для реакції кон'югації з антирабічними імуноглобулінами є 1,5 мг/100 мг;

- модифіковано стандартний метод фіксації ацетоном мазків-відбитків мозкової тканини, оскільки за перевірки зразків патологічного матеріалу фіксованих ацетоном та над полум'ям спиртівки отримали співставні результати;
- з метою тривалого зберігання компонентів тест-системи їх піддавали ліофілізації.

Результати перевірки компонентів тест-системи для імунофлуоресцентної діагностики сказу підтверджують їх придатність для застосування в РППФ.

Отриманий дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну має робоче розведення 1:8, є специфічним ($DSp=100\%$) та чутливим до вірусу сказу ($DSe=96,6\%$), що відповідає нормам валідації діагностичних тестів, вказаних в WOAH Manual (2023).

За результатами проведених досліджень розроблено технологічний регламент виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу» (затверджений Вченою радою ІВМ, протокол № 10 від 11.10.2016).

З метою отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць першим етапом було проведення гіперімунізації перепілок, для чого використовували інактивовані вакцинні штами вірусу сказу G 52 Wistar та CVS-11. Внаслідок чого отримано два зразки очищеного і концентрованого Ig Y.

При дослідженні в РН на білих мишах зразок № 1 (Ig Y G 52 Wistar) володів специфічною активністю на рівні $26,25 \text{ MO/cm}^3$, а зразок № 2 (Ig Y CVS-11) – $81,25 \text{ MO/cm}^3$ порівняно із Другим міжнародним стандартом антирабічного імуноглобуліну людини.

Дослідження концентрованих дослідних зразків антирабічних Ig Y в FAVN-тест продемонструвало тотожні результати: титр зразку 1 був в межах $23,39\text{-}30,83 \text{ MO/cm}^3$, а зразку № 2 $70,63\text{-}93,10 \text{ MO/cm}^3$ відносно стандартної позитивної антирабічної сироватки крові ВООЗТ.

Після мічення ФІТЦ і очистки дослідні зразки антирабічного Ig Y досліджували в РПФ. Дослідження в РПФ зразків антирабічних Ig Y з перепелиних яєць мічених ФІТЦ показали специфічність Ig Y отриманого на антиген вірусу сказу штаму CVS-11, однак із недостатньою активністю робочого розведення – лише 1:2.

Проведені нами дослідження встановили принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу.

Для удосконалення постановки РПФ провели порівняльну характеристику фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної діагностики сказу.

Встановлено, що 60 зразків із 65-ти досліджуваних виявились позитивними на сказ за фіксації обома методами. Із 5-ти зразків, які були визнані негативними на сказ методом ЗТ-ПЛР, негативними в РПФ виявились 2 зразки за фіксації ацетоном та 4 за фіксації над полум'ям спиртівки. Сумнівним результат вважали у трьох зразках, які були фіксовані ацетоном та у одного, який був фіксований над полум'ям спиртівки.

Отримані результати свідчать про ідентичність якості мазків-відбитків за фіксації обома способами. Однак, фіксація над полум'ям спиртівки значно скорочує час постановки реакції та не потребує використання ацетону, який є небезпечною хімічною речовиною, що вимагає спеціальних заходів для його зберігання, обробки та утилізації.

З метою розробки стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу вперше в Україні застосовано референс-штам вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR-959) для виготовлення позитивних контрольних зразків, а для забезпечення належної якості розроблено принципи їх характеристики.

Забезпечено умови для розширення сфери акредитації Випробувального центру ДНДІЛДВСЕ відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014 на показник «Виявлення антигену збудника сказу» та проведено в 2021 році раунд МПВ

«Виявлення антигену збудника сказу» відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014. «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації лабораторій (EN ISO/IEC 17043:2010, IDT)».

РОЗДІЛ 6. ВИДІЛЕННЯ ВІРУСУ СКАЗУ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН

В системі контролю сказу серед тварин провідне місце займає своєчасна якісна та експресна лабораторна діагностика. Сказ – це головний зооноз, для якого стандартизовані методи діагностики, а також усі заходи по контролю сказу знаходяться під егідою ВООЗ і МЕБ. В Україні основним методом діагностики сказу є РПФ (МФА), а у випадку отримання сумнівних результатів, проводиться постановка біологічної проби на білих мишах. Не дивлячись на те, що біологічна проба є високочутливим методом діагностики сказу, він володіє суттєвими недоліками: потрібна велика кількість тварин та спеціальні умови їхнього утримання, тривалий період проведення тесту – 30 днів (відповідно ДСТУ 7053:2009 «Методи діагностики сказу» [5]), що обумовлює пізню відповідь про наявність або відсутність захворювання.

Альтернативою біопробі для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є використання різних перещеплюваних ліній клітин, використання яких дозволяє протягом 24–72 годин ізолювати вірус сказу з патологічного матеріалу. Така ситуація вимагає розробки та впровадження в лабораторну практику методики виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу із застосуванням системи *in vitro*.

6.1. Оцінка придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу

Для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу використовуються різні лінії клітин: нирка сирійського хом'яка (ВНК-21 С13 – АТСС ССL-10), фібросаркома собаки (А-72), нейробластома миші (N2a – ССL-131), невринома гассерова вузла щура (НГУК-1), нирка сайги та ін. Використання клітин дозволяє протягом 24–72 годин ізолювати вуличні ізоляти вірусу сказу при високому рівні кореляції результатів з біопробою на мишах.

Для проведення досліджень з визначення придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу було уніфіковано

протокол постановки реакції, який передбачав декілька етапи підготовки зразку, вирощування клітин, внесення дослідних зразків, заміни середовища, інкубування, фарбування та оцінки результатів:

- *Підготовка зразку.* Для підготовки суспензії для інфікування культури клітин необхідно приготувати 20% суспензію з шматочків амонowego рогу, кори півкуль, мозочка, довгастого мозку на фосфатно-сольовому буферному розчині PBS 0,1 М, рН 7,4.

- *Вирощування клітин.* Клітини, які використовуються для вірусовиділення, трипсинізуються з моношару, який вже сформований (клітини знаходяться в експоненціальній фазі їх кінетичного росту – 2-3 добовий моношар). В клітинній суспензії не повинно бути клітинних агрегатів для чого проводиться піпетування клітинної суспензії. Клітини збирають в об'ємі 20–30 см³ середовища з додаванням 5 % інактивованої фетальної сироватки крові ВРХ (FBS).

- *Внесення дослідних зразків.* 100 мкл освітленого гомогенату мозку додають до 200 мкл 2×10^5 клітин/см³ суспензії клітин (щойно пересіяної 2-3 добової лінії клітин) у чотири лунки 96-лункової мікропанелі.

- *Заміна середовища.* Після 24-годинної інкубації за температури 37 °С та 5 % CO₂ видаляють супернатант з кожної лунки за допомогою аспіраційної системи та додають у дозі 200 мкл середовища DMEM з вмістом 5 % FBS.

- *Інкубування.* Інкубування за температури 37 °С та 5 % CO₂ продовжується після заміни середовища з подальшим інкубуванням 72 години. Після чого супернатант видаляється за допомогою аспіраційної системи, або у разі необхідності подальших досліджень, або здійснення сліпого пасажування, видаляється піпеткою і зберігається за температури мінус 80 °С.

- *Фарбування.* Після завершення інкубування лунки з клітинами промивали фосфатно-сольовим буферним розчином, рН 7,2-7,4. Потім клітини фіксували 80 % ацетоном (охолодженим до температури мінус 20 °С) впродовж 30 хвилин, висушували на повітрі протягом 60 хвилин і фарбували за температури 37 °С протягом 30 хвилин моноклональними кон'югованими

ФІТЦ антитілами в робочому розведенні згідно інструкції виробника. Видаляли флуоресціюючий кон'югат і споліскували два рази фосфатно-буферним розчином, а його залишки видаляли витрушуванням плашки по фільтрувальному паперу.

- *Результат.* Для виявлення специфічного світіння вірусу сказу в культурі клітин використовували люмінесцентний мікроскоп. Під люмінесцентним мікроскопом за збільшенні 100х оглядали усю поверхню кожної лунки. Облік реакції якісний (за наявності специфічної флуоресценції хоча б одній лунці – реакція позитивна).

Для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу використано три лінії культур клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10), N2a (АТСС ССL-131) та НС (нирка сайги) та 11 патологічних матеріалів від котів, собак, лисиць і великої рогатої худоби. Усі матеріали були позитивними на сказ із підтвердження інфекційності шляхом постановки біологічної проби на мишах. Результати представлені в табл. 6.1.

В культурі клітин ВНК-21 С13 виділено вірус сказу з вісьми з 11-и патологічних матеріалів (72,7 %). Культура клітин N2a показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено вірус в 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах. Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культурі клітин НС, в якій вірус сказу було виділено лише в двох з 11 (18,2 %) патологічних матеріалів.

Отже, попередніми дослідженнями встановлено, що культура клітин нейробластоми миші N2a (АТСС ССL-131) є найбільш придатною культуральною системою для проведення виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу.

Таблиця 6.1

**Порівняння чутливості різних систем *in vitro* та *in vivo* для виділення
вуличних ізолятів вірусу сказу**

№ п/п	Ізолят	Культура клітин			Біологічна проба
		ВНК-21 С13	N2a	НС	
1	09С66	+	+	-	+
2	09С92	+	+	-	+
3	09D121	+	+	+	+
4	09F94	-	+	-	+
5	09D84	-	+	-	+
6	09F108	+	+	-	+
7	08С39	+	+	-	+
8	09D71	-	+	-	+
9	09D58	+	+	-	+
10	09СО111	+	+	-	+
11	09СО103	+	+	+	+

Примітки: + – позитивний результат; - – негативний результат.

6.2. Порівняльна характеристика методів детекції вірусу сказу

З метою проведення широких порівняльних випробувань було досліджено 100 зразків патологічного матеріалу. Усі зразки попередньо були визнані позитивними на сказ в регіональних лабораторіях ветеринарної медицини України методом прямої люмінесценції – РПФ. В лабораторії нейроінфекцій Інституту ветеринарної медицини НААН було проведено постановку біологічної проби на білих мишах та дослідження методом вірусовиділення в культурі клітин N2a за визначеною методикою, а в Національному ветеринарному інституті (м. Пулави, Польща) проведено постановку зворотно-транскриптно-ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) з використанням

специфічних діагностичних олігонуклеотидних праймерів: JW6DPL, JW12, N165, JW10P. Результати порівняльних досліджень наведено в додатку Д.

За результатами досліджень зразків патологічного матеріалу основними чотирма діагностичними тестами виявлено, що із 100-а завідома позитивних на сказ зразків в РПФ, вірусовиділенням в культурі клітин і біологічною пробою підтверджено наявність вірусу у 80-и зразках. Після перевірки досліджуваних зразків в ЗТ-ПЛР з'ясовано наявність РНК вірусу сказу у 82 зразках. Відмінність в отриманих результатах в РПФ та біологічними методами вірусовиділення (культура клітин і біопроба) можна пояснити тим, що РПФ є суб'єктивною реакцією та має ряд недоліків (свіжість досліджуваного зразку, обрана ділянка мозку, якість діагностичного кон'югату та ін.). Крім того РПФ проводили в багатьох державних регіональних лабораторіях різними фахівцями та з використанням різних ФІТЦ-кон'югатів та обладнання. Можливим поясненням різниці результатів за постановки ЗТ-ПЛР та реакціями вірусовиділення в культурі клітин та на білих мишах у двох зразків є наявність ознак автолізу патологічних матеріалів, що становило значну токсичність для культури клітин і викликало загибель клітин протягом 24 інкубації, а також викликало повну неспецифічну гибель білих мишей в одному матеріалі протягом 48 годин та часткову (4 з 6 тварин) неспецифічну гибель мишей після інюкуляції іншого матеріалу протягом 96 годин.

Таким чином запропонований метод виділення вірусу сказу в культурі клітин N2a забезпечує швидке (протягом 72-76 годин) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби на білих мишах. Однак, при впровадженні в практику методу вірусовиділення з використанням перещеплюваної культури клітин N2a (ATCC CCL-131), необхідно враховувати придатність для дослідження тільки свіжого патологічного матеріалу, що забезпечить достовірність отриманих результатів.

Результати розділу 6 висвітлені в наукових працях [60, 58, 42, 52].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 6

Для розробки методики виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу в культурі клітин використано клітини нирки сирійського хом'яка (ВНК-21 С13), нейробластоми миші (N2a), нирки сайги (НС). На етапі апробації клітин досліджено 11 патологічних матеріалів від котів, собак, лисиць і великої рогатої худоби.

В культурі клітин ВНК-21 С13 виділено вірус сказу в вісьми з 11-и патологічних матеріалів (72,7 %). Культура клітин N2a (ATCC CCL-131) показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено вірус сказу в 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах. Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культурі клітин НС. В цій культуральній системі було виділено вуличні ізоляти вірусу сказу лише в двох з 11 (18,2 %) патологічних матеріалах.

За результатами досліджень встановлено, що оптимальною культурою клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є нейробластома миші N2a (ATCC CCL-131).

З метою проведення широких порівняльних випробувань різних методів детекції вірусу сказу було досліджено 100 зразків патологічного матеріалу. За результатами досліджень зразків патологічного матеріалу основними чотирма діагностичними тестами виявлено, що із 100-а завідомо позитивних на сказ зразків в РПФ, вірусовиділенням в культурі клітин і біологічною пробою підтверджено наявність вірусу у 80-и зразках. Після перевірки досліджуваних зразків в ЗТ-ПЛР з'ясовано наявність РНК вірусу сказу у 82 зразках.

Таким чином запропонований метод виділення вірусу сказу в культурі клітин N2a забезпечує швидке (протягом 72-76 годин) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби на білих мишах. Однак, при впровадженні в практику методу вірусовиділення з використанням перещеплюваної культури клітин N2a (ATCC CCL-131), необхідно враховувати придатність для дослідження тільки свіжого патологічного матеріалу, що забезпечить достовірність отриманих результатів.

За результатами проведених досліджень з оцінки чутливості і придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу розроблені методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН протокол № 9 від 02.11.2023) та отримано патент України на корисну модель «Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу» (№ 153299 від 14.06.2023).

РОЗДІЛ 7. ДЕТЕКЦІЯ ВІРУСУ СКАЗУ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИМИ МЕТОДАМИ

7.1. Лабораторна діагностика сказу методом ЗТ-ПЛР

В Україні діагностика сказу тварин відбувається відповідно до ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу», де в якості методів діагностики цієї інфекції визначено: індикацію вірусу сказу за допомогою МФА, виділення вірусу біологічною пробою на білих мишах, ізоляцію вірусу сказу за допомогою перещеплюваної культури клітин з наступною ідентифікацією в МФА.

Однак, в Розділі 3.1.18. Керівництва діагностичних тестів і вакцин для наземних тварин ВООЗТ (Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Chapter 3.1.17 Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses), ВОАН) з травня 2018 року в якості діагностичного тесту визнано метод полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) [286], що вимагає розробки відповідних протоколів і впровадження цього експрес-методу в лабораторну діагностику сказу в Україні.

Для перевірки запропонованих в рекомендаціях специфічних олігонуклеотидних праймерів були проведені скринінгові дослідження зразків патологічного матеріалу, які були визнані позитивним на сказ в регіональних лабораторіях ДПССУ. Були проведені дослідження щодо виявлення РНК вірусу сказу в патологічному матеріалі методом ПЛР в агарозному гелі та гніздовим варіантом ПЛР, а також методом ПЛР в режимі реального часу.

Враховуючи недостатність інформації стосовно філогрупи, генотипу чи генетичного кластера вірусу сказу, що циркулює на території України, нами було проведено підбір вуличних ізолятів вірусу сказу з колекції матеріалів лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН, яка налічує 1362 зразки для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Підбір виконували таким чином, щоб максимально охопити усі природно-географічні зони та області нашої країни, з урахування всіх сприйнятливих

тварин, викової структури прояву епізоотії та відомих природних резервуарів вірусу сказу.

Для дослідження відібрано 100 зразків патологічного матеріалу з 19-ти областей України та АР Крим, що були діагностовані в період з 2009 по 2013 рік. Зразки були від 14 видів тварин (собака, кіт, ВРХ, коза, лисиця, єнотовидний собака, борсук, куниця, тхір, вовк, рись, лось, щур і кажан) та два зразки від людей (Додаток В1). Схематично структура відібраних зразків для лабораторних досліджень методом ПЛР представлена на рис. 7.1.

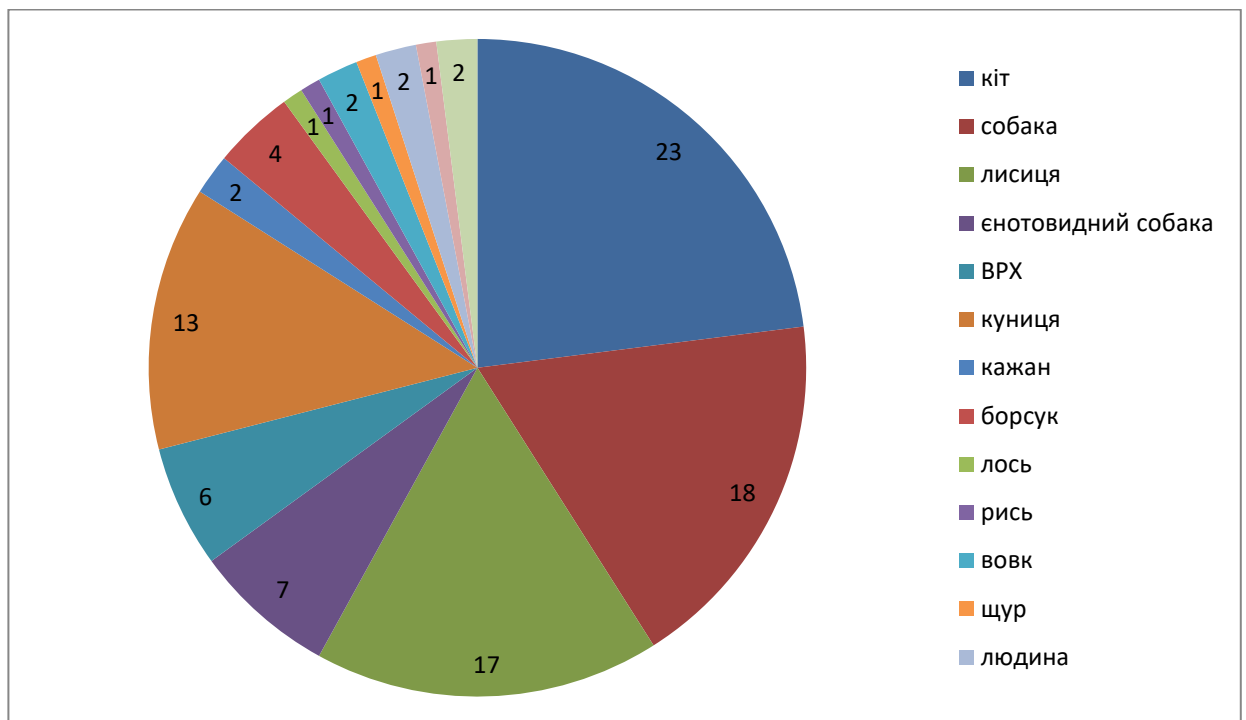


Рис. 7.1 Структура відібраних зразків головного мозку для лабораторних досліджень методом ПЛР.

Оскільки відомо, що за тривалого низькотемпературного зберігання відбувається поступове зниження інфекційної активності вірусу сказу, нами було додатково перевірено відібрані 100 зразків методом біологічної проби (БП) на білих мишах, оскільки він використовується для підтвердження діагнозу на сказ згідно ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу».

Постановку ЗТ-ПЛР здійснювали після біопроби на білих мишах з метою отримання генетичного матеріалу вірусу для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Для постановки ЗТ-ПЛР, ЗТ-ПЛР в режимі реального часу та гніздового варіанту ПЛР використовували відповідні олігонуклеотидні праймери:

JW6DPL (CAATTCGCACATTTTGTG);

JW12 (ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG);

N165 GTCATTAGAGTATGGTGTTC;

JW10P GTCATTAGAGTATGGTGTTC;

RabGT1 TACAATGGATGCCGACAAGA;

LysGT1 CAAATC TTTGATGGCAGGGTA;

LysGT5 GATCCCGATTTGAAAACAGC;

LysGT6 AGACCATGGCTCCAGCTAAA.

Результати порівняльних досліджень патологічного матеріалу класичними методами (МФА – проведено в регіональних лабораторіях ДПСС, біологічна проба – IBM НААН) та різними варіантами ПЛР представлені в табл. 7.1.

За результатами досліджень зразків вуличних ізолятів вірусу сказу трьома діагностичними тестами виявлено, що із 100-а завідомо позитивних на сказ зразків, що встановлено скрінінговою РПФ, біопробою підтверджено наявність антигену вірусу у 80-и зразках. Після перевірки досліджуваних зразків в ЗТ-ПЛР з'ясовано наявність РНК вірусу сказу у 82 зразках. Відмінність в отриманих результатах в РПФ та БП можна пояснити тим, що РПФ є суб'єктивною реакцією та має ряд недоліків (свіжість досліджуваного зразку, обрана ділянка мозку, якість діагностичного кон'югату та ін.).

Таблиця 7.1

**Результати лабораторних досліджень польових ізолятів вірусу сказу
різними методами лабораторної діагностики**

№ з/п	МФА	БП	ЗТ- ПЛР	№ з/п	МФА	БП	ЗТ- ПЛР	№ з/п	МФА	БП	ЗТ- ПЛР
1	+	+	+	35	+	+	+	69	+	+	+
2	+	+	+	36	+	+	+	70	+	+	+
3	+	+	+	37	+	-	-	71	+	+	+
4	+	-	-	38	+	-	-	72	+	+	+
5	+	+	+	39	+	+	+	73	+	+	+
6	+	+	+	40	+	+	+	74	+	+	+
7	+	-	-	41	+	+	+	75	+	+	+
8	+	+	+	42	+	+	+	76	+	+	+
9	+	+	+	43	+	+	+	77	+	+	+
10	+	-	-	44	+	-	-	78	+	+	+
11	+	+	+	45	+	+	+	79	+	-	-
12	+	+	+	46	+	+	+	80	+	+	+
13	+	+	+	47	+	-	-	81	+	-	-
14	+	+	+	48	+	+	+	82	+	-	-
15	+	+	+	49	+	-	-	83	+	-	-
16	+	+	+	50	+	+	+	84	+	+	+
17	+	+	+	51	+	+	+	85	+	+	+
18	+	-	-	52	+	+	+	86	+	+	+
19	+	-	-	53	+	+	+	87	+	+	+
20	+	+	+	54	+	-	-	88	+	+	+
21	+	+	+	55	+	+	+	89	+	+	+
22	+	+	+	56	+	+	+	90	+	+	+
23	+	-	+	57	+	+	+	91	+	+	+
24	+	-	-	58	+	+	+	92	+	+	+
25	+	+	+	59	+	+	+	93	+	+	+
26	+	-	+	60	+	+	+	94	+	+	+
27	+	-	-	61	+	+	+	95	+	+	+
28	+	-	-	62	+	+	+	96	+	+	+
29	+	+	+	63	+	+	+	97	+	+	+
30	+	+	+	64	+	+	+	98	+	+	+
31	+	+	+	65	+	+	+	99	+	+	+
32	+	+	+	66	+	+	+	100	+	+	+
33	+	+	+	67	+	+	+				
34	+	+	+	68	+	+	+				

Примітки: + вірус виявлено, - вірус не виявлено

Пояснень різниці результатів за постановки ЗТ-ПЛР та БП у двох зразків (№ 23 і 26) може бути декілька. По-перше отримання лабораторією несвіжого патологічного матеріалу, в якому інфекційного вірусу сказу не вдалося виявити біологічною пробою. Ще однією причиною (особливо для зразку № 26, кажан) може бути недостатня чутливість білих мишей вагою 9-11 г для вірусовиділення, або недостатній титр вірусу в патологічному матеріалі.

7.2. Молекулярно-генетична характеристика вірусу сказу

Застосування молекулярно-генетичних методів дослідження РНК вірусу сказу створює можливості для проведення вивчення генетичних властивостей та характеристик ізольованих зразків вірусу сказу. Використання методів програмного забезпечення для здійснення філогенетичного аналізу дає змогу оцінити ступінь спорідненості, місця делецій та інсерцій для різних окремих ізолятів, генотипів і штамів вірусу сказу тощо. Залежно від обраної ділянки для філогенетичного аналізу і наявних збережених аналогічних послідовностей в GenBank, відкриваються широкі можливості для порівняння нових ізолятів вірусу сказу із зразками, що досліджувалися в попередні роки. Це в свою чергу створює умови для вивчення еволюції та змін в генетичній структурі білків ізолятів вірусу сказу з плином часу.

Підбір вуличних ізолятів вірусу сказу для проведення молекулярно-генетичних досліджень.

Враховуючи отримані результати, дослідження з характеристики молекулярно-генетичних властивостей ізолятів вірусу сказу проводили із 82 зразками (Додаток В1, рис. 7.2), які були підтверджені позитивними на сказ методом ПЛР.

Так, в розрізі етіологічної структури відібраних для досліджень ізолятів, основну масу складала зразки від котів – 19, собак – 16 та лисиць – 14, оскільки саме ці види тварин є основними векторами вірусу сказу. Крім цього, було відібрано від куниць 10 зразків, ВРХ – 6, борсуків – 3, вовків – 2, дві проби від людини та по одному зразку від рисі, лося, щура і кажана.

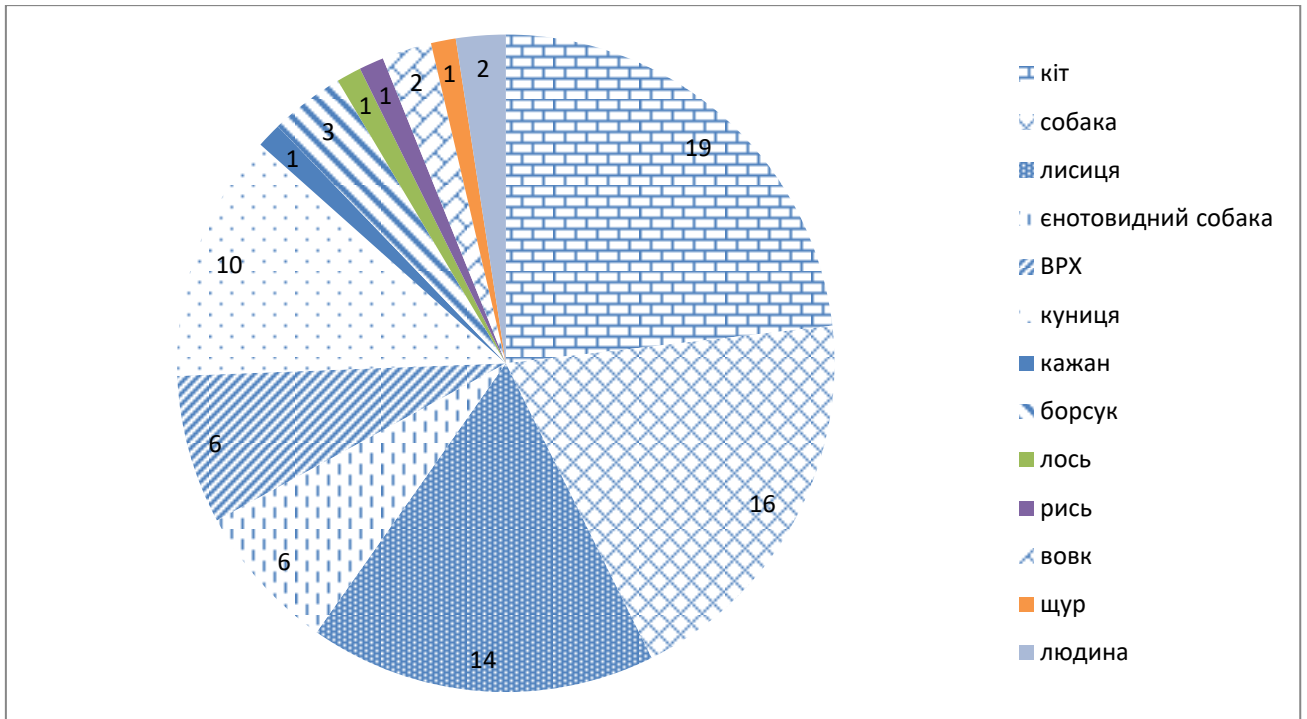


Рис. 7.2. Етіологічна структура відібраних зразків для молекулярно-генетичних досліджень.

Зразки відібрані для молекулярно-генетичних досліджень відповідали видовій структурі захворюваності тварин на сказ, а також застосування проб від 12 видів тварин і людини дає змогу встановити можливу гостальну належність генетичних кластерів за результатами молекулярно-генетичних досліджень.

7.2.1. Характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України

Географічна ізоляція, згідно класичним уявленням про видоутворення, може бути важливим фактором появи нових біологічних видів, в першу чергу це стосується вірусів. Нашим завданням було дослідити дивергенцію РНК вірусу сказу на території України та провести молекулярно-біологічний та філогенетичний аналіз для вивчення походження, а також встановлення гіпотетичних механізмів еволюції українських ізолятів вірусів.

На першому етапі роботи нуклеотидні послідовності N-гену 82 ізолятів вірусу сказу були секвеновані та порівняні різними методами за допомогою комп'ютерних програм MEGA 6.06 та BioEdit 7.0.

Першим кроком визначення положення ізолятів серед інших представників ліссавірусів тварин було порівняння отриманих секвенсів між собою та вакцинними штамми, які є типовими представниками 1-ої філогрупи ліссавірусів тварин, послідовності яких внесені до GenBank. При порівнянні результатів секвенування вуличних ізолятів між собою встановлено, що ступінь генетичної спорідненості становить 96 – 99% (рис. 7.3) за амінокислотним складом, що є типовою характеристикою для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи.

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції досліджуваних зразків між собою та з вакцинними штамми, було встановлено, що польові ізоляти за своїми характеристиками генетично однорідні, належать до 1-ої філогрупи, 1-го генотипу ліссавірусів тварин.

Однак, вуличний ізолят від кажана (порядковий номер ізоляту 26), який було виділено на території Вовчанського району Харківської області, має відмінність за амінокислотним складом від решти вуличних ізолятів вірусу сказу, що були виділені від наземних ссавців в Україні, на рівні 96 – 98 %.

Для візуалізації відмінностей між різними ізолятами вірусу сказу з території України, що були нами досліджені, побудовані філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей, використовуючи програму MEGA 6.06. Додатково для аналізу були включені послідовності трьох вакцинних штамів вірусу сказу, які взято із GenBank: PV IX276550, SAD B19 EF206709, SAD Bern EF206708 (рис. 7.3).

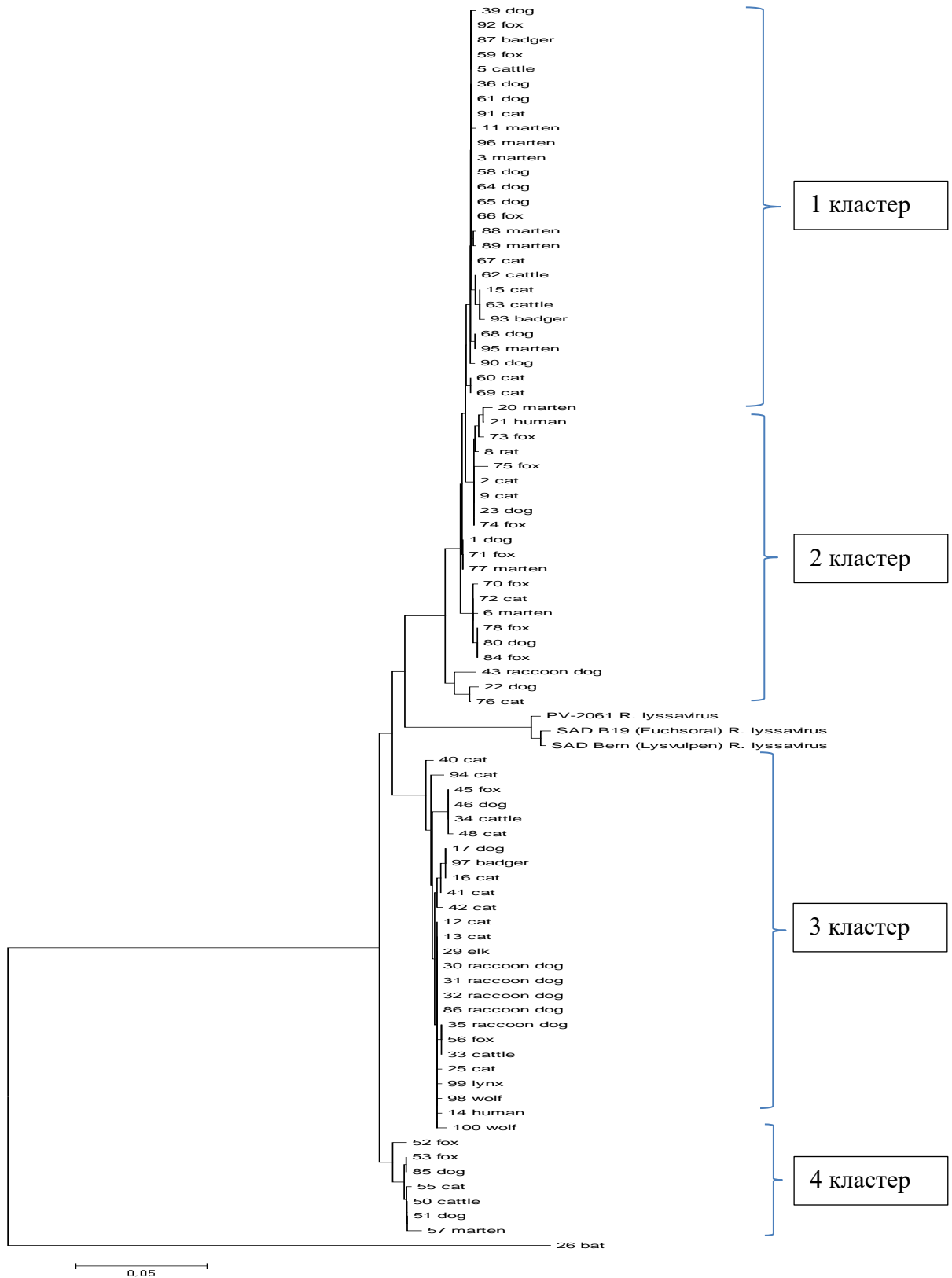


Рис. 7.3 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вуличних ізолятів вірусу сказу з території України та вакцинних штамів, побудовані за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Згідно розміщення на дендрограмі, що відображає рівень спорідненості між досліджуваними зразками, усі ізоляти вірусу сказу були розподілені на 4 генетичні кластери. Окремо на філогенетичному дереві представлені три зразки – вакцинні штами вірусу сказу, послідовності яких були взяті з GenBank.

Найбільша спорідненість амінокислотних послідовностей цих зразків була з вуличними ізолятами вірусу сказу другого та третього генетичних кластерів. Також, окремо на філогенетичному дереві був розміщений зразок від кажана, який мав найбільшу відмінність за амінокислотним складом від решти досліджуваних вуличних ізолятів вірусу сказу.

Для визначення географічної локалізації встановлених генетичних кластерів вірусу сказу було проведено картографію відповідно адміністративних областей, на території яких були виділені досліджувані зразки. Результати представлені на рис. 7.4.

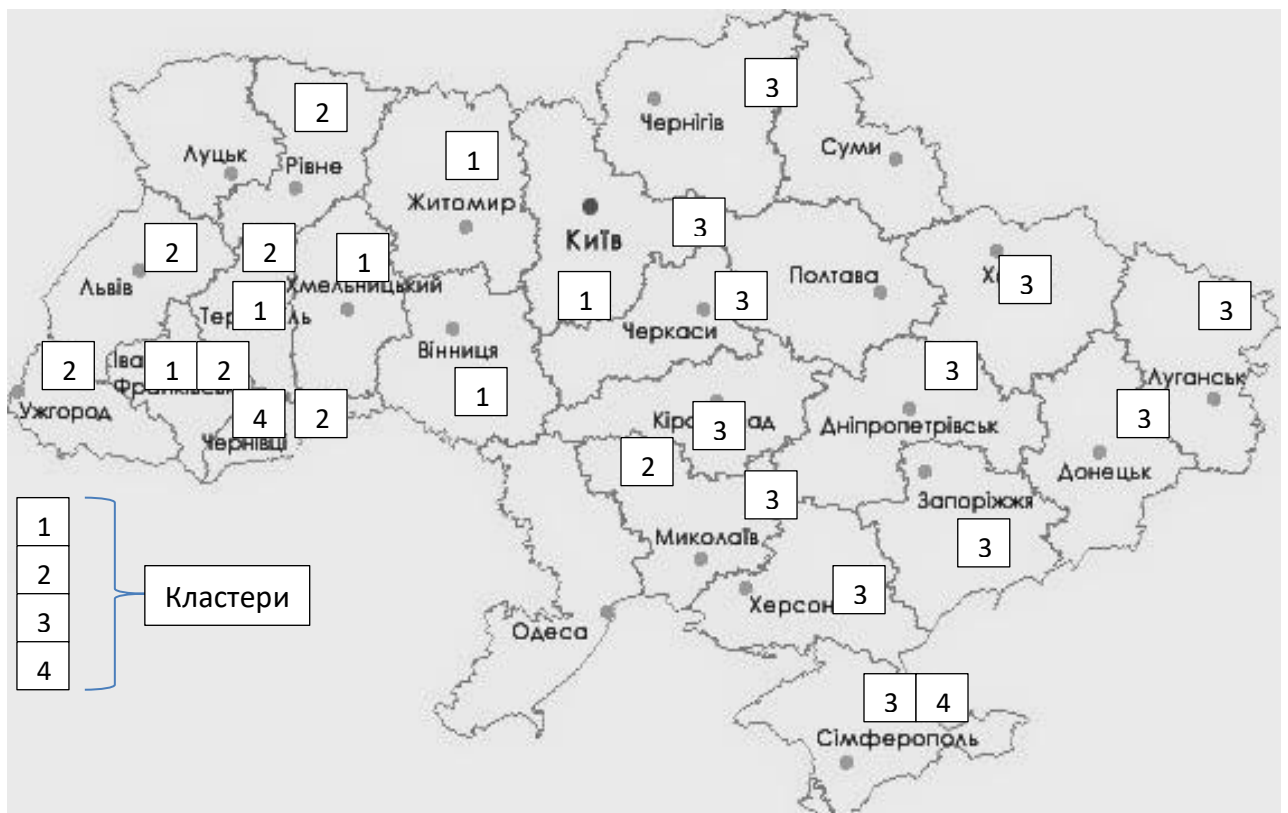


Рис. 7.4 Географічний розподіл генетичних кластерів вуличних ізолятів вірусу сказу в Україні.

В результаті картографії було встановлена географічна локалізація чотирьох генетичних кластерів вірусу сказу на території України:

- 1 кластер – Житомирська, Вінницька, Хмельницька, Київська, Черкаська, Івано-Франківська та Тернопільська області;
- 2 кластер – Закарпатська, Львівська, Рівненська, Івано-Франківська, Тернопільська, Чернівецька та Миколаївська області;
- 3 кластер – Миколаївська, Черкаська, Запорізька, Херсонська, Київська, Харківська, Дніпропетровська, АР Крим, Чернігівська, Донецька та Луганська області;
- 4 кластер – АР Крим та Чернівецька область.

Отриманні результати продемонстрували певний територіальний розподіл генетичних варіантів вуличних ізолятів вірусу сказу із географічною приуроченістю. На території правобережної України переважали ізоляти вірусу сказу, які відносяться до 1-го та 2-го кластеру, а на лівобережній – 3-го та 4-го генетичних кластерів.

Так, 48 із 82-х досліджуваних вуличних ізолятів вірусу сказу було віднесено до першого та другого кластерів, які зосереджені на території правобережної України, головним чином в Житомирській, Вінницькій, Хмельницькій, Київській, Тернопільській, Львівській, Івано-Франківській, Рівненській та Чернігівській областях. Решта вуличних ізолятів вірусу сказу (34 зразка) були з Луганської, Харківської, Донецької, Запорізької, Дніпропетровської, Чернігівської, Полтавської, Київської, Миколаївської областей та АР Крим. Однак, на територіях окремих областей відмічається наявність ізолятів, які належать до двох різних кластерів вірусу сказу, а саме:

- 1 та 2 кластер на території Тернопільської та Івано-Франківської області;
- 1 та 3 кластеру на території Київської та Черкаської області;
- 2 та 3 кластера на території Миколаївської області;
- 2 та 4 кластера на території Чернівецької області;
- 3 та 4 на території Автономної Республіки Крим.

Ситуацію із циркуляцією різних генетичних кластерів в межах однієї області можна пояснити сусіднім розташуванням областей у випадку Тернопільської та Івано-Франківської, Київської та Черкаської областей та природною міграцією тварин. Що ж стосується АР Крим, Миколаївської та Чернівецької області, то, на нашу думку, поясненням виявленої географічної належності різних генетичних кластерів можливе за умови перевезення тварин, так як природна міграція тварин на значні відстані є мало вірогідною.

На рахунок вуличного ізоляту від кажана з території Харківської області будь-які висновки стосовно географічної приуроченості за результатами секвенування одного зразку робити завчасно. Однак, зважаючи на генетичні відмінності від решти зразків з території України, ізоляцію його від кажана, свідчить про необхідність додаткового його дослідження із проведенням генотипування порівнюючи з іншими ліссавірусами тварин.

7.2.2. Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених від свійських і диких м'ясоїдних тварин

Значна кількість випадків захворюваності на сказ пов'язана із збільшенням частоти контактів свійських тварин з безпритульними і дикими, що обумовлено спільною кормовою базою, розширенням території міст за рахунок зон степу і лісостепу, які раніше були зонами природного проживання диких тварин, недостатнім рівнем специфічної імунопрофілактики, ослабленням контролю за виконанням правил утримання собак і котів, зростанням популяції бродячих собак і котів, недостатнім рівнем контролю за популяцією лисиць тощо.

В той же час потрібно враховувати природу вірусу сказу та циркуляцію різних генотипів у різних географічних зонах.

Для пошуку відмінностей між різними вуличними ізолятами вірусу сказу, що були виділені від свійських і диких м'ясоїдних тварин в Україні побудоване філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей 49-и вуличних ізолятів вірусу сказу (від котів – 19, собак – 16 та від лисиць – 14) та додатково до нього

включені послідовності трьох вакцинних штамів вірусу сказу, які взято із GenBank та належать до першого генотипу ліссавірусів тварин (RABV): PV IX276550, SAD B19 EF206709, SAD Bern EF206708 (рис. 7.5).

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції досліджуваних зразків вірусу сказу між собою та з вакцинними штамми, було встановлено, що вуличні ізоляти за своїми генетичними характеристиками однорідні, належать до I-ої філогрупи 1-го генотипу ліссавірусів тварин. Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8% за амінокислотним складом. Окремо на філогенетичному дереві були розміщені вакцинні штами вірусу сказу. Не зважаючи на високий ступінь спорідненості, за результатами філогенетичного аналізу усі досліджувані вуличні ізоляти вірусу сказу були розподілені знову на 4 генетичні кластери.

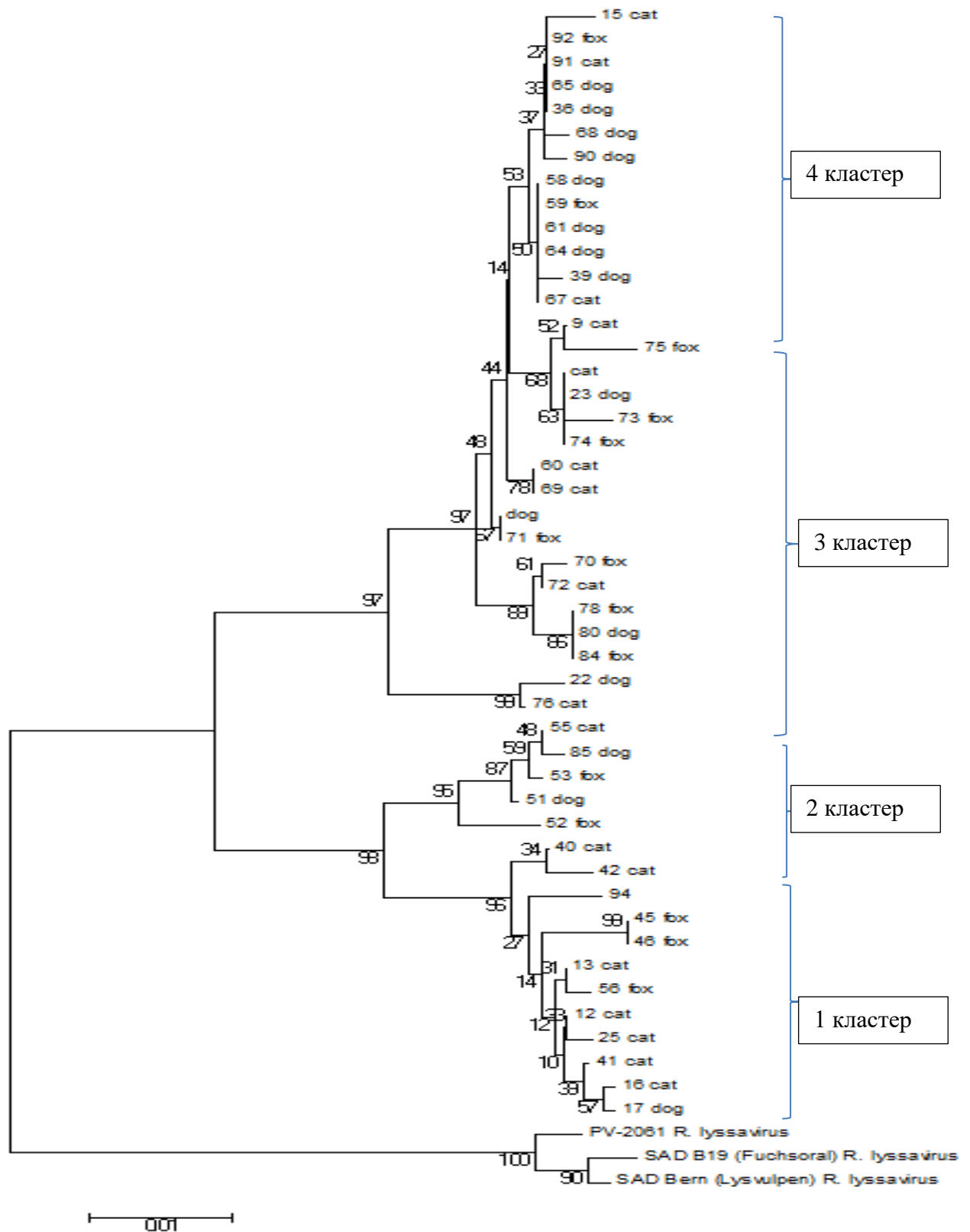


Рис. 7.5 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вакцинних штамів і вуличних ізолятів вірусу сказу виділених від диких та свійських м'ясоїдів з території України, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

При здійсненні картографії встановлено приуроченість генетичних кластерів вуличних ізолятів вірусу сказу за географічними зонами та областями:

- 1 кластер – Житомирська, Вінницька, Хмельницька, Київська області;
- 2 кластер – Львівська, Рівненська, Івано-Франківська області;
- 3 кластер – Львівська, Рівненська, Тернопільська, Чернівецька області;
- 4 кластер – Чернівецька, Миколаївська, Черкаська, Запорізька, Київська, Харківська, Херсонська області та АР Крим (рис 7.6).

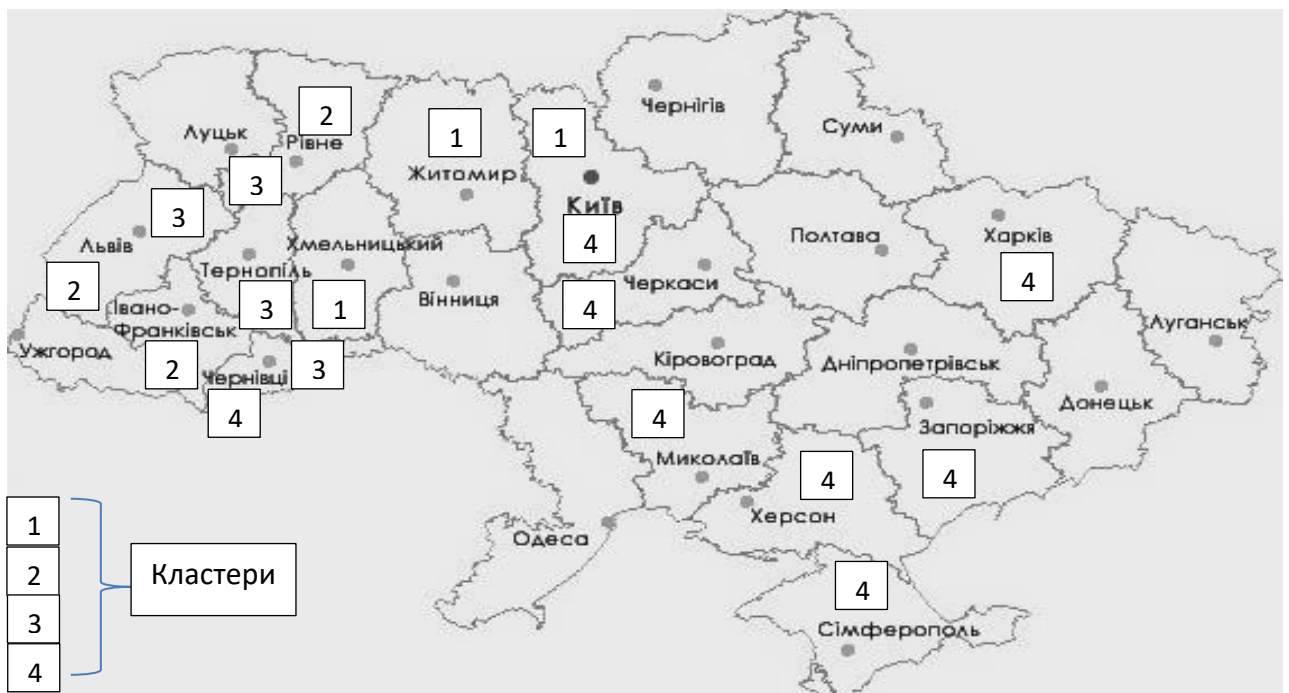


Рис. 7.6 Розподіл на території України генетичних кластерів вуличних ізолятів вірусу сказу, що були виділені від собак, котів і лисиць.

За результатами картографії на території правобережної України переважали вуличні ізоляти вірусу сказу, що належать до першого, другого та третього генетичних кластерів. Віруси четвертого генетичного кластеру переважно виявлені на території лівобережної України, а також на території правобережної частини Київської, Черкаської і Миколаївської областей.

Отже, незважаючи на високий ступінь генетичної однорідності вірусу сказу, встановлені при філогенетичному аналізі генетичні відмінності між

вуличними ізолятами вірусу сказу, що були виділені від котів, собак і лисиць, також продемонстрували виражений географічний розподіл.

7.2.3. Філогенетичний аналіз ліссавірусів кажанів з території України

Кажани є резервуарами і векторами для тринадцяти із чотирнадцяти класифікованих генотипів ліссавірусів тварин. Причому, для п'яти з них – (LBV, DUVV, EBLV type 1, EBLV type 2, ABLV) кажани є винятковими векторами. Тільки ліссавірус 3-го генотипу (MOKV) не був ізолюваний від кажанів, його векторами є землерийки й гризуни в африканських країнах. Для країн Європи, в тому числі й для України, особливе значення мають генотип 5 (EBLV-1) і генотип 6 (EBLV-2).

Тому, для нас становило науковий інтерес філогенетичне дослідження зразку від кажана виду *Epsepticus serotinus*, який було виділено на території Вовчанського району Харківської області в селі Бугруватка, оскільки за побудови загальної дендрограми із 82-х вуличних ізолятів вірусу сказу з території України, було виявлено його суттєву відмінність і відокремлене розміщення на дендрограмі (рис. 6.3). З цією метою було побудоване філогенетичне дерево для визначення спорідненості зразку від кажана з типовими представниками 1-ої філогрупи ліссавірусів тварин: European bat lyssavirus 1 isolate RV9 (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), Duvenhage virus isolate 94286SA (генотип DUVV), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Australian bat lyssavirus (генотип ABLV), Rabies virus isolate 9704ARG (генотип RABV), Rabies virus strain Shimoni bat virus 18 (генотип SHBRV), Rabies virus strain SAD B19 (генотип RABV), Rabies virus (генотип RABV) та двома зразками, які належать до другої філогрупи ліссавірусів тварин – Lagos bat virus isolate 8619NGA (генотип LBV), Lagos bat virus isolate 0406SEN (генотип LBV) (рис. 7.7).

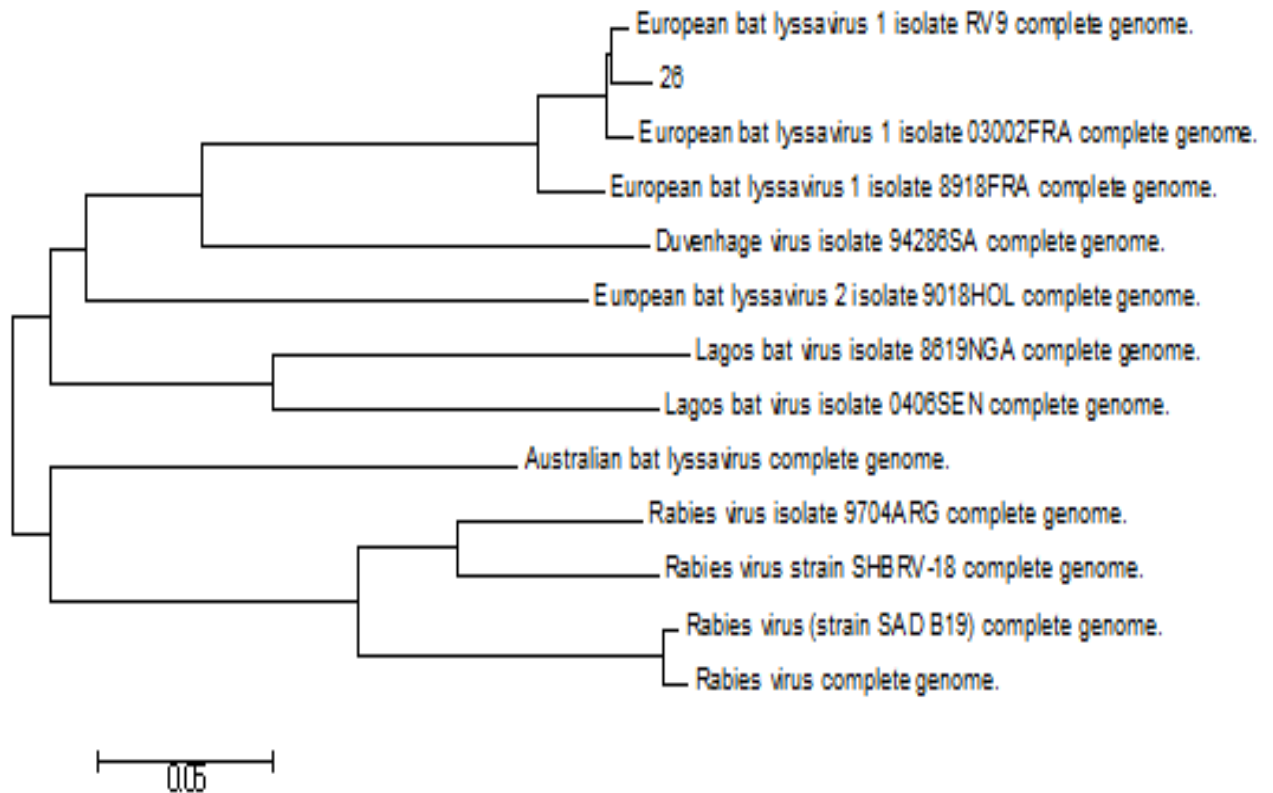


Рис. 7.7 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей відомих генотипів ліссавірусів тварин, вакцинних штамів та вуличного ізоляту вірусу сказу (№ 26), виділеного від кажана на території Харківської області, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції дослідного зразку порівняно із представниками різних генотипів, які внесені до GenBank і є типовими представниками першої філогрупи ліссавірусів тварин, було встановлено, що польовий ізолят вірусу сказу від кажана за своїми генетичними характеристиками, належать до європейських ліссавірусів кажанів першої філогрупи.

Наступним етапом роботи було визначення до якого саме генотипу належить досліджуваний зразок. З метою порівняння зразку з представниками європейських ліссавірусів тварин, які внесені до GenBank було побудоване філогенетичне дерево. Для аналізу використано наступні послідовності: European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat

lyssavirus 1 isolate RV9 (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate YULI (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Rabies virus strain SAD B19 (RABV) та Rabies virus (RABV). Це дерево вказало на приналежність зразку до EBLV-1 (5-тий генотип). Результати представлені на рис. 7.8.

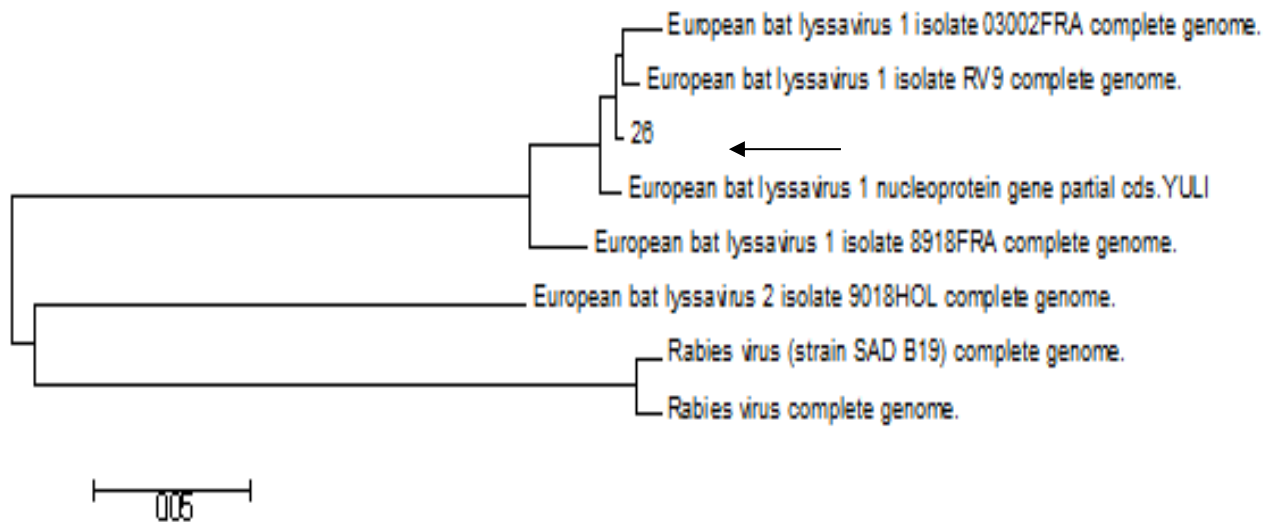


Рис. 7.8 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей ізолятів вірусу сказу 1-го (RABV), 5-го (EBLV-1), 6-го (EBLV-2) генотипів, вакцинного штаму та вуличного ізоляту вірусу сказу (№ 26), виділеного від кажана на території Харківської області, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Отже, проведені дослідження вперше в Україні дали змогу генетично охарактеризувати і класифікувати польовий ізолят від кажана, який був виділений на території східної України (Харківська область, Вовчанський район, село Бугруватка), до європейських ліссавірусів кажанів першого типу (EBLV – type 1), 5-тий генотип I-ї філогрупи ліссавірусів тварин.

7.2.4. Молекулярно-генетична характеристика ізолятів вірусу сказу виділених від людей хворих на сказ

За інформацією Державного закладу «Український центр з контролю та моніторингу захворювань Міністерства охорони здоров'я України» (ДЗ «УЦКМЗ МОЗ») в Україні реєструється близько 90–110 тис. звернень осіб до медичних установ з приводу укусів тваринами, з них близько 20 тис. осіб одержують антирабічні щеплення, в т.ч. 15–20 % комбінований курс (з антирабічним глобуліном). Проте, незважаючи на значні обсяги постекспозиційних щеплень в Україні, щороку від цього небезпечного захворювання помирають люди. Починаючи з 2001 р. щорічно від 1 до 7 людей гинуть від гідрофобії.

Джерелами збудника сказу для захворілих найчастіше є: собаки – 34,0 %, в т. ч. безпритульні (9,4 %), коти – 37,7 %, в т. ч. безпритульні (15,1 %), лисиці – 20,7 %; в одному випадку – кажан (Луганська обл. 2002 рік), та виявлено три випадки без визначеного джерела збудника інфекції.

Переважає кількість захворілих не зверталися за медичною допомогою і не були щеплені проти сказу, в 11,3 % пацієнти відмовилися від щеплень, в 17,0 % отримали неповний курс щеплень. В той же час – в 5 випадках (9,4 %) щеплення укушеним не призначені, так як висновки фахівців ветеринарної медицини про стан здоров'я тварин, за якими проводилося спостереження, зокрема лабораторні дослідження на сказ в 4-х випадках були негативні, а в одному випадку (м. Київ, 2011 рік) поставлено собаці діагноз «бабезіоз».

Все зазначене свідчить про незадовільну санітарно-освітню роботу з населенням щодо заходів попередження сказу з боку медичних працівників та фахівців ветеринарної медицини, а також необхідність покращення діагностики сказу тварин.

За період 2010–2016 рр. вірусологічною лабораторією ДЗ «УЦКМЗ МОЗ» підтверджено методом ПЛР 26 випадків сказу у людей. Однак, на сьогодні відсутня інформація щодо молекулярної природи ізолятів вірусу сказу, виділених від людей в Україні.

В Україні в 2009 році зареєстровано випадок гідрофобії. Житель Львівської області, 32 річний чоловік, звернувся до лікаря зі скаргами на загальну слабкість, оніміння правої руки, підвищену температуру тіла до 37,5°C протягом останніх кількох діб. Ці симптоми є типовою ознакою для першого періоду класичного захворювання на сказ, періоду провісників, для якого є типовим підвищення рефлексорної збудливості і порушення психіки.

У вкрай важкому стані на 8-му добу захворювання він був госпіталізований у центральну лікарню за місцем проживання, а на наступний день переведений до реанімаційного відділення Львівської обласної інфекційної лікарні. У хворого період паралічів тривав три доби, стан був вкрай важкий: на звернення не відповідав, температура тіла до 37,4°C. Реанімаційні заходи не дали результатів. Від зупинки серця пацієнт помер.

При з'ясуванні епідеміологічного анамнезу встановлено, що влітку 2006 року він був укушений за великий палець правої руки лисицею. Потерпілий за антирабічною допомогою не звертався. При детальному аналізі випадку встановлено, що клінічний перебіг у хворого був типовим з характерною циклічністю, але без ознак буйності. Атиповою була тривалість захворювання – майже 20 діб.

Діагноз був підтверджений шляхом постановки РПШФ. Вірус був виділений методом біологічної проби в Інституті ветеринарної медицини НААН, однак при інтрацеребральному введенні білим мишам 20 % суспензії мозку загиблого, усі дослідні миші загинули протягом 23-х діб. Захворювання у мишей протікало із стертою клінічною картиною протягом 7-9 діб, що в 4 рази довше, ніж звичайно при зараженні вуличним вірусом сказу. Можливими факторами, які були причиною нехарактерно тривалого перебігу хвороби, могла бути зміна властивостей штаму вірусу сказу, яким був інфікований загиблий.

Інший випадок трапився в м. Києві в 2011 році. Чоловік 1984 року народження загинув із клінічною картиною, характерною для гідрофобії. При з'ясуванні епіданамнезу встановлено контакт потерпілого із собакою близько 2-3 місяців до загибелі. Діагноз також був підтверджений шляхом постановки

РПШФ. Вірус був виділений методом біологічної проби в Інституті ветеринарної медицини НААН при інтрацеребральному введенні білим мишам 20 % суспензії мозку. Захворювання у мишей протікало із класичною «паралітичною» формою протягом 24-48 годин, інкубаційний період 7-11 діб.

Враховуючи вищенаведене, наступним етапом роботи було проведення аналізу результатів секвенування двох ізолятів вірусу сказу, що були виділені від людей, порівнянням із вже відомими та класифікованими генотипами ліссавірусів тварин, що належать до різних філогруп, референт-штамом вірусу сказу CVS, вакцинними штамми, послідовності яких внесені до GenBank: Rabies virus strain SAD B19 (генотип RABV), Rabies virus strain SAD Bern (генотип RABV), Rabies virus strain PV-2061 (генотип RABV), Rabies virus strain CVS-N2c (генотип RABV), fox 9147FRA (генотип RABV), Homo sapiens NNV-RAB-H (генотип RABV), HUMAN (генотип RABV), HUMAN 1983. 8743THA (генотип RABV), HUMAN 1983. 8764THA (генотип RABV), Bat 9704ARG (генотип RABV), dog 9001FRA (генотип RABV), Rabies virus strain Shimoni bat virus 18 (генотип SHBRV), Lagos bat virus isolate 8619NGA (генотип LBV), Lagos bat virus isolate 0406SEN (генотип LBV), rodent 86101RCA (генотип MOKV), G3 (генотип MOKV), shrew 86100CAM (генотип MOKV), Homo sapiens (генотип ABLV), A. Bat lyssavirus (генотип ABLV), European bat lyssavirus 2 isolate 9018HOL (генотип EBLV-2), Homo sapiens RV 1333 (генотип EBLV-2), Miniopterus 94286 SA (генотип DUVV), Homo sapiens 86132 SA (генотип DUVV), European bat lyssavirus 1 isolate 8918FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 03002FRA (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 9395GER (генотип EBLV-1), UKR E Bat (генотип EBLV-1), European bat lyssavirus 1 isolate 22.07.10 (генотип EBLV-1). Для філогенетичного аналізу була побудована дендрограма з використанням програми MEGA 6.06 (рис. 7.9).

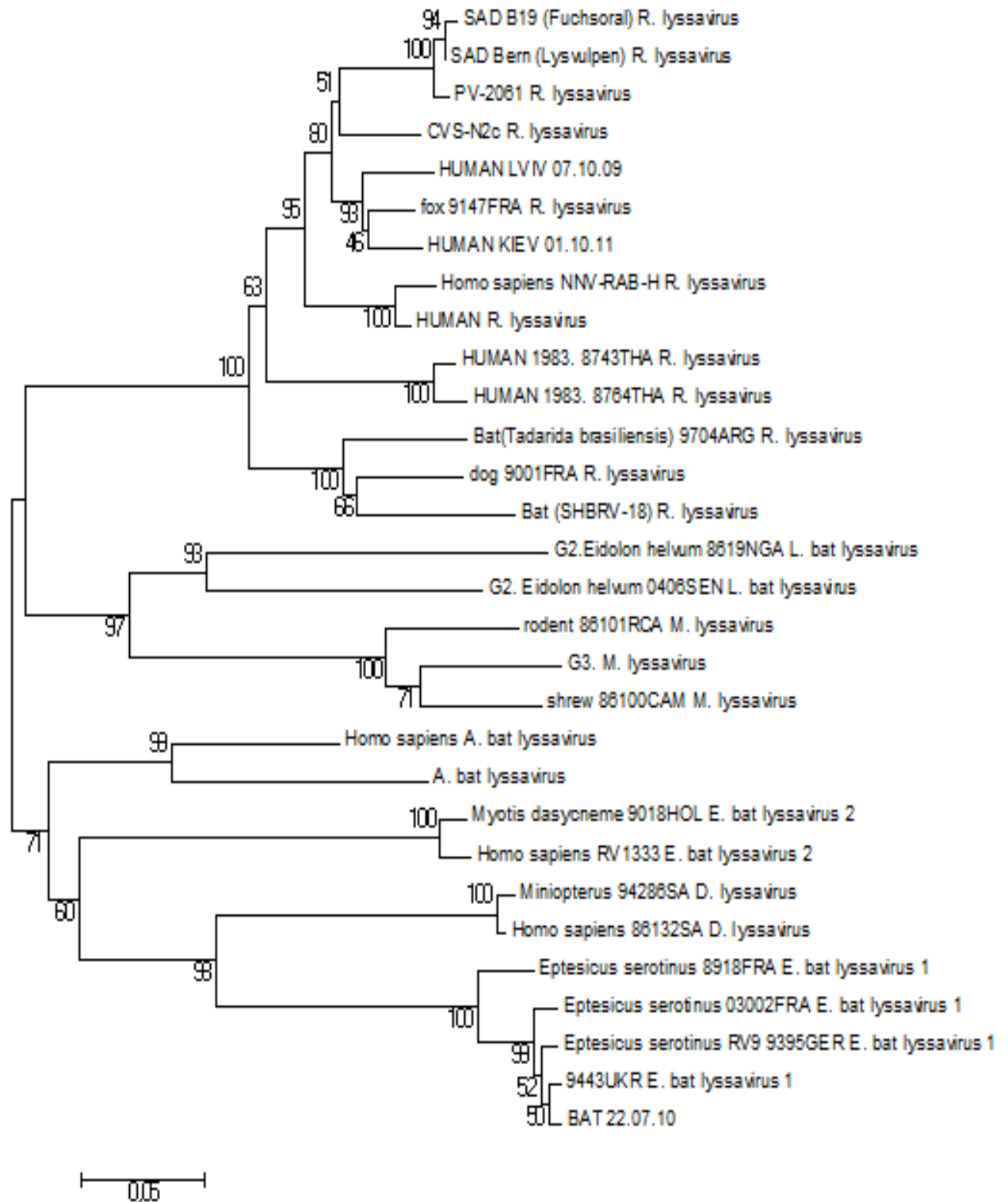


Рис. 7.9 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вуличних ізолятів вірусу сказу, що належать до різних генотипів, вакцинних штамів та двох ізолятів вірусу, виділених від людей (HUMAN KIEV 01.10.11 і HUMAN LVIV 07.10.09), побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Із матеріалів, які представлені на дендрограмі видно, що досліджувані зразки HUMAN KIEV 01.10.11 та HUMAN LVIV 07.10.09 спорідненні з ізолятами вірусу сказу, які належать до першої філогрупи. За своїми генетичними характеристиками досліджувані ізоляти вірусу сказу близькі до польового ізоляту вірусу, який виділено від лисиці на території Франції в 1991 році (fox 9147FRA – генотип RABV).

Молекулярно-генетичні дослідження проведено шляхом філогенетичного аналізу частини послідовності N-гену (нуклеопротеїну) і за їхніми результатами встановлено, що генетична спорідненість за амінокислотним складом вуличних ізолятів виділених від людей з території України і зразків, які представлені в GenBank, становила 96–99 %. Також генетичні послідовності досліджуваних зразків характерні для ізолятів, які виділяються в географічній зоні степу і лісостепу південно-східної Європи.

Для пошуку спорідненості і гостальної належності вуличних ізолятів вірусу сказу HUMAN KIEV 01.10.11 та HUMAN LVIV 07.10.09, що були виділені від людей, проведено філогенетичне дослідження послідовностей цих зрізків порівняно із послідовностями вакцинних штамів вірусу сказу (генотип RABV) та ізолятів вірусу сказу від собак, котів і лисиць (генотип RABV), які включені до GenBank та були виділені на території України, а також зразку від людини, що була укушена кажаном: Rabies virus strain SAD B19, Rabies virus strain SAD Bern, Rabies virus strain PV-2061, Rabies virus strain CVS-N2c, dog Rw10-29, cat RW10-01, marten Rw 10-08, stray dog Rw 10-14, fox Rw 10-09, stray dog Rw 10-33, cat Rw 08-22, dog Rw 10-04, fox Rw 02-16, fox Rw 02-13, polecat Rw 10-20, stray dog Rw 10-18, fox Rw 10-31, cat Rw 09-06 та European bat lyssavirus 1 isolate YULI (генотип EBLV-1).

У дослідженнях виявлено високий ступінь гомології між дослідними зразками і матеріалами від котів, собак і лисиць з території України (рис. 7.10). Вуличний ізолят вірусу сказу HUMAN LVIV 07.10.09, який був виділений від

людини після контакту з лисицею, мав найбільший відсоток спорідненості із зразком від лисиці, що підтверджує анамнестичні дані стосовно цього випадку.

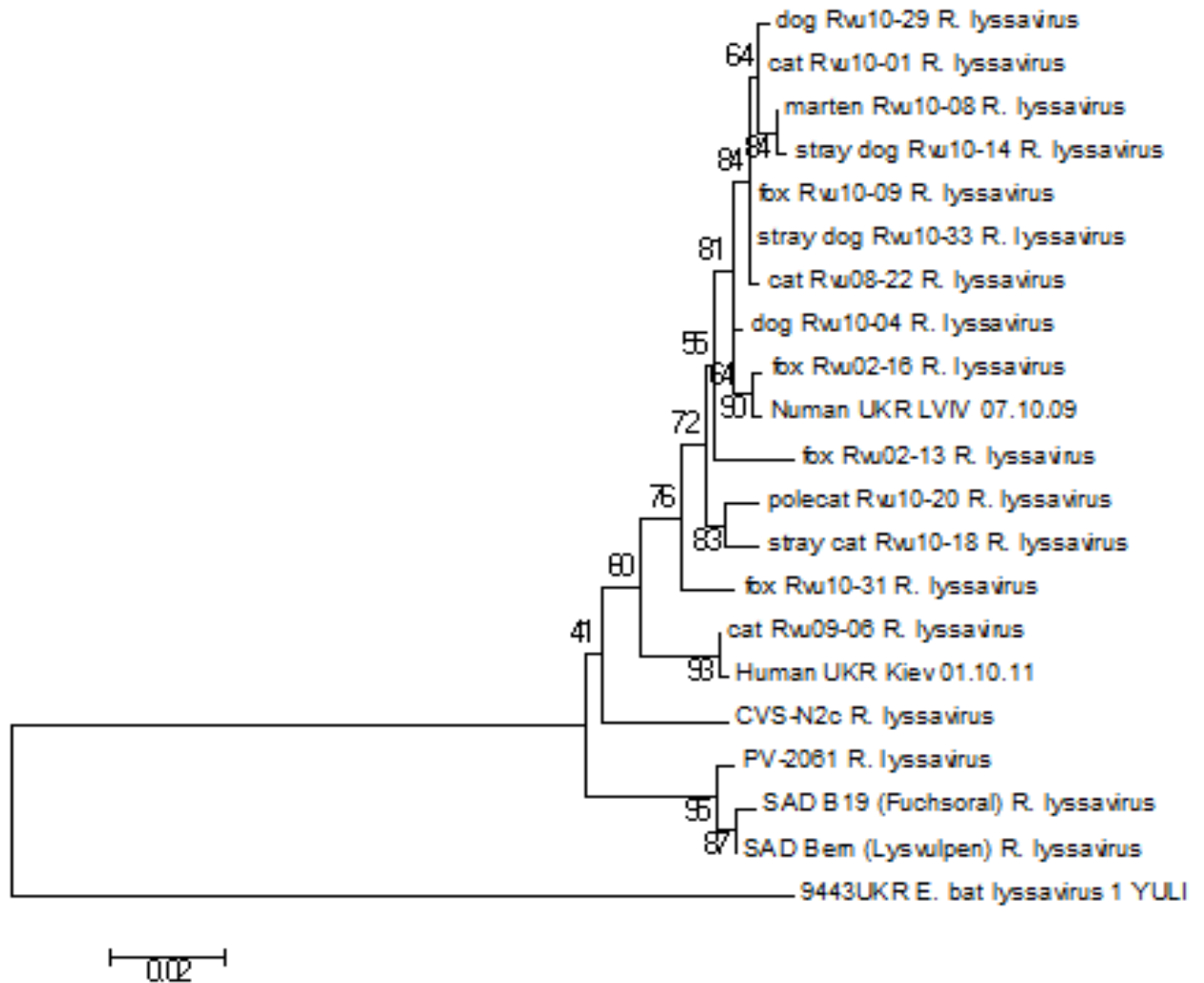


Рис. 7.10 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вакцинних штамів та вуличних ізолятів вірусу сказу з території України, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій (філограма). HUMANUKRKIEV 01.10.11, HUMANUKRLVIV 07.10.09, BAT 22.07.10 – ізоляти від людей з України.

Інший досліджуваний зразок (HUMAN KIEV 01.10.11) мав найбільший відсоток спорідненості із зразком від кота, хоча відповідно анамнестичних даних у хворого був контакт з хворою на сказ собакою.

Крім генетичних послідовностей ізолятів вірусу сказу з України при побудові філогенетичного дерева використано послідовності чотирьох

вакцинних штамів, які представлені двома групами штамів – PV (Pasteur virus) і SAD (Street-Alabama-Dufferin). Вакцини (KoKAB, Verorab, Indirab, Rabipur), що виготовлені на основі дериватів цих штамів, застосовуються в Україні для постекспозиційного антирабічного лікування. Враховуючи високу генетичну спорідненість між ізолятами і вакцинними штамми, можна припустити, що в разі вчасного звернення за необхідною медичною допомогою (лікувальний курс антирабічних щеплень із введенням антирабічного імуноглобуліну) вдалося уникнути хвороби.

Отже, після проведення досліджень ізолятів вірусу сказу, які були виділені від людей, та їхнього детального аналізу можна зробити висновок, що інфекційні агенти, які викликали загибель людей належать до ліссавірусів тварин, а саме – вірусу сказу першого генотипу (RABV) першої філогрупи. А той факт, що в чоловіка з Львівської області клінічні симптоми захворювання проявилися через тривалий проміжок часу (за матеріалами епідемічного анамнезу) можна пояснити тим, що кількість вірусу, яка потрапила в рану під час укусу лисицею за великий палець руки була незначною, що могло загальмувати пересування вірусу по доцентровим волокнам нервової системи. Крім того, немало значимим фактором є особливість функціонування нервової системи та іннервація в місці укусу. Однак, виявлений тривалий інкубаційний період і нехарактерна клінічна картина сказу у дослідних мишей при постановці біопроби є свідченням змін біологічних властивостей ізоляту вірусу сказу, яким був інфікований загиблий, за рахунок генетичної мінливості ліссавірусів під час циркуляції в різних популяціях тварин при передачі від одного сприятливого організму до іншого.

7.2.5. Кластеризація та картографування секвенованих зразків

Наступним етапом наших досліджень стала візуалізація результатів секвенування та розподілу ізолятів на генетичні кластери за результатами філогенетичного дослідження.

З цією метою підібрані параметри (довгота, широта, область, район, населений пункт, вид тварин, дата ізоляції, № в колекції, генотип чи генетичний кластер та примітки), що є критичним для візуалізації та інтерпретації результатів, за якими відбувається характеристика досліджених зразків для подальшого відображення в Google Maps (рис.7.11).

Практичність застосування таких методів характеризується тим, що вносити відомості про зразок можна одразу в програму, з функцією корегування та доповнення в будь який момент. Можливість збору всієї необхідної інформації про випадки, які можна згрупувати за необхідними вибірками та візуалізувати на карті, є важливим аспектом моніторингових досліджень.

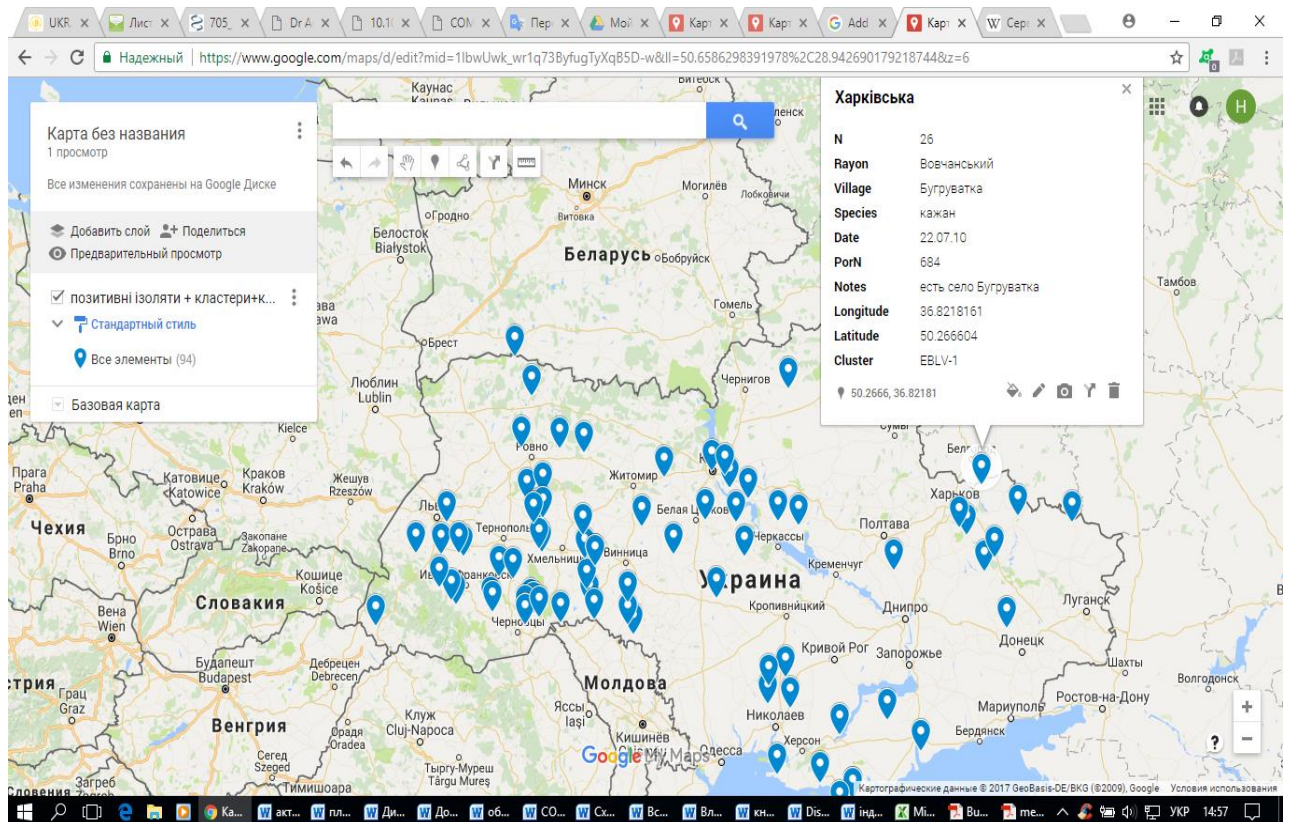


Рис.7.11 Візуалізація інформації про зразки сервісом Google Maps.

Для доскональної географічної характеристики (дисперсія, просторові тренди) встановлених нами різних генетичних кластерів вірусу сказу на території України, за допомогою комп'ютерної програми ESRI ArcMap 10.3. було створено карту дистрибуції для чотирьох генетичних варіантів вірусу шляхом нанесення еліпсів стандартних відхилень для кожного генетичного кластеру (рис. 7.12).

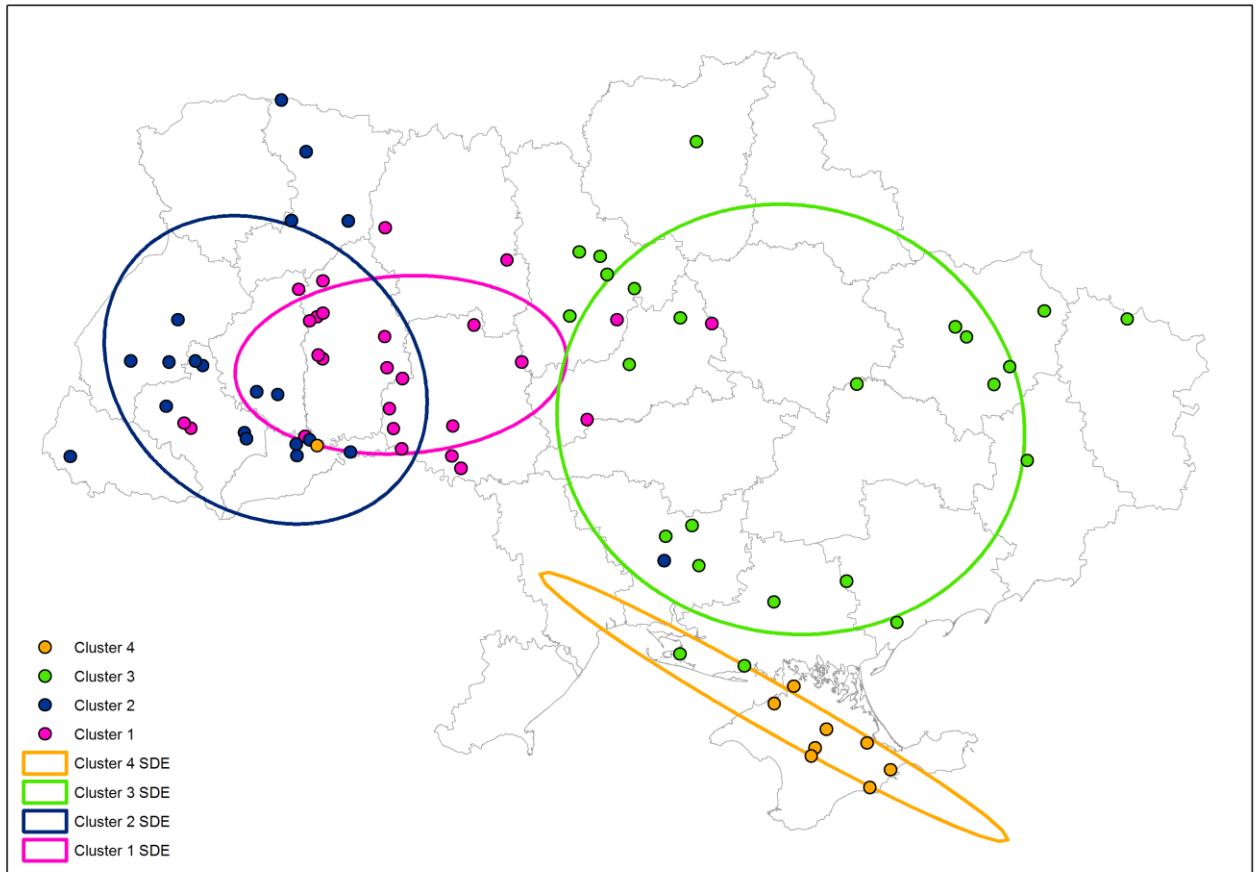


Рис. 7.12. Еліпси стандартних відхилень (розміром в 1 стандартне відхилення) географічних кластерів вірусу сказу на території України.

Створені відповідно математичного комп'ютерного аналізу еліпси стандартних відхилень показали наступне:

- географічно кластер 1 переважно сконцентрований на території Тернопільської, Хмельницької та Вінницької областей. Географічний центр для першого кластеру знаходиться на кордоні Хмельницької (Летичівський район) та Вінницької (Літинський район) областей, а

- просторовий тренд для цього генетичного кластеру лежить на осі захід – схід;
- другий генетичний кластер розміщений більш західніше відносно кластеру 1 із географічним центром в Тернопільській області (Теребовлянський район). Еліпс стандартного відхилення для цього кластеру охоплює Львівську, Івано-Франківську, Тернопільську, Чернівецьку, Хмельницьку та частково Волинську і Рівненську області. Крім того, еліпси для першого і другого кластерів пересікаються в Тернопільській та Хмельницькій областях. Просторовий тренд для кластеру 2 розміщений на осі північний захід – південний схід;
 - третій генетичний кластер найбільший за площею, частково або повністю еліпс стандартного відхилення знаходиться на території 12-и областей. Географічний центр еліпсу знаходиться на перетині Кіровоградської (Олександрійський район) та Дніпропетровської (П'ятихатський район) областей. Більшою частиною еліпс розміщений в Лівобережній Україні на території Херсонської, Полтавської, Дніпропетровської, Запорізької та Харківської областей, а також на території Черкаської, Кіровоградської і Миколаївської областей. Крім цього, створений еліпс стандартного відхилення не мав чітко визначеної просторової направленості;
 - еліпс стандартного відхилення для кластеру 4, до якого були віднесені усі зразки з АР Крим та один зразок з Чернівецької області, мав сильно виражений просторовий тренд на осі північний захід – південний схід. Однак, на нашу думку, випадок сказу в Чернівецькій області, який був віднесений за філогенетичним аналізом до кластеру 4, міг бути пов'язаний із перевезенням тварини, а не через природну міграцію.

Отже, застосований інструмент Directional distribution (еліпси стандартних відхилень) виявив географічну локалізацію генетичних кластерів. Встановлено географічно опосередковане підтримання осередків сказу вірусами, що були віднесені до кластерів 3 і 4. Крім цього, виявлено спільні зони поширення

вірусу сказу кластерів 1 і 2 на території Тернопільської та Хмельницької областей.

7.2.6. Порівняння амінокислотних послідовностей секвенованих зразків з території України із послідовностями виділеними на території сусідніх країн

На території європейських країн з 1999 року встановлено і охарактеризовано чотири філогенетичні групи вірусу сказу в межах I генотипу (Центральна Європа – CE; Східна Європа – EE, C, D; Північно-Східна Європа – NEE; Західна Європа – WE) [110].

Для нас становило науковий інтерес, визначення генетичної спорідненості вуличних ізолятів вірусу сказу, які були виділені на території України з 2009 по 2013 рік, порівняно із зразками з Польщі та Румунії, які внесені в GenBank в той період часу. Для порівняння були відібрані амінокислотні послідовності типових представників вуличних ізолятів, секвенованих за N-геном, виділених від диких і свійських м'ясоїдних тварин з території Польщі (вуличні ізоляти вірусу сказу JN596904 (лисиця), JN190393 (лисиця), JN190395 (лисиця), JN190392 (єнотовидний собака), N596895 (єнотовидний собака) і Румунії (вуличний ізолят вірусу сказу GU086619 ізольовано від лисиці). Надалі було проведено побудову філогенетичного дерева з допомогою програми MEGA 6.06 (рис 7.13).

За результатами побудови дендрограми нами встановлено, що зразки з території України, Польщі та Румунії сформували окрему гілку на філогенетичному дереві, цей факт підтверджує приналежність цих зразків до одного генотипу.

Окремо були розміщені усі вакцинні штами вірусу сказу та зразок від кажана з Харківської області, що належить до 5-го генотипу ліссавірусів тварин, решта досліджуваних зразків розташувалися поруч утворивши 2 гілки (кластери). Таке розташування зразків вказує на генетичну їх спорідненість, що є характерним для ізолятів виділених на території північно-східної Європи.

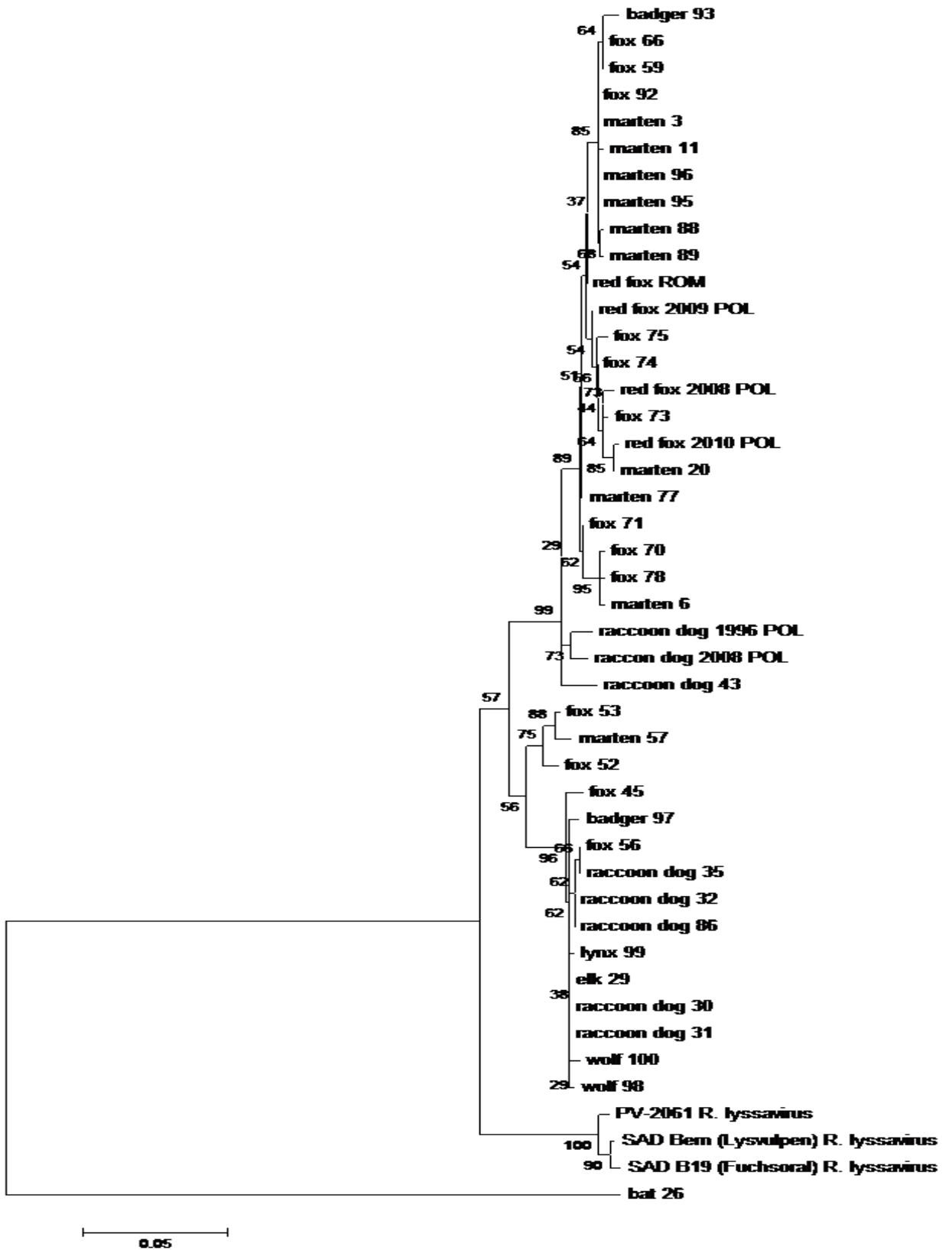


Рис. 7.13 Філогенетичне дерево нуклеотидних послідовностей вуличних ізолятів вірусу сказу з території України та сусідніх країн, побудоване за методом NJ (найближчих сусідів), модель Кімура з 1000 бутстреп реплікацій.

Впровадження скоординованих, стандартизованих та тривалих кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу на великих територіях призвело до майже ліквідації сказу в дикій природі з території країн Європейського Союзу (ЄС) станом на 2020 рік. Щорічна кількість випадків сказу, зареєстрованих на території ЄС, справді впала з приблизно 13 000 випадків у 1990 році до менше ніж 10 випадків у 2017-2019 роках. На жаль, з 2020 року територія ЄС зіткнулася з двома великими випадками повторної появи сказу у наземних тварин. Перший спалах сказу стався у 2021 та 2022 роках у Польщі в Мазовецькому воєводстві, включаючи варіант SE, тоді як другий спалах, який вразив Польщу, Румунію, Угорщину та Словаччину, значно наростав наприкінці 2022 року та включав лише варіант NEE. Таким чином, Угорщина та Словаччина, де не було зареєстровано жодного випадку протягом 5-7 років відповідно, зіткнулися з новими спалахами сказу в 2022 році.

Повторна епідемія у 2021 році в Польщі та наприкінці 2022 року в Угорщині та Словаччині та погіршення ситуації в Румунії підкреслили важливість стійких довгострокових програм антирабічної вакцинації диких тварин для охоплення та підтримки територій, вільних від сказу, а також важливість підтримки програм співпраці з ендемічними прикордонними країнами, в тому числі з Україною.

Дійсно, півторарічна перерва в програмах ЄС щодо пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу призвела до небезпечної санітарної ситуації в Румунії. Швидке відновлення популяцій диких тварин (очікувана тривалість життя диких лисиць становить 1-3 роки) дійсно не дозволяє переривати кампанії вакцинації. Таке переривання швидко призводить до незначної частки молодих особин у популяції виду. Молоді лисиці, які раніше не піддавалися вакцинації дуже сприйнятливі до інфекції, також схильні до розповсюдження сказу через їхню поведінку осіннього розповсюдження.

Як і в інших частинах світу, європейська система боротьби зі сказом постраждала від пандемії COVID-19, яка дестабілізувала людські суспільства та

їх організацію та, ймовірно, спричинила деякі збої у нагляді за сказом тварин та системі контролю. Блокування людських популяцій, швидше за все, обмежило нагляд за хворобами дикої природи на місцях. Подальший геополітичний конфлікт, а саме бойові дії в Україні, серед іншого, призвели до того, що польоти літаків біля кордонів, які необхідні для розповсюдження пероральної антирабічної вакцини, стали майже неможливими.

Враховуючи вище наведене, необхідним є характеристика цих епідеміологічних подій та важливість підтримки програм пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин та імунного поясу (в тому числі в Україні) в довгостроковій перспективі, особливо в складному контексті пандемії та військових конфліктів, що впливає на організацію людських суспільств.

Для філогенетичного дослідження використано позитивні зразки вірусу сказу, виявлені в ЄС протягом 2021 – січня 2023 р. (Польща: 11 у 2021 р. та 31 у 2022 р.; Румунія: 2 у 2021 р.; 27 у 2022 р. та 1 у січні 2023 р.; Угорщина: 4 у 2022 р.; Словаччина: 2 у 2022 р. та 1 у січні 2023 р.). Також використано зразки з України (1 зразок у 2020 році та 9 зразків у 2021 році) та Молдови (5 зразків у 2021 році та 11 у 2022 році). Також зразки з Румунії, які зібрані до періоду 2021-2022 років (2 у 2012, 2 у 2014, 2 у 2015 та 3 у 2020) були додатково включені в аналіз. Дев'ять зразків остаточно були непридатні для використання (5 з Румунії та 4 з України), що призвело до загального аналізу на сказ 105 зразків РНК (Додаток В2). Філогенетичне дерево представлено на рис. 7.14.

Усі зразки, виявлені в Словаччині, Угорщині, і 30/33 зразки (91%), ідентифіковані в Румунії за період 2021–2023, були зібрані та включені в аналіз, що вказує на хорошу репрезентативність зразків дослідження в межах виявлених випадків за той самий період. У Польщі, оскільки в попередньому дослідженні проаналізовано всі 2021 випадки та випадки січня 2022 року, лише частина з 2021 випадків (11/113), відібраних як представники раніше виявлених філогруп, і 31/36 зразків (86%), виявлених у 2022 році, були відібрані для цього аналізу.

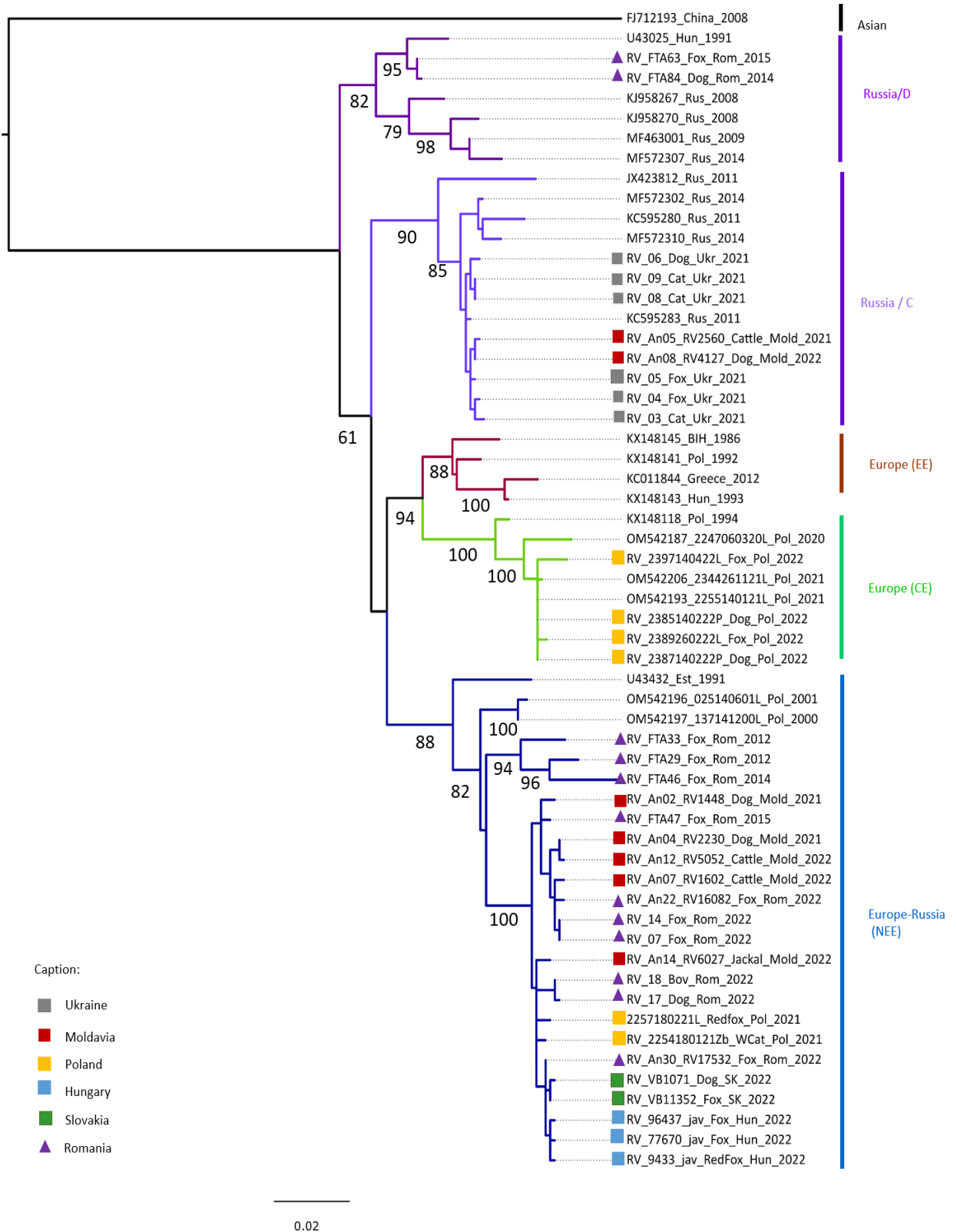


Рис. 7.14 Філогенетичні зв'язки між усіма послідовностями генів 34-х випадків, датованих з 2021 по січень 2023 року, і 2 випадків з 2014-2015 років з послідовностями RABV, що представляють підгрупи NEE, C, EE, CE, WE і D. 100% гомологічні нові послідовності (n=69) були видалені з аналізу для видимості дерева.

Відповідно до філогенетичних результатів усі штами мали дике походження. Випадки, виділені в Польщі в Мазовецькому воєводстві та його околицях, належали до центральноєвропейського варіанту (СЕ). Навпаки, усі інші випадки, виявлені в період 2021–січень 2023 року в Угорщині, Словаччині, Румунії та східній частині Польщі, дуже відрізнялися від Мазовецького спалаху та належали до філологічної групи Північно-Східної Європи (NEE). Раніше описаний варіант NEE історично був виявлений у західній Росії, Україні, країнах Балтії, Болгарії, Угорщині, Румунії та Словаччині. Цей варіант, здається, зараз переважає в Європейському Союзі, оскільки, за винятком спалаху в Мазовецькому краї, усі ізольовані зразки з 2021-2022 по січень 2023 року належать до цієї філогрупи.

Географічна належність випадків, що були виявлені в нових ендемічних спалахах на території країн ЄС показала чітку приуроченість (рис. 7.15). Так, варіант СЕ виявлено в республіці Польща, а варіант NEE в Польщі, Словаччині, Угорщині та Румунії в прикордонних з Україною територіях.

Філогенетичний аналіз показав, що ізоляти вірусу сказу з України (з Вінницької (3), Кіровоградської (1) та Рівненської (2) областей) відносяться до кластеру С. Отже, це може бути частковим підтвердженням ефективності буферної зони з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що проводиться на території західних областей України з 2012 року, так як свідчить про генетичну відмінність між ізолятами з країн ЄС та України. Тобто, цим дослідженням не виявлено потрапляння вірусу сказу з території України до країн ЄС, а виникнення нових спалахів є скоріш за все наслідком зупинки кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин на території цих країн.

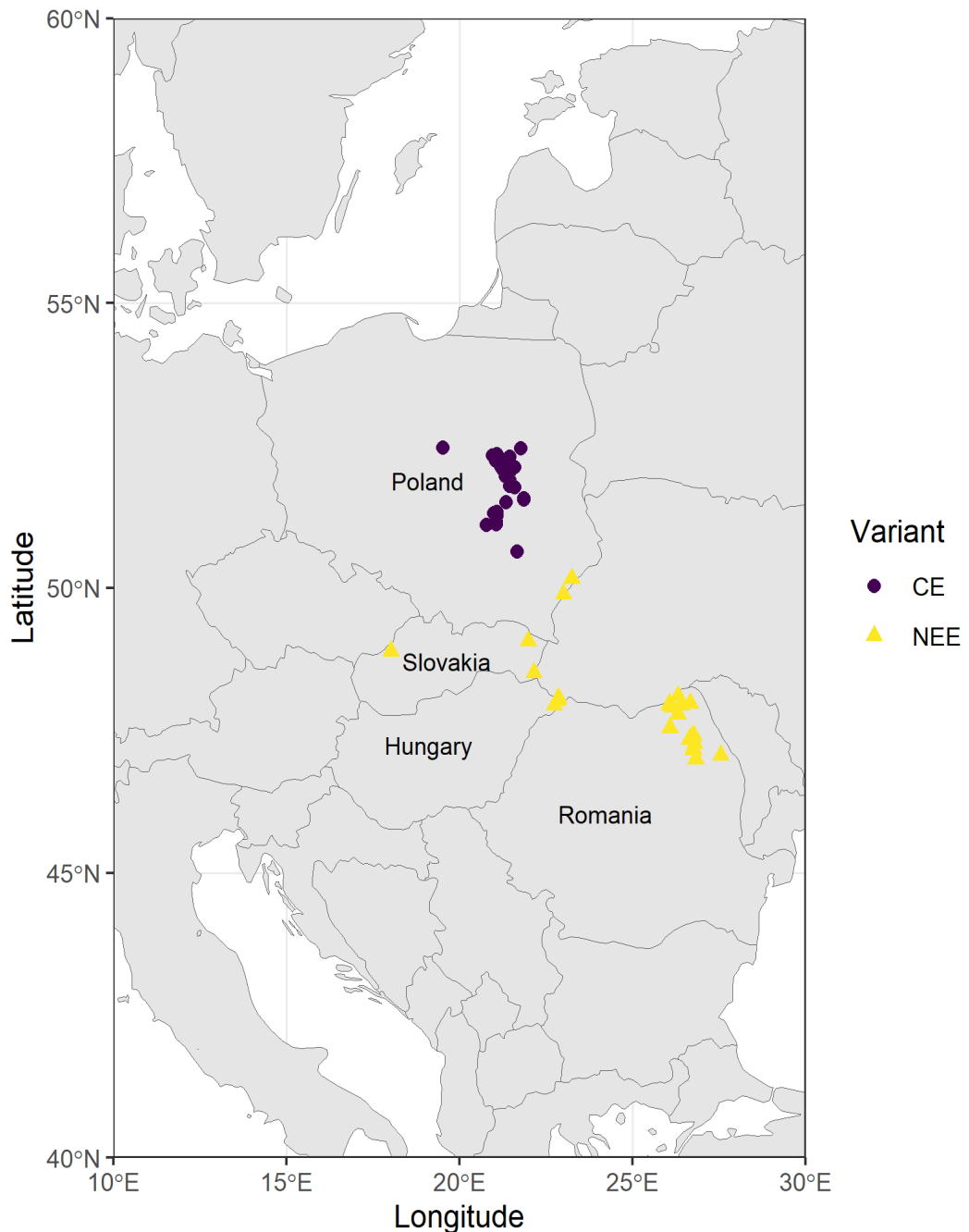


Рис. 7.15 Географічний розподіл філогенетичних груп ізолятів вірусу сказу, виділених в країнах ЄС з 2021 по січень 2023 р.

Дійсно, повторна поява сказу в Угорщині та Словаччині нагадує про важливість збереження достатньо широкого імунного поясу вздовж прикордонних ендемічних країн. Таким чином, попередні програми співпраці з впровадження пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу дозволили підтримувати імунний пояс шириною щонайменше 100 км, ширина якого продемонструвала свою ефективність у попередні роки. Співпраця та взаємна

допомога між ендемічними країнами зі сказу (Україна, Молдова) та сусідніми вільними (або майже вільними) країнами має першочергове значення для досягнення та підтримки території, вільної від сказу, а також для підтримки ендемічних країн на шляху до ліквідації сказу.

7.3. Удосконалення схеми лабораторної діагностики сказу

Контроль за поширенням вірусу сказу залишається актуальною проблемою в усьому світі, складність ситуації в нашій країні характеризується напруженим рівнем епізоотичної ситуації із поступовою зміною основного вектора захворюваності в бік збільшення кількості випадків серед свійських тварин (собак і котів), які проживають в безпосередній близькості до людей, появою нових генетичних варіантів вірусу, що може ускладнювати діагностику цієї інфекції.

Враховуючи виділення на території України різних генетичних кластерів, та визначення приналежності зразку з території Харківської області до європейських ліссавірусів кажанів першого типу (генотип EBLV-1) постає актуальне питання щодо удосконалення схеми лабораторної діагностики сказу тварин сучасними молекулярно-генетичними методами. Сучасна система лабораторної діагностики сказу повинна передбачати постановку ЗТ-ПЛР, здійснення секвенування та аналіз результатів секвенування зразків, які були виділені від диких тварин (як основного резервуару вірусу сказу в природі), від тварин, які були в безпосередньому контакті з людьми, із застосуванням різноманітних методів біостатистичного аналізу.

В Україні в обласних і регіональних лабораторіях ветеринарної медицини для діагностики сказу використовується головним чином РПФ, а у випадку сумнівних реакцій – біологічна проба на білих мишах, відповідно ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу».

Проте, ВООЗТ рекомендує для діагностики сказу використовувати декілька тестів, спрямованих на виявлення різних об'єктів (антигену, вірусу або

вірусної РНК). Це викликано тим, що використання однієї реакції (наприклад РПФ) не завжди є запорукою встановлення достовірного кінцевого діагнозу.

Враховуючи вищезгадане, нами запропонована схема лабораторної діагностики сказу тварин (рис.7.16).

Згідно представленої на рис. 7.16 схеми, із проб головного мозку, які надходять для дослідження, готують 20 % суспензію і мазки-відбитки. Спочатку проводять дослідження з прямого виявлення антигену вірусу сказу. Для цього мазки-відбитки досліджують в РПФ.

При отриманні позитивних результатів в РПФ ставиться заключний діагноз, який є основою для проведення протиепізоотичних і профілактичних заходів. При отриманні негативних результатів ставиться попередній негативний діагноз, а заключний ставиться на основі результатів ЗТ-ПЛР, гніздового варіанту ЗТ-ПЛР, або ЗТ-ПЛР в режимі реального часу.

У випадках, коли хворі на сказ (лабораторно підтверджений діагноз в РПФ або ЗТ-ПЛР) тварини були у контакті з людьми, або дикі тварини, що були застрелені в зонах проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу необхідно здійснювати секвенування зразків із подальшими біостатистичними дослідженнями.

У випадку дослідження матеріалу з ознаками автолізу необхідно використовувати молекулярно-генетичні методи. Тобто, заключний діагноз, ставиться за результатами РПФ та різних варіантів ЗТ-ПЛР.

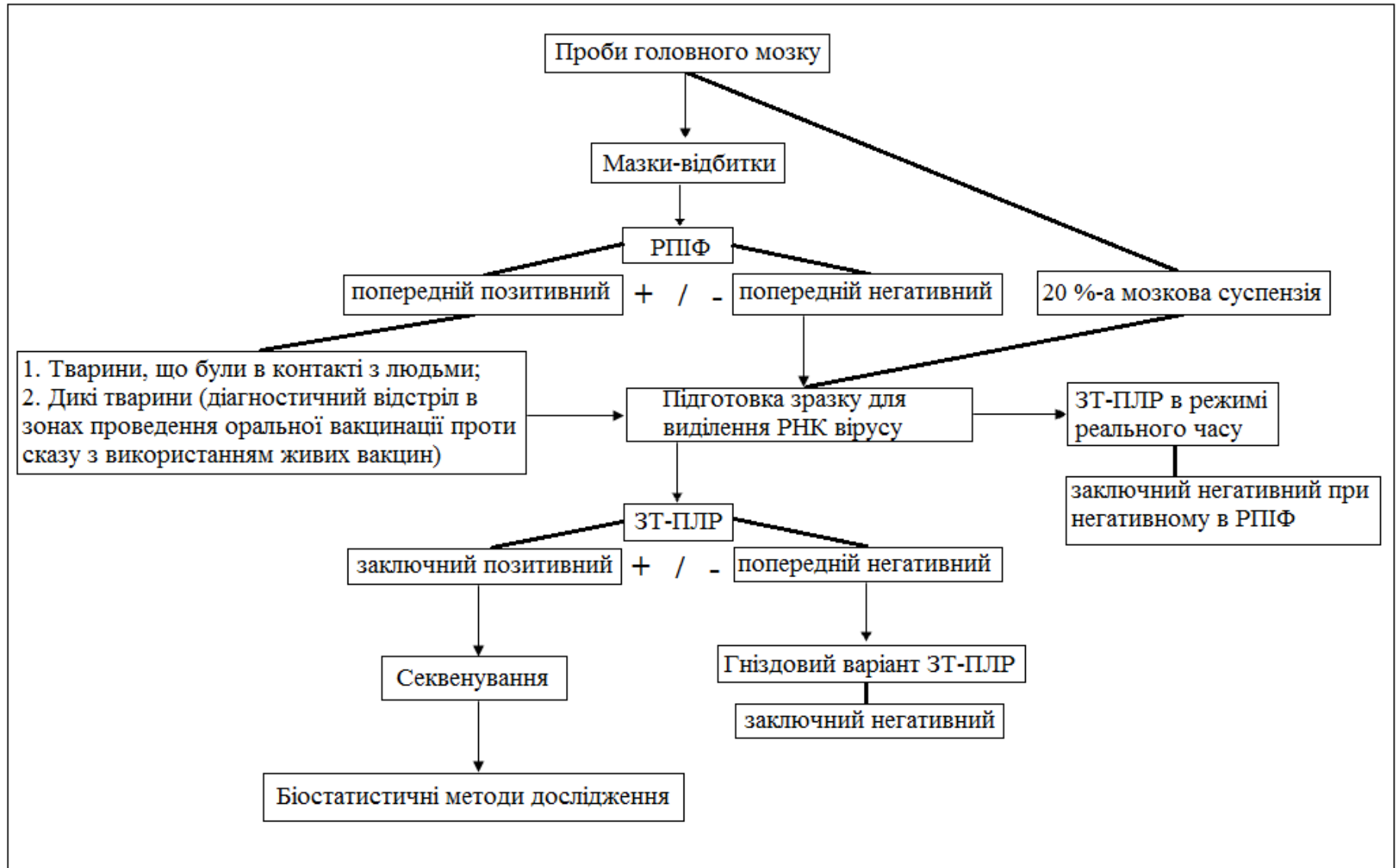


Рис. 7.16. Схема лабораторної діагностики сказу із впровадженням методів ПЛР.

В подальшому проводиться дослідницька робота з вивчення молекулярно-біологічних властивостей виділених ізолятів. З метою типування вірусу сказу пропонується застосування постановки ЗТ-ПЛР з парою олігонуклеотидних праймерів, які призначені для генотипування всіх відомих генотипів ліссавірусів тварин, які внесені до міжнародної класифікації, з подальшою детекцією матеріалів в 1,5 % агаровому гелі. Надалі зразки піддають секвенуванню з тими ж праймерами, які використовувалися при постановці ЗТ-ПЛР.

Наступним етапом дослідження є внесення результатів секвенування в форматі FASTA до програм біостатистичної обробки результатів (наприклад MEGA 6.06) за алгоритмом, який описаний в розділі 2.

Результати розділу 7 висвітлені в наукових працях [22, 334, 348, 23, 24, 29, 338, 57].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 7

В результаті підбору вуличних ізолятів вірусу сказу було обрано 100 зразків, які зберігаються в колекції штамів та ізолятів лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН. Після порівняльних досліджень відібраних зразків різними діагностичними методами (РПФ, БП, ЗТ-ПЛР), подальшу роботу проводили із 82-а зразками, які були придатними для виділення генетичного матеріалу в ЗТ-ПЛР.

В розрізі етіологічної структури відібраних для молекулярно-генетичних досліджень ізолятів вірусу сказу, основну масу складала зразки від котів (19), собак (16) та лисиць (14), оскільки саме ці види тварин є основними векторами вірусу сказу. Крім цього, було відібрано від куниць 10 зразків, ВРХ – 6, борсуків – 3, вовків – 2, дві проби від людини та по одному зразку від рисі, лося, щура і кажана.

За результатами молекулярно-генетичної характеристики вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України, з'ясовано, що ступінь їх генетичної спорідненості за амінокислотним складом становить 96 – 99 %, що є типовою характеристикою для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи. Однак, вуличний ізолят виділений від кажана має відмінність за амінокислотним складом від решти вуличних ізолятів вірусу сказу, що були виділені від наземних ссавців в Україні, на рівні 96 – 98 %.

Згідно розміщення на дендрограмі, усі ізоляти вірусу сказу були розподілені на 4 генетичні кластери з подальшою їх картографією відповідно адміністративних областей. Отриманні результати продемонстрували територіальний розподіл генетичних варіантів вуличних ізолятів вірусу сказу із вираженою географічною приуроченістю. На території правобережної України переважали ізоляти вірусу сказу, які відносяться до 1-го та 2-го кластеру, а на лівобережній – 3-го та 4-го генетичних кластерів.

Додаткове філогенетичне дослідження ізолятів вірусу сказу виділених лише від свійських і диких м'ясоїдних тварин, як основних векторів вірусу на території нашої країни, показало, що на території правобережної України переважають ізоляти, які належать до першого, другого та третього кластерів, четвертий кластер циркулює на території лівобережної України.

Отже, незважаючи на високий ступінь генетичної однорідності вірусу сказу, який циркулює на території України, існують відмінності між ізолятами за географічним розподілом.

Також, дослідження на території України унікальні тим, що нами було вивчено ізолят від кажана, який за своїми генетичними характеристиками близький до 3-го та 4-го кластерів, однак мав певні відмінності. В результаті побудови філогенетичного дерева, на якому були представлені всі класифіковані генотипи вірусу сказу виділені від кажанів на території різних країн, визначено приналежність зразку до першої філогрупи п'ятого генотипу ліссавірусів тварин (EBLV-1).

В результаті проведення філогенетичного аналізу двох секвенованих зразків від людей з'ясовано, що вони належать до першої філогрупи. За своїми генетичними характеристиками зразки близькі до польового ізоляту, який виділено від лисиці на території Франції в 1991 році (генетичні послідовності внесені до GenBank) і є типовим представником 1-го генотипу ліссавірусів тварин. Молекулярно-генетичні дослідження, проведені шляхом філогенетичного аналізу частини послідовності N гену (нуклеопротеїну), дали можливість встановити, що генетична спорідненість за амінокислотним складом вуличних ізолятів виділених від людей з території України і зразків, які представлені в GenBank, становила 96–99 %. Також генетичні послідовності досліджуваних зразків характерні для ізолятів, які виділяються в географічній зоні степу і лісостепу південно-східної Європи.

Застосування методів картографування зразків забезпечує можливість візуальної оцінки результатів із можливістю оцінки надзвичайно великою кількістю анамнестичних даних, результатів секвенування та статистичною

обробкою результатів дослідження. А застосування різноманітних математичних моделей забезпечує можливість моделювання поширеності окремих кластерів вірусу сказу територією України з візуалізацією векторів.

В іншому філогенетичному дослідженні виявлено географічну належність випадків сказу, що були виявлені в нових ендемічних спалахах на території країн ЄС. Так, варіант SE виявлено в республіці Польща, а варіант NEE в Польщі, Словаччині, Угорщині та Румунії в прикордонних з Україною територіях.

Філогенетичний аналіз показав, що ізоляти вірусу сказу з України (з Вінницької (3), Кіровоградської (1) та Рівненської (2) областей) відносяться до кластеру С. Отже, це може бути частковим підтвердженням ефективності буферної зони з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що проводиться на території західних областей України з 2012 року, так як свідчить про генетичну відмінність між ізолятами з країн ЄС та України. Тобто, цим дослідженням не виявлено потрапляння вірусу сказу з території України до країн ЄС, а виникнення нових спалахів є скоріш за все наслідком зупинки кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин на території цих країн.

Повторна поява сказу в Угорщині та Словаччині нагадує про важливість збереження достатньо широкого імунного поясу вздовж прикордонних ендемічних країн. Таким чином, попередні програми співпраці з впровадження пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу дозволили підтримувати імунний пояс шириною щонайменше 100 км, ширина якого продемонструвала свою ефективність у попередні роки.

Доповнення схеми лабораторної діагностики сказу викликано цілим рядом факторів: вдосконаленням методів діагностики та підвищенням їх чутливості; вдосконаленням методики виконання самих досліджень, спираючись на досвід та практичні навички дослідників; розробкою та впровадженням у практику біостатистичних методів аналізу результатів секвенування зразків.

Тому, запропонована схема передбачає постановку заключного діагнозу методами РПФ та ЗТ-ПЛР із подальшим секвенуванням та філогенетичним аналізом.

До того ж, запропонована схема пропонує умови гармонізації лабораторної діагностики сказу з міжнародними рекомендаціями. Адже, з 2018 року в Керівництві з діагностичних тестів МЕБ (ВООЗТ) метод ЗТ-ПЛР для лабораторної діагностики сказу визнано діагностичним тестом. Однак, в Україні, відповідно ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу» цей метод не передбачено.

РОЗДІЛ 8. ОЦІНКА АНТИРАБІЧНОГО ІМУНІТЕТУ

Здійснення оцінки антирабічного імунітету має важливе значення. Адже ці дослідження є елементом комплексної оцінки ефективності проведеної пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу; показником індивідуальної чутливості на введення антигену вірусу сказу; показником захищеності від інфікування вірусом сказу, що є обов'язковим фактором при некомерційному переміщенні в інші тварини тварин-компаньйонів; показником якості і належної антигенної активності антирабічної вакцини для парентерального застосування тощо.

Саме тому, дослідження індивідуальної напруженості специфічного антирабічного імунітету у тварин є безумовним чинником, який доповнює лабораторну діагностику сказу.

8.1. Створення галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну

Процес отримання галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну включає наступні етапи:

- 1). Отримання специфічної до вірусу сказу сироватки крові тварин;
- 2). Визначення її активності загальноприйнятими методами;
- 3). Підбір кріо- та ксеропротекторних середовищ для ліофілізації сироватки та відповідного режиму висушування;
- 4). Калібрування отриманого зразку до міжнародного стандарту імуноглобуліну з відомим титром антитіл до вірусу сказу.

Вагомим етапом роботи є вдалий підбір захисних середовищ для ліофільного висушування конкретного біологічного препарату, оскільки процес ліофілізації пов'язаний із переходом зв'язаної та вільної вологи речовини із кристалічної форми в газоподібну, минаючи рідку фазу, що можливо лише за певних умов (температура, вакуум) та напряму впливає на імунологічну активність імуноглобулінів і забезпечує можливість довготривалого зберігання препарату.

Не дивлячись на те, що значна частина імунодіагностичних препаратів на одному із заключних етапів виробництва піддається ліофільному висушуванню, універсального кріо- та ксеропротекторного середовища для всіх біопрепаратів не існує. Тому, підбір параметрів ліофілізації та оптимального складу захисного середовища здійснюється індивідуально в кожному конкретному випадку.

Підбір кріопротекторного середовища та ліофілізація галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну.

Для ліофільного висушування використовували отриманий нами та концентрований сульфатом амонію антирабічний імуноглобулін із сироватки крові кролів із специфічною активністю до вірусу сказу $327,0 \pm 48$ МО/см³ в РН та $391,6 \pm 64$ МО/см³ в ТФ-ІФА розводили 1:10 ФСБ, змішували у співвідношенні 8:2 з підготовленими варіантами кріопротекторних середовищ, приготованих на 0,01М ФСБ, компоненти яких були взяті в рівних кількостях:

- 1). Глюкоза + гліцин + желатин;
- 2). Сахароза + гліцин + желатин;
- 3). Сахароза + гліцин + крохмаль картопляний;
- 4). Глюкоза + гліцин + крохмаль картопляний;
- 5). Сахароза + гліцерин + желатин;
- 6). Гліцин + гліцерин + желатин.

Отримані зразки фасували в скляні флакони по 1 см³ в асептичних умовах.

Флакони поміщали в касети, які потім ставили в низькотемпературний холодильник за температури мінус $80 \pm 0,5$ °С на 10 – 12 годин. Після закінчення терміну заморожування, касети поміщали у вакуумну сушильну установку Alpha 1 – 4, виробництва фірми Martin Christ GmbH (Німеччина) згідно рекомендацій виробника.

Після ліофілізації, в результаті візуального огляду отриманих зразків антирабічного імуноглобуліну, визначили, що незалежно від складу використаних у досліді захисних середовищ в усіх зразках була сформована таблетка (суха речовина із однорідною дрібнозернистою структурою світло-жовтого кольору). Залишкова вологість різних зразків імуноглобуліну була в

межах 1,4 – 3 %, а вміст дослідних зразків повністю відновлювався дистильованою водою менше ніж за 60 секунд.

Далі, з метою оцінки ефективності застосованих в якості кріопротекторів середовищ, провели дослідження специфічної активності зразків антирабічного імуноглобуліну після ліофілізації в ТФ-ІФА (табл. 8.1).

Таблиця 8.1

Рівень специфічної активності до вірусу сказу ліофілізованих зразків антирабічного імуноглобуліну з різними варіантами захисних середовищ в ТФ-ІФА до та після сублімації, n=6

Стабілізуюче середовище	Титр антирабічних антитіл		
	специфічна активність до ліофілізації, МО/см ³	після ліофілізації	
		абсолютне значення, МО/см ³	зниження активності, %
№ 1	11,7 в РН 12,5 в ТФ-ІФА	9,6	17,9-23,2
№ 2		10,2	12,8-18,4
№ 3		9,8	16,2-21,6
№ 4		8,6	26,5-31,2
№ 5		8,2	29,9-34,4
№ 6		8,5	27,4-32,0

В результаті досліджень методом ТФ-ІФА встановлено, що середовище № 2 (Сахароза + гліцин + желатин) є найбільш придатним для ліофілізації антирабічного імуноглобуліну. Його антирабічна активність після ліофілізації становила 10,2 МО/см³. Тобто падіння активності після висушування склало 12,8 – 18,4 %. При застосуванні середовищ № 1 і 3 падіння антирабічної активності імунобіологічного препарату було на рівні 16,2 – 23,2 %, залежно від методу оцінки. Недостатніми кріопротекторними властивостями володіли

середовища № 4 – 6. При їхньому використанні зниження специфічної активності антирабічного імуноглобуліну відбувалось на 26,5 – 34,4 %.

Для прискореного аналізу стабільності специфічної активності до вірусу сказу отриманих ліофілізованих проб антирабічної сироватки нами застосовано тест «швидкого старіння», що полягав у прогріванні зразків за температури 37 °С протягом 4 тижнів. Результати представлені в табл. 8.2.

Таблиця 8.2

Активність ліофілізованих зразків антирабічного імуноглобуліну з різними варіантами захисних середовищ в ТФ-ІФА в результаті застосування тесту «швидкого старіння», n=6

Стабілізуюче середовище	Титр антитіл до вірусу сказу		
	після ліофілізації, МО/см ³	тест «швидкого старіння»	
		абс., МО/см ³	зниження активності, %
№ 1	9,6	9,1	5,2
№ 2	10,2	9,9	2,9
№ 3	9,8	9,6	2,0
№ 4	8,6	н/д	н/д
№ 5	8,2	н/д	н/д
№ 6	8,5	н/д	н/д

Примітка: н/д – не досліджували.

В результаті, антирабічна активність ліофілізованої гіперімунної сироватки зразка № 1 знизилась на 0,5 МО/см³ і становила 9,1 МО/см³. Активність зразка № 3 була на рівні 9,6 МО/см³, а зразка № 2 – 9,9 МО/см³, тобто рівень зниження активності був 2,0 і 2,9 % відповідно.

Отже, відповідно результатів оцінки активності методом ТФ-ІФА ліофільно висушених зразків антирабічної гіперімунної сироватки, встановлено, що оптимальними кріопротекторними середовищами є № 2

(Сахароза + гліцин + желатина) та № 3 (Сахароза + гліцин + крохмаль картопляний).

Калібрування галузевого зразку відносно міжнародних стандартів антирабічного імуноглобуліну ВООЗ та ВООЗТ.

Враховуючи те, що використання значень активності стандартних антирабічних імуноглобулінів, які встановлюються методами віруснейтралізації, на відміну від тих, які визначені в аналізах зв'язування антиген-антитіло (ТФ-ІФА) недоречне і досить часто проблематичне, нами проведено калібрування отриманого ліофільного препарату відносно Міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (30 МО/см^3) в реакціях віруснейтралізації *in vivo* та *in vitro*. Для цього досліджено зразок шляхом трикратної постановки РН на білих мишах і чотирикратної постановки FAVN-тесту (табл. 8.3).

Таблиця 8.3

Калібрування дослідного зразку антирабічного імуноглобуліну

№ дослідю	РН на білих мишах, МО/см^3	FAVN-тест*, МО/см^3
1.	10,50	10,45
2.	11,80	10,45
3.	10,80	13,77
4.	-	10,45
Середнє значення	$11,03 \pm 0,43$	$11,28 \pm 0,83$

Результати калібрування отриманого нами зразку антирабічного імуноглобуліну показали активність препарату в РН на білих мишах на рівні $11,03 \pm 0,43 \text{ МО/см}^3$, а в FAVN-тесті – $11,28 \pm 0,83 \text{ МО/см}^3$.

Для визначення можливості застосування розробленого зразку імуноглобуліну з діагностичною метою, нами було проведено порівняльні дослідження у FAVN-тест сироваток крові собак, які були вакциновані 23.03.2017 р. пероральною антирабічною вакциною проти сказу «Броварабіс V-

RG», що надійшли до лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН 25.04.2017 р. Кров для дослідження була відібрана на 0, 14 та 29 добу досліду.

В якості контролю реакції, з порівняльною метою, використовували стандартну позитивну антирабічну сироватку ВООЗТ із активністю 6,7 МО/см³, виробництва Європейської референс-лабораторії зі сказу ANSES (м. Нансі, Франція) та отриманий нами зразок ліофілизованого антирабічного імуноглобуліну № 2. Результати порівняльних досліджень рівня поствакцинального імунітету в собак представлені в табл. 8.4.

Таблиця 8.4

Порівняльні дослідження специфічної активності до вірусу сказу сироваток крові собак з використанням різних стандартів антирабічного імуноглобуліну, n=24

№ тварини	Титр антитіл, МО/см ³					
	0-а доба		14 доба		29 доба	
	Стандарт Ig	Дослідний Ig	Стандарт Ig	Дослідний Ig	Стандарт Ig	Дослідний Ig
1	0,04	0,03	13,77	10,45	4,56	4,56
2	0,07	0,04	0,22	0,03	0,50	0,66
3	0,02	0,01	0,50	0,50	0,50	0,66
4	0,02	0,02	0,29	0,38	0,50	0,50
5	0,02	0,01	0,50	0,29	0,66	0,87
6	0,10	0,10	0,29	0,22	1,51	2,62
7	0,02	0,04	0,66	0,66	1,15	1,99
8	0,07	0,03	1,51	1,99	3,46	3,46

Примітка: * – різниця достовірна при $p \leq 0,05$.

Аналіз отриманих результатів з визначення рівня напруженості імунітету після введення антирабічної вакцини свідчить про те, що за дослідження сироваток крові собак перед щепленням та на 14-у та 29-у добу досліду достовірної різниці між значеннями титрів антитіл, з використанням в якості

контролю стандартного імуноглобуліну та отриманого нами Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну, не виявили.

За результатами проведених досліджень розроблено технологічний регламент виготовлення Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну (Затверджений Вченою радою ІВМ, протокол № 13 від 24 жовтня 2016 р.). Новизна розробки підтверджена патентом України на корисну модель «Спосіб одержання галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну» (№118385 від 10.08.2017).

Отримані результати дають підставу стверджувати, що розроблений нами дослідний зразок Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну відповідає необхідним критеріям (активність та стабільність) подібних препаратів і може бути використаний як робочий стандарт антирабічного імуноглобуліну в рутинній лабораторній практиці при оцінці антирабічної активності сироваток крові тварин різними серологічними методами.

8.2. Характеристика параметрів реакції віруснейтралізації в культурі клітин для виявлення антитіл до вірусу сказу (FAVN-тест)

Дослідження напруженості антирабічного імунітету методом FAVN-тест в ДНДІЛДВСЕ акредитовані відповідно до вимог міжнародного стандарту ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій (ISO/IEC 17025:2017, IDT)», що є невід'ємною складовою процедури визнання результатів випробувань.

Щорічна валідація методу FAVN-test відбувалася під егідою Європейської референс-лабораторії зі сказу ANSES (м. Нансі, Франція). При здійсненні валідації оцінювали специфічність і відтворюваність методу, діапазон варіації значень при трикратних повтореннях досліджень за коефіцієнтом варіації (допускається відхилення в межах 15 % від середнього значення) і дослідне значення теоретичного показника $0,5 \text{ МО/см}^3$ із визначенням діапазону очікуваних титрів.

Відповідно ДСТУ ISO/IEC 17025:2017 для забезпечення відповідної якості досліджень і моніторингу стабільності спеціалізованих параметрів реакції FAVN-тест впродовж визначеного терміну розроблено і впроваджено картки контролю. В картки вносяться отримані в кожній постановці реакції значення \log_{50} позитивної стандартної сироватки МЕБ (0,5 МО/см³), значення \log_{50} негативної сироватки та значення \log_{50} інфекційного титру референс-штаму вірусу сказу CVS-11. Для усіх значень встановлено коридор допустимих відхилень параметрів постановки реакції.

Безумовно, забезпечення отримання достовірних результатів вимагає суворого дотримання параметрів постановки реакції. Особливо це стосується реакції нейтралізації, в якій використовуються живі біологічні об'єкти – в нашому випадку це референс-штам вірусу сказу CVS-11 та культура клітин ВНК-21 С13 (ATCC CCL-10).

Отримання вірусомісного матеріалу з достатнім інфекційним титром є певною запорукою достовірності визначення віруснейтралізуючої активності сироваток крові тварин, однак важливим етапом, поряд із накопиченням вірусу й відпрацюванням постановки FAVN-тест є визначення титру інфекційної активності вірусу сказу і дози взятої в кожному конкретному досліді.

Безпосереднє визначення титру вірусу сказу референс-штаму CVS-11 базується на підборі оптимальної кратності розведення і початкового розведення вірусу, так як інфекційним титром дослідної культуральної вірусомісної суспензії є граничне розведення вірусу, при якому спостерігаються фокуси флуоресценції. Визначення титру вірусу, після отримання вірусомісної сировини з метою подальшого встановлення граничного розведення та обрахунку інфікуючої дози для використання в реакції, проводили шляхом приготування і дослідження послідовних 10-кратних розведень від 10^{-1} до 10^{-12} . Протягом 2019-2022 рр. було отримано та у трьох повторах досліджено 6 серій вірусу референс-штаму CVS-11, який після отримання та звільнення від клітинного детриту, розподілявся на аліквоти.

Зберігання вірусу впроваджене дубльоване за температури мінус 80 ± 1 °C та мінус 196 °C в умовах рідкого азоту.

Для використання у FAVN-тест вірусу сказу референс-штаму CVS-11 проводили теоретичний розрахунок заражаючої дозу вірусу, яка становила $100 \text{ TCID}_{50}/0,05 \text{ см}^3$. Калібрування заражаючої дози нової серії вірусу проводили шляхом трикратного дослідження інфекційного титру, а також віруснейтралізуючої активності референтної сироватки із активністю $0,5 \text{ МО}/\text{см}^3$, порівнюючи отримані значення за використання попередньої серії вірусу сказу. Тільки після отримання відповідних очікуваних параметрів реакції (титр вірусу / титр референтної сироватки) нову серію вірусу сказу референс-штаму CVS-11 використовували у рутинних дослідженнях.

Протягом 2019-2022 рр. проведено постановку 537 реакцій (145 в 2019 р., 134 в 2020 р., 124 в 2021 р. і 134 в 2022 р.) методом FAVN-тест, в яких досліджено та обраховано \log_{50} позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до прописного теоретичного значення – $0,5 \text{ МО}/\text{см}^3$), \log_{50} негативної сироватки та значення \log_{50} інфекційного титру референс-штаму вірусу сказу CVS-11. За цими значеннями були побудовані відповідні графіки. Враховуючи значну кількість інформації щороку формувалося по два графіки на кожен контрольований показник (Додаток Е).

В 2019 році з 21 пасажу розпочали застосування нової серії вірусу (рис. 1 Додатку Е), однак на рівні 23-25 постановок значення титру референс-штаму CVS-11 було менше очікуваного $4,63 \log_{50} \text{ TCID}_{50}$ (нижня обрахована межа титру вірусу $4,74 \log_{50} \text{ TCID}_{50}$), хоча титр позитивної сироватки був в межах визначеного діапазону (рис. 2 Додатку Е). Впровадження коригувальних дій стабілізували титр вірусу в подальших реакціях, який варіював у межах $4,73$ - $5,08 \log_{50} \text{ TCID}_{50}$, що є задовільним показником. В шести постановках реакції при подальшому аналізі виявлено нижчі значення позитивної стандартної сироватки МЕБ, хоча титри вірусу в цих протоколах були в межах визначеного діапазону. Починаючи з 110 постановки реакції використано наступну серію титрованого та охарактеризованого вірусу сказу референс-штаму CVS-11.

Протягом наступних 15 пасажів відмічали завищені від очікуваних параметрів титри вірусу (більше $5,0 \log_{50} \text{TCID}_{50}$) з двома піковими значеннями 5,33 і $5,27 \log_{50} \text{TCID}_{50}$ (рис. 3 Додатку Е). Завдяки коригувальним діям (поступового зменшення дози вірусу із контролем за показниками позитивної стандартної сироватки МЕБ) було стабілізовано титр вірусу в межах $4,87\text{-}5,21 \log_{50} \text{TCID}_{50}$. Під час зменшення інфікуючої дози вірусу, що застосовувалися в кожній реакції було встановлено мінімальне значення позитивної стандартної сироватки МЕБ в шести реакціях. Однак ці значення (117-133 протокол) коливалися в межах визначеного діапазону (рис. 4 Додатку Е). В подальшому використано в реакції ще три серії вірусу (рис. 5-16 Додатку Е). Значних коливань та відхилень титрів як вірусу сказу референс-штаму CVS-11, так і значень позитивної стандартної сироватки МЕБ в реакції не було.

Отримані результати свідчать про необхідність постійного дотримання суворого контролю за показниками титрів вірусу сказу та стандартної сироватки в кожній реакції, так як стабільність (особливо при зміні серії вірусу сказу, або оновлені лінії культури клітин) цих показників свідчить про якість проведених досліджень і про достовірність отриманих результатів значень дослідних сироваток на наявність антитіл до вірусу сказу.

8.3. Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин

Імунна відповідь на інфекцію та вакцинацію забезпечується клітинними й гуморальними факторами. Віруси сказу містять п'ять структурних білків — N, P, M, G і L, а також поліпептиди клітин господаря. Імунна система ссавців розпізнає велику кількість антигенних сайтів п'яти мажорних протеїнів. Вірусна нейтралізація *in vitro* при відсутності комплекменту забезпечується антитілами до антигенних сайтів глікопротеїну, тому головним протективним білком, який формує захист, є глікопротеїн (G-66). На сьогодні основним методом оцінки імунної відповіді, рекомендованим ВООЗ і ВООЗТ, є визначення віруснейтралізуючих антитіл. Референтними методами, якими

визначають напруженість антирабічного імунітету, є FAVN-тест (тест вірусної нейтралізації флуоресцентними антитілами) і RFFIT (тест швидкої інгібіції фокусів флуоресценції) [286, 359, 360].

Вимогою ЄС стосовно некомерційного переміщення свійських м'ясоїдних тварин, що визначено в Регламенті ЄС № 576/2013, передбачено, що собаки, коти і тхорі, які ввозяться до європейських країн і походять з третіх країн (у т.ч. України), повинні бути вакциновані проти сказу і мати кількісний об'ємний аналіз антирабічних антитіл на рівні не менше $0,50 \text{ MO/cm}^3$ (міжнародні одиниці).

Саме тому, вивчення специфічного імунного захисту у вакцинованій популяції собак і котів є соціально необхідним завданням, що визначає його актуальність. При дослідженні сироваток крові собак на 14 добу з моменту імунізації спостерігали 100 %-й захист тварин від зараженням сказу, оскільки титр антитіл був вище мінімально захисного рівня (табл. 8.5). Динаміка утворення антитіл характеризувалася зростанням до 27 доби, де і набула максимуму ($23,9 \pm 3,51 \text{ MO/cm}^3$). Слід відмітити, що у однієї з тварин титр антитіл становив $0,87 \text{ MO/cm}^3$, що вказує на індивідуальну сприйнятливність тварини на введення вакцини.

Через 41 добу після щеплення спостерігали тенденцію до зниження титрів антитіл порівняно із 27 добою досліджу, різниця була в 2,7 разів.

Таблиця 8.5

Динаміка титрів антирабічних антитіл в сироватках крові собак

№ тварини	Титр антитіл, МО/см ³					
	1 доба	7 доба	14 доба	21 доба	27 доба	41 доба
1	0	н/д	4,56	6,01	н/д	2,62
2	0	н/д	0,87	6,01	23,93	1,99
3	0	0,66	4,56	6,01	23,93	6,01
4	0	1,99	4,56	10,45	31,55	23,93
5	0	0,17	1,15	0,87	0,87	н/д
6	0	0,39	1,51	6,01	23,93	3,46
7	0	0,50	3,46	4,56	н/д	н/д
8	0	0,87	1,15	2,62	н/д	18,15
9	0	1,51	3,46	6,01	31,55	6,01
10	0	1,99	4,56	10,45	31,55	7,92
Середній титр	0	1,01±0,29	2,98±0,61*	5,9±0,81**	23,9±3,51	8,76±2,91

Примітки: * – різниця достовірна відносно результатів попередніх досліджень при $P < 0,001$; ** – різниця достовірна відносно результатів попередніх досліджень при $P < 0,01$; н/д – не досліджували.

Результати дослідження сироваток крові, відібраних від котів, на наявність специфічних антирабічних антитіл представлені в таблиці 8.6.

Як свідчать результати, що наведені в табл. 8.6 на 7 добу спостереження в сироватках крові котів середній титр антирабічних антитіл знаходився вище мінімально захисного рівня ($1,27 \pm 0,15$ МО/см³). Збільшення антирабічних антитіл спостерігалась на 14 добу з моменту імунізації, їх рівень зріс в 2,6 рази, порівняно із показниками на 7 добу. На 27 добу статистично достовірно рівень специфічних антирабічних антитіл в сироватках крові котів набув максимуму – $28,36 \pm 1,69$ МО/см³. На 41-у добу поствакцинальний антирабічний імунітет у котів характеризувався стрімким зниженням титру антирабічних антитіл в 2,6

рази, однак головним критерієм оцінки було те, що титри антирабічних антитіл у всіх тварин були вищі мінімального протективного рівня.

Таблиця 8.6

Динаміка титрів антирабічних антитіл в сироватках крові котів

№ тварини	Титр антитіл, МО/см ³					
	1 доба	7 доба	14 доба	21 доба	27 доба	41 доба
1	0	2,62	3,46	7,92	31,55	13,77
2	0	0,87	2,62	6,01	23,93	7,92
3	0	1,51	2,62	6,01	31,55	13,77
4	0	0,87	1,99	6,01	23,93	7,92
5	0	1,51	4,56	7,92	23,93	10,45
6	0	1,15	3,46	6,01	23,93	10,45
7	0	1,51	4,56	7,92	31,55	13,77
8	0	1,51	3,46	6,01	23,93	7,92
9	0	0,87	3,46	6,01	31,55	13,77
10	0	0,66	2,62	4,56	23,93	10,45
Середній титр	0	1,27±0,15	3,25±0,24*	6,49±0,4*	28,36±1,69*	10,82±0,83*

Примітка: * - різниця достовірна відносно результатів попередніх досліджень при $P < 0,001$.

Отже, в результаті проведених нами досліджень на собаках та котях було встановлено, що на 14 добу з моменту імунізації антирабічні антитіла набувають захисного рівня – $2,98 \pm 0,61$ та $3,25 \pm 0,24$ МО/см³ відповідно. Як у собак, так і в котів, максимальний рівень антирабічних антитіл спостерігали на 27 добу досліду ($23,9 \pm 3,51$ та $28,36 \pm 1,69$ МО/см³ відповідно). Однак, на 41 добу рівень антитіл у обох видів тварин знизився до $8,76 \pm 2,91$ та $10,82 \pm 0,83$ МО/см³, що свідчить про закінчення синтезу нових специфічних антитіл та стабілізації гуморальних значень специфічного поствакцинального імунітету.

В інших дослідах для оцінки імунного захисту вакцинованих проти сказу свійських м'ясоїдних тварин (собак і котів) були проведені лабораторні

дослідження на напруженість антирабічного імунітету 3927-и проб сироваток крові собак і котів, після чого здійснено аналіз результатів експертиз.

Аналіз показав, що частка сироваток крові від тварин, що були вакциновані полівалентними вакцинами, становила 19 % (746 проб), 3181 (81 %) – вакциновані моновалентними антирабічними вакцинами різних виробників. Титри антирабічних антитіл, які були визначені при постановці FAVN–тесту, були в межах 0,06-10,21 МО/ см³.

Встановлено в 57-и пробах недостатній рівень (менше 0,50 МО/см³) антитіл до вірусу сказу, що становить 1,45 %, де 31-а проба була від тварин, що були вакциновані моновалентними антирабічними вакцинами, а 26 – полівалентними вакцинами. Частка проб з недостатнім захисним антирабічним імунітетом у тварин, які були щеплені моновалентними вакцинами, становила 0,97 % (31 з 3181), а частка сироваток крові із недостатнім титром антитіл до вірусу сказу, що отримані від тварин, яким вводили полівалентні вакцини, становила 3,49 % (26 з 746).

Окремо здійснено аналіз віруснейтралізуючої активності сироваток крові собак і котів, вакцинованих проти сказу полівалентними вакцинами (табл. 8.7).

Таблиця 8.7

**Віруснейтралізуюча активність сироваток крові собак і котів,
вакцинованих проти сказу полівалентними вакцинами**

Сироватки крові з титрами антирабічних антитіл, МО/ см ³							
≥ 4,46		1,95-3,46		0,50-1,51		≤ 0,5	
Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%	Кількість	%
242	32,4	307	41,2	171	22,9	26	3,5

Як свідчать дані таблиці, загалом антитіла до вірусу сказу в захисному титрі (більше 0,5 МО/ см³) були виявлені в 96,51 % досліджених проб. В 32,4 % проб сироватки крові були високоактивними до вірусу сказу (титри специфічних антитіл були більше 4,46 МО/ см³. 4,46 та 10,21 МО/см³ найвищий поріг чутливості реакції, тобто точні значення титрів антирабічних антитіл

могли бути значно вищими). В 41,2 % проби (307 зразків) були із титрами антитіл в межах 1,95-3,46 МО/ см³, а 22,9 % (171 проба) були низькоактивними із титрами в межах 0,50-1,51 МО/ см³.

Далі здійснено аналіз максимальних значень віруснейтралізуючої активності дослідних сироваток в реакції (рис. 8.1).

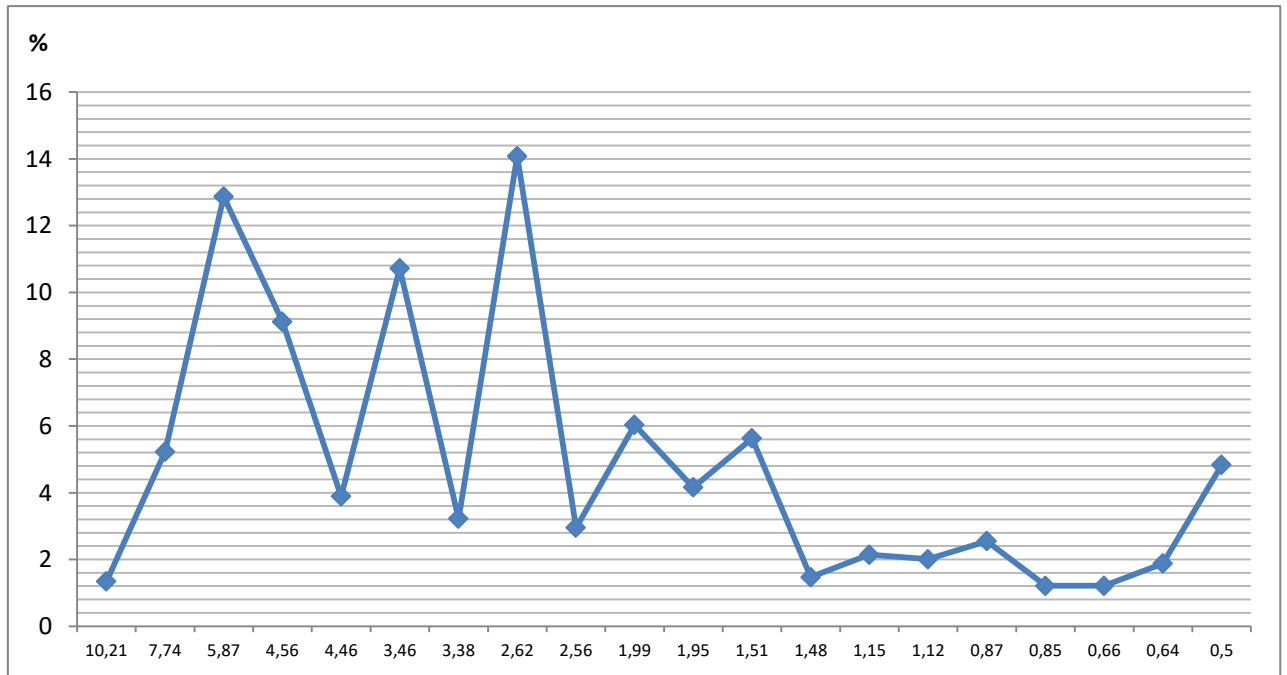


Рис. 8.1 Граничні титри антитіл до вірусу сказу в дослідних сироватках собак і котів, вакцинованих проти сказу полівалентними вакцинами.

Результат тесту дослідних сироваток відповідає порівняльному виміру – тесту стандартної сироватки МЕБ з відомим нейтралізуючим титром, який дорівнює 0,5 МО/ см³. Тому, залежно від нейтралізації вірусу в перших чи наступних розведеннях стандартної сироватки, будуть пропорційно нижчі або вищі граничні показники дослідних сироваток. Як видно з рисунку, найбільші частки сироваток були з титрами 2,62 МО/см³ (14,08 %), 3,46 МО/см³ (10,72 %) та 5,87 МО/см³ (12,87 %), однак частина цих значень відповідала максимальному значенню тесту стандартної сироватки МЕБ в кожній окремій реакції. Це свідчить, що антирабічна активність цих проб може бути вищою, ніж встановлені граничні значення.

Враховуючи наявність в Україні значної кількості комунальних і приватних притулків для безпритульних тварин, а також організацій, які проводять стерилізацію і антирабічну вакцинацію безпритульних тварин нами були проведені дослідження антирабічної активності сироваток крові безпритульних собак. В 2017 році співробітниками Громадської організації «Зооконтроль» на території м. Покровськ (Донецька область) було проведено відлов безпритульних собак гуманним способом, без застосування препаратів для седації або міорелаксації. Потім тваринам здійснено оваріогістеректомію, чипування і вакцинацію проти сказу. Для антирабічного щеплення використано вакцину Рабістар (ТОВ «Укрветпромстач»), серія 081216. Після цього тварини були відпущені в місця їхнього мешкання.

Для оцінки антирабічного імунітету в серпні 2018 року були відловлені кліпсовані собаки (шість тварин), в яких були скановані мікрочипи (для ідентифікації тварин), відібрано проби крові і отримано сироватки. Потім тварини були знову вакциновані антирабічною вакциною Рабістар й відпущені в місця їхнього мешкання.

Сироватки крові з відповідними супровідними документами були надіслані до НД вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ (м. Київ). Дослідження сироваток крові були проведені методом FAVN-тест (табл. 8.8).

Дослідженнями встановлено, що в сироватках крові усіх тварин містилися антирабічні антитіла в титрах більше мінімального захисного рівня – 0,5 МО/см³, в межах 1,12-5,87 МО/см³.

Таблиця 8.8

Результати дослідження сироваток крові безпритульних собак на наявність антитіл до вірусу сказу

№ п/п	Дата вакцинації	Кількість днів після вакцинації	Титр антитіл, МО/см ³
1	19.08.2017	362	1,12
2	21.08.2017	360	3,38
3	05.12.2017	255	2,56
4	05.12.2017	255	5,87
5	05.12.2017	255	4,46
6	05.12.2017	255	3,38

Отже, встановлено, що гуманне регулювання чисельності собак є ефективним не тільки для контролю їхньої популяції, а також дає змогу забезпечити захист цих тварин від зараження вірусом сказу, що підтверджено лабораторними дослідженнями сироваток крові на наявність антирабічних антитіл.

8.4. Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання

Правильний відбір, пересилання й зберігання дослідних проб є необхідною умовою для забезпечення отримання достовірних результатів лабораторних досліджень. Нетривале зберігання антитіл відбувається, як правило, за температури ≤ 4 °C у стерильних пробірках від одного до декількох тижнів. За більш високих температур відбуваються хімічні реакції, такі як окислення та протеолітична деградація білку, що може бути наслідком мікробного обсіменіння. Крім того, очищені антитіла за температури 4 °C можуть осаджуватись.

Постійні цикли заморожування-розморожування можуть призвести до денатурації білка, як наслідок — зниження специфічної активності антитіл.

Тому для збереження антитіл важливо користуватися спеціалізованим лабораторним обладнанням.

Враховуючи вище наведене для нас представляло науковий інтерес проведення досліджень з визначення активності антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання.

Зберігання сироваток крові за $t + 4 \pm 0,5$ °C залежить від первинного отримання та часу транспортування зразків до лабораторій. Перед дослідженням зразки сироваток крові були інактивовані за температури $+56 \pm 0,5$ °C протягом 30 хв. Показники титрів антирабічних антитіл у дослідних сироватках крові представлені в табл. 8.9.

Таблиця 8.9

Показники титрів антирабічних антитіл в сироватках крові тварин, що зберігалися за $t + 4 \pm 0,5$ °C

№ п/п	Пул (р) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см ³	Зберігання за $t + 4 \pm 0,5$ °C; період досліджень, діб; МО/см ³				
			7	14	21	28	56
1	Dp1	1,95	1,95	2,56	2,56	1,95	-
2	Dp2	5,87	5,87	5,87	-	-	-
3	Dp3	5,87	10,21	5,87	5,87	-	-
4	Ср1	4,46	4,46	3,38	3,38	-	-
5	Ср2	17,74	17,74	17,74	-	-	-
6	Ср3	40,64	17,74	3,38	-	-	-

Примітка: «-» – непридатна – згорання білка, контамінація мікроорганізмами.

З табл. 8.9, видно, що на 7-у та 14-у добу відмічали незначне зниження титру антитіл від вихідного значення. За результатами досліджень вихідний титр у дослідних сироватках становив від 1,95 до 17,74 МО/см³ і зберігався відносно сталим упродовж дослідження. У дослідній сироватки Ср3 спостерігали значне зниження титру антитіл, так на 7-у добу на $0,36 \log_{50}$ розведення сироватки, що становило – 17,74 МО/см³ та на 14-у – $1,08 \log_{50}$ –

відповідно 3,38 МО/см³ (заражаюча доза вірусу сказу CVS-11 була в межах 127–253 TCID₅₀). Зберігання сироваток крові за звичайних умов холодильника становило в одному дослідному зразку не більше 28 діб, у трьох – не більше 21 доби, а максимальний термін становив 14 діб. В подальшому сироватки крові для досліджень були не придатними – у більшості випадків контаміновані.

У заморожених зразках сироваток крові спостерігали стабільність титру антитіл до вірусу сказу упродовж усього дослідного періоду. У деяких зразках встановлені відхилення в межах похибки реакції (табл. 8.10).

Таблиця 8.10

Стабільність титру антирабічних антитіл, що зберігалися за $t - 18 \pm 0,2$ °C

№ п/п	Пул (р) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см ³	Зберігання за $t - 18 \pm 0,2$ °C; період досліджень, діб; МО/см ³					
			7	14	21	28	56	84
1	Dp1	1,95	1,95	2,56	2,56	1,95	2,56	2,56
2	Dp2	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87
3	Dp3	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87	5,87
4	Sp1	3,38	4,46	4,46	3,38	4,46	3,38	3,38
5	Sp2	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74
6	Sp3	40,64	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74	17,74

Наступним етапом досліджень було визначення впливу п'ятикратного заморожування-відтаювання на антирабічну активність сироваток крові (табл. 8.11).

Таблиця 8.11

Вплив температурних перепадів на титр антирабічних антитіл

№ п/п	Моно (m) сироватки крові	Вихідний титр, МО/см ³	Зберігання за t –18±0,2 °С; період досліджень через кожні 7–14 діб; МО/см ³				
			кратність заморожування-розморожування				
			1	2	3	4	5
1	Dm1	0,50	0,50	0,38	0,17	0,17	0,13
2	Dm2	0,66	0,66	0,50	0,29	0,17	0,22
3	Dm3	0,87	0,50	0,50	0,38	0,29	0,13
4	Cm1	2,56	2,56	1,95	0,87	0,50	0,50

В результаті замерзання та відтаювання сироваток крові спостерігали значне зниження титру антитіл вже після 2-го й 3-го циклів заморожування-розморожування. Так, вже на 3-й цикл заморожування-розморожування показники активності антирабічних антитіл в сироватках крові були у два-три рази менші ніж у вихідних значень (рис. 8.2).

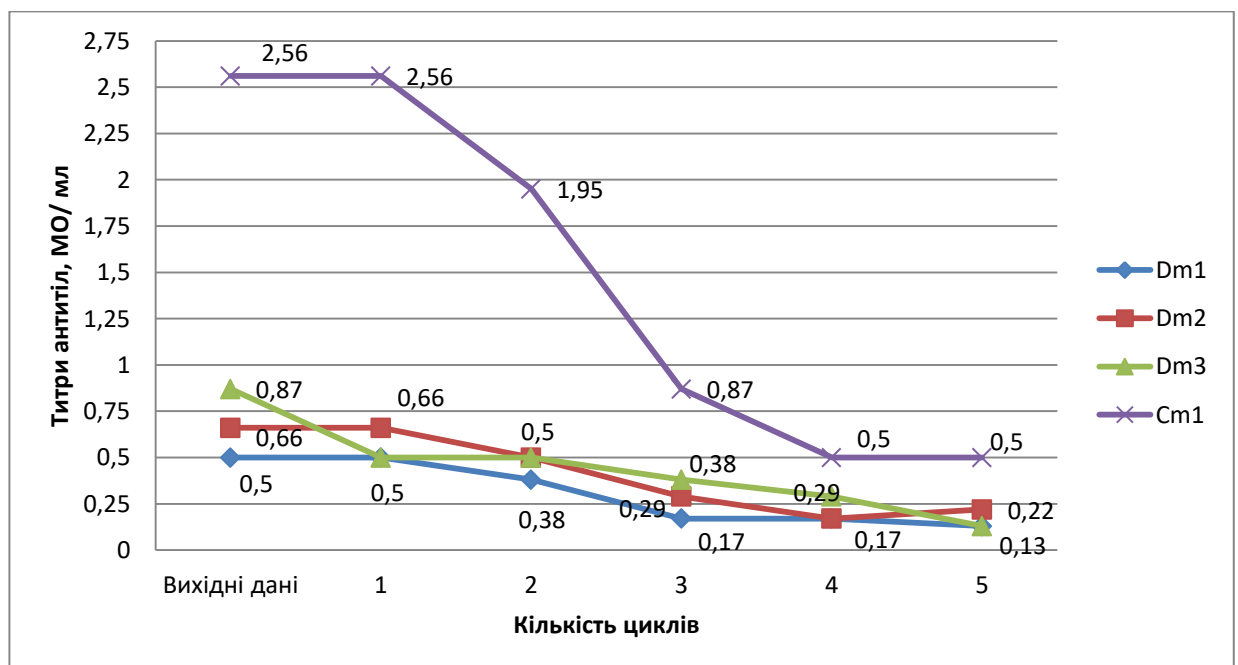


Рис. 8.2 Динаміка титрів антирабічних антитіл залежно від кратності заморожування-розморожування.

Отримані результати досліджень, свідчать, що повторні цикли температурних перепадів критично впливають на титр антирабічних антитіл. Так, в дослідній сироватки Cm1, з вихідним рівнем антитіл до вірусу сказу становила 2,56 МО/см³, після 5-и циклів заморожування-розморожування рівень антитіл знизився до мінімального захисного 0,50 МО/см³ (рис. 8.2). Інші дослідні сироватки Dm1, Dm2, Dm3, в яких показники були від 0,50– 0,66 – 0,87 МО/см³ відповідно, вже на 2-у – 3-у циклі, мали рівень антитіл нижчим за мінімального захисного – 0,38 – 0,29 – 0,17 МО/см³.

Отримані результати свідчать, що температура та тривалість зберігання сироваток крові є важливим фактором в отриманні достовірних результатів, що необхідно враховувати спеціалістам ветеринарної медицини при надсиланні зразків на дослідження та фахівцям при плануванні досліджень.

Результати розділу 8 висвітлені в наукових працях [15, 17, 31, 37, 55, 56, 57, 58, 67, 356].

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 8

За результатами досліджень встановлено, що оптимальним кріопротекторним середовищем для ліофільного висушування антирабічного імуноглобуліну є середовище із вмістом сахарози, гліцину та желатину, взятих в рівних кількостях.

Калібрування отриманого нами зразку антирабічного імуноглобуліну відносно Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (30 МО/см³) показало активність препарату в РН на білих мишах на рівні 11,03±0,43 МО/см³, а в FAVN-тесті – 11,28±0,83 МО/см³.

Аналіз отриманих результатів з визначення рівня антирабічного імунітету за дослідження сироваток крові собак перед щепленням та на 14-у та 29-у добу досліду достовірної різниці між значеннями титрів антитіл, з використанням в якості контролю стандартного імуноглобуліну та отриманого нами Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну, не виявляли.

За результатами проведених досліджень розроблено технологічний регламент виготовлення Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну (Затверджений Вченою радою ІВМ, протокол № 13 від 24.10.2016). Новизна розробки підтверджена патентом України на корисну модель «Спосіб одержання галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну» (№118385 від 10.08.2017).

Розроблений Галузевий стандартний зразок антирабічного імуноглобуліну за своїми характеристиками відповідає необхідним показникам якості, які ставляться перед стандартними зразками антирабічної активності, є стабільним за рахунок зберігання в ліофілізованій формі та придатним для визначення антирабічної активності сироваток крові та імуноглобулінів методами *in vivo* та *in vitro*, що підтверджено дослідженням 24 проб сироваток крові собак у FAVN-тесті.

Безумовно, забезпечення отримання достовірних результатів вимагає суворого дотримання параметрів постановки реакції. Особливо це стосується реакції нейтралізації, в якій використовуються живі біологічні об'єкти – в нашому випадку це референс-штам вірусу сказу CVS-11 та культура клітин ВНК-21 С13 (ATCC CCL-10). Протягом 2019-2022 рр. проведено постановку 537 реакцій (145 в 2019 р., 134 в 2020 р., 124 в 2021 р. і 134 в 2022 р.) методом FAVN-тест, в яких досліджено та обраховано \log_{50} позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до прописного теоретичного значення – $0,5 \text{ МО/см}^3$), \log_{50} негативної сироватки та значення \log_{50} інфекційного титру референс-штаму вірусу сказу CVS-11.

Аналіз отриманих результатів вказує на необхідність забезпечення контролю за показниками титрів вірусу сказу та стандартної сироватки в кожній реакції, так як стабільність (особливо при зміні серії вірусу сказу, або оновлені лінії культури клітин) цих показників свідчить про якість проведених досліджень і про достовірність отриманих результатів значень дослідних сироваток на наявність антитіл до вірусу сказу.

Періодичний аналіз та дослідження динаміки синтезу титрів антитіл до вірусу сказу після антирабічної вакцинації в тварин-компаньйонів (собаки і коти) є соціально необхідним завданням, адже показник віруснейтралізуючої активності сироваток крові $\geq 0,5$ МО/см³ є свідченням захищеності тварин від інфікування вірусом сказу.

В наших дослідженнях встановлено, що в собак на 14 добу з моменту імунізації спостерігали 100 %-й захист тварин від зараженням сказу, оскільки титр антитіл був вище мінімально захисного рівня. В сироватках крові котів на 7 добу після вакцинації середній титр антирабічних антитіл знаходився вище мінімально захисного рівня ($1,27 \pm 0,15$ МО/см³). А динаміка росту антитіл до вірус сказу в сироватках крові собак і котів спостерігалася протягом 27 діб після антирабічної вакцинації.

Аналіз напруженості специфічного імунітету до вірусу сказу серед собак і котів (3927-и проб сироваток крові) показав в 57-и пробах недостатній рівень (менше $0,50$ МО/см³) антитіл до вірусу сказу, що становить 1,45 %, де 31-а проба була від тварин, що були вакциновані моновалентними антирабічними вакцинами, а 26 – полівалентними вакцинами. Частка проб з недостатнім захисним антирабічним імунітетом у тварин, які були щеплені моновалентними вакцинами, становила 0,97 % (31 з 3181), а частка сироваток крові із недостатнім титром антитіл до вірусу сказу, що отримані від тварин, яким вводили полівалентні вакцини, становила 3,49 % (26 з 746).

Отримані результати свідчать про захищеність популяцій тварин-компаньйонів від зараження вірусом сказу, хоча й демонструють значну неоднорідність популяційного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

В іншому досліді були проведені дослідження антирабічної активності сироваток крові безпритульних собак. Дослідженнями встановлено, що в сироватках крові усіх тварин (6 голів) містилися антирабічні антитіла в титрах більше мінімального захисного рівня – $0,5$ МО/см³, в межах $1,12$ - $5,87$ МО/см³. Встановлено, що гуманне регулювання чисельності собак є ефективним не

тільки для контролю їхньої популяції, а також дає змогу забезпечити захист цих тварин від зараження вірусом сказу, що підтверджено лабораторними дослідженнями сироваток крові на наявність антирабічних антитіл.

Результати досліджень антирабічної активності сироваток крові протягом тривалого зберігання показали, що для сироваток крові заморожування за температури $t - 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ є оптимальною умовою для зберігання. Заморожування зразків показало стабільність та незначні відхилення у збереженні рівня антирабічних антитіл. Після розморожування дослідного зразку сироватки крові, в подальшому її слід зберігати за температури $+ 4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Однак, зберігання сироваток крові за $t + 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ придатне лише для короткочасного зберігання (не більше 14 діб).

РОЗДІЛ 9. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сказ відомий людству з давніх давен. Абсолютна летальність у разі початку клінічних симптомів, а також широке поширення цієї інфекції в усьому світі, спонукало багатьох науковців до здійснення різнопланових досліджень поширення сказу, розробки методів і засобів боротьби, профілактики і лабораторної діагностики [84, 425].

В Україні сказ широко поширений в усіх природно-географічних зонах та реєструється серед багатьох видів диких і свійських тварин, а також серед людей [33, 1]. Соціально-економічне значення цієї інфекції стало передумовою для здійснення наукових пошуків щодо вивчення особливостей епізоотичної ситуації [2, 3, 8, 47, 46], оцінки молекулярно-генетичних властивостей ізолятів вірусу сказу та вакцинних штамів вірусу сказу [11, 19, 49], розробки засобів лабораторної діагностики та системи їхньої стандартизації та контролю [44, 45, 65], специфічної профілактики [41, 66, 12, 40] та комплексної оцінки специфічного імунітету до вірусу сказу [49, 16].

Поширення сказу в усьому світі та наявність різних резервуарів збудника стало умовою для числених досліджень з епізоотології та епідеміології, а також пошуків удосконалення антирабічних заходів, розробки сучасних антирабічних засобів та впровадження програм контролю та ерадикації [285, 79, 395, 83].

Основою для проведення розробок з удосконалення системи лабораторної діагностики сказу та проведення філогенетичних досліджень стала оцінка напруженості епізоотичної ситуації зі сказу, визначення видової характеристики, стаціонарно-неблагополучних територій та незвичних угруповань (кластерів) випадків сказу в Україні [9, 21, 54, 34, 251].

Використання інструментів ГІС для аналізу прояву сказу в багатьох країнах світу дало можливість провести локалізацію найбільш неблагополучних територій і краще проводити планування антирабічних заходів [184, 301, 221, 250, 194, 112].

Використання ГІС також дало можливість провести оцінку кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Авторами вивчено прояв сказу в Європі зважаючи на те, що за останні чотири десятиліття було використано більше 10 пероральних вакцин проти сказу [308, 433].

В наших дослідженнях також з використанням інструментів ГІС проведені дослідження прояву сказу з точки зору ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу [336, 335, 10, 48].

При здійсненні Emerging Hotspot Analysis випадків сказу на території Чернігівської області за 2011-2016 рр. виявлено 18 просторово часових кластерів із трендом «спорадичний». Виявлення цих 18 кластерів має особливе практичне значення. Адже територія цих кластерів і є математично достовірно доведеними стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу в Чернігівській області. Крім встановлення географічних стаціонарно-неблагополучних зі сказу зон на території Чернігівської області, Emerging Hotspot Analysis виявив 3 кластери із трендом «новий». Виявлення цих кластерів може бути пов'язане із припиненням в попередні роки кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу на території суміжних Полтавської і Сумської областей у зв'язку з складною економічною ситуацією в Україні. Тому, це є ще одним підтвердженням теорії щодо наявності опосередкованого пресингу на епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області пероральної імунізації диких м'ясоїдних, яка проводилася на території Полтавської і Сумської областей протягом 2006-2015 рр. [336].

Дослідження ендемічних спалахів сказу на території трьох західних областей України (Волинська, Львівська та Закарпатська області) з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній. Включення собак і котів до ендемічних вогнищ показало недостатність існуючої системи профілактики сказу серед свійських тварин. Це вказує на необхідність виявлення недоліків для забезпечення максимального охоплення вакцинацією проти сказу собак і котів. Виявлення трьох кластерів

захворювань, включаючи випадки як серед диких, так і свійських тварин (хоча це не підтверджено молекулярно-генетичними дослідженнями), а також наявність кластерів у лисиць і свійських м'ясоїдних тварин поблизу один від одного припускають можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Крім того, наші результати підтверджують, що статистично значущі скупчення випадків сказу серед лисиць передували за часом скупченням випадків сказу серед інших видів тварин [335].

Загалом, аналізуючи прояв сказу в Україні протягом 2018-2022 рр. встановлено, що значну відмінність між кількістю гарячих і холодних кластерів сказу в Україні впродовж аналізованого періоду, що вказує на достовірне поступове зменшення прояву епізоотії сказу в Україні внаслідок проведення в Україні кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу.

Проблема сказу завжди була актуальною для нашої країни. В довоєнний та післявоєнний періоди минулого століття (Друга світова війна) мало місце поширення «міського» сказу. З кінця 1960-х років в Україні розпочинається епізоотія «лисячого» сказу, при цьому розвиток епізоотії відбувався аналогічно як в країнах Західної та Центральної Європи [84, 35].

На території України відмічаються вогнища сказу двох типів: природні, в яких вірус підтримується, головним чином, в популяції лисиці звичайної й передається вовкам, єнотовидним собакам, куницям, борсукам, та антропоургічні, в яких вірус циркулює в популяціях свійських тварин [12, 9, 21, 251].

Нині лисиця звичайна вважається головним джерелом збудника сказу в Європі, в тому числі й в Україні. Екологічні особливості лисиць, тривале носійство вірусу в інкубаційному періоді (у лисиць він може коливатись від 12 до 181 дня), раньовий механізм передачі інфекції, а також висока сприйнятливість лисиць до захворювання забезпечують можливість існування та функціонування осередків лисячого сказу [21, 33, 83, 84, 110].

Підвищення рівня захворюваності свійських тварин, особливо серед котів і собак, які проживають в безпосередній близькості до людей, на нашу думку, є

наслідком неповного обсягу охоплення цих тварин профілактичними антирабічними щепленнями та прямим свідченням неналежного виконання діючої «Інструкції щодо заходів боротьби та профілактики сказу», оскільки, близько 80 % випадків сказу серед свійських м'ясоїдних реєструються у тварин, які мали господаря, однак не були забезпечені профілактичною антирабічною вакцинацією [34, 54, 21].

Також залишається недостатнім контроль за виконанням «Правил утримання собак і котів у населених пунктах». Постійні бригади з відлову безпритульних тварин в більшості регіонів поодинокі, а тимчасові створюються і діють не в плановому порядку. Рекомендовані Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» притулки для тварин створюються в окремих випадках, стерилізація безпритульних тварин проводиться в недостатньому обсязі [251, 7].

Визначені проблеми в протиепізоотичних заходах, що проводяться в Україні визначені нами при здійсненні якісної оцінки ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних, свійських і сільськогосподарських тварин. Виходячи з результатів оцінки ризиків, зроблено рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками, що використано іншими вченими при здійсненні аналізу ефективності заходів боротьби зі сказом тварин в Україні [6].

Також проведена оцінка ризиків зафіксувала дуже високу ймовірність поширення сказу серед популяції диких м'ясоїдних тварин саме від невакцинованих диких м'ясоїдних тварин. Було виявлено дуже високу ймовірність не ефективності проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин, що сприяє високій ймовірності того, що за існуючої в Україні антирабічної пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин не буде достатня кількість вакцинованих тварин для формування популяційного імунітету.

В рекомендаціях за результатами оцінки ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних тварин визначено, що для забезпечення максимального результату пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу

потрібна як довгострокова стратегія, так і міжнародне співробітництво з сусідніми країнами та синхронізація цього заходу, а також системна вакцинація двічі на рік.

Цей пункт також вказаний при розробці методичних рекомендацій «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», в яких також досконально висвітлено усі компоненти з планування та реалізації кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, визначено принципи застосування пристрою для розповсюдження препаратів у твердій дозованій формі «Автовак» за повітряного розподілу прилад з вакциною [59].

Розроблені методичні рекомендації повністю враховують регіональні особливості поширення сказу в Україні та узгоджуються із відповідним європейським керівництвом проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу [198].

З усіх реакцій, які застосовуються для лабораторної діагностики сказу, РПФ має найбільше поширення. Метод визнано ВООЗ як «золотий стандарт» в діагностиці сказу, оскільки він є чутливим, специфічним та експресним [449, 448, 51, 293].

Оскільки достовірність діагнозу на сказ, поставленого за допомогою цього методу, напряду залежить від якості кон'югату, використаного в реакції, то пошук нових схем гіперімунації є, безумовно, однією з основних складових отримання високоактивної антирабічної сироватки крові, з якої виділяють фракцію імуноглобулінів для мічення ФІТЦ.

Для отримання високоактивних антирабічних сироваток крові ключовим моментом є розробка раціональної схеми гіперімунації тварин, що включає підбір антигену (його дози, способу, інтервалу та кратності введення), тварин-продуцентів, загальної тривалості циклу імунації, застосування ад'ювантів та стимуляторів імунної відповіді. Схема гіперімунації повинна забезпечувати отримання сироваток з високим титром специфічних антитіл за порівняно короткий проміжок часу при мінімальних витратах антигенного матеріалу.

Першим етапом наших досліджень було отримання антигену, який здатний забезпечити індукцію напруженого специфічного імунітету у тварин-продуцентів. Для досліджень ми застосовували вакцинний штам вірусу сказу Щолково-51 К, висока імуногенна здатність якого була продемонстрована раніше [50]. Обґрунтуванням його використання є те, що вакцинний штам Щолково-51 К розмножується у культурі клітин ВНК-21/13 з накопиченням вірусу в титрах до $7,5 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$, а також стабільно зберігає антигенні, імуногенні та генетичні властивості [49].

Дослідники відзначають, що використання в схемах антирабічної імунізації антигену на основі інактивованого фіксованого вірусу сказу, отриманого із мозкової тканини, провокує накопичення в сироватці крові антитіл-нейротоксинів. З метою уникнення подібних явищ рекомендовано, як антиген вірусу сказу, застосовувати фіксований вірус, вирощений у перещеплюваній культурі клітин (культура клітин нирок сірійського хом'яка, нирки собаки, нирки сайги, курячих фібробластів, клітини ниркового епітелію зеленої мартишки (Vero) тощо [4].

В результаті репродукції вірусу сказу, вакцинного штаму Щолково-51К, в культурі клітин ВНК-21/13, нами було отримано вірусомісну суспензію з титром інфекційної активності $6,8 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ [27]. Отримані нами результати підтверджують дослідження Романенка О.А., який визначив летальну активність штаму «Щолково-51» від $5,6$ до $7,1 \text{ lg ЛД}_{50}/\text{см}^3$ залежно від номеру пасажу [65].

Очищення вірусомісної суспензії є невід'ємною частиною технологічного етапу виготовлення культурального антигену, адже в результаті репродукції вірусу в культурі клітин вірусомісна суспензія містить не тільки вірус, але й баластні білки (компоненти культуральної рідини, фрагменти клітин, на яких культивується вірус і т. д.), кількість яких впливає на якість антигенного препарату. При введенні в організм вірусних білків в суміші з клітинними білками, вироблення антитіл на вірусний білок різко знижується, в той час як підвищується індукція антитіл до сторонніх білків, а не до вірусу, проти якого

повинен бути спрямований захист. Основною вимогою, що ставиться до методу очищення, є ефективне видалення баластних білків при мінімальних втратах вірусного антигену [25].

В результаті застосування низькошвидкісного центрифугування для очищення отриманої нами культуральної вірусомісної суспензії від баластних білків, рівень загального білку зменшився на 57,3 % без втрати інфекційної активності – титр вірусу сказу залишився на рівні $6,9 \pm 0,2 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$.

З літературних джерел відомо, що ПЕГ з молекулярною масою 6000 набув широкого застосування – за очищення та концентрування вірусів ПЕГ очистка досягає 88-97% [342, 440], тому для підвищення вмісту специфічного антигену в культуральній рідині ми вивчали вплив різної концентрації ПЕГ-6000 за експозиції 24, 48 та 72 год.

В результаті, з'ясували, що оптимальним для концентрування культуральної вірусомісної суспензії вірусу сказу штаму Щолково-51 К є застосування 6 % ПЕГ-6000 за інкубації при $+4^\circ\text{C}$ впродовж 24 год в поєднанні з низькошвидкісним центрифугуванням протягом 20 хвилин при 3000 об/хв. Використання цього режиму дало змогу отримати вірусомісну суспензію з інфекційною активністю $7,49 \pm 0,2 \text{ lg МЛД}_{50}/\text{см}^3$ [27, 29].

Вибір методу усунення інфекційної здатності вірусу може в повному обсязі впливати на імунологічні властивості вакцинного препарату. Головними критеріями ефективності методу інактивації є повнота та незворотність цього процесу, а також збереження інактивованим вірусом антигенних властивостей [345, 171, 164].

Інактивацію вірусу сказу в культуральній концентрованій суспензії здійснювали β -пропіолактоном в концентрації 1:4000 за температури 4°C впродовж 24 год, аналогічно методиці ВООЗ [359, 360].

Також, нами доведена принципова можливість застосування, в якості інактивуєчого агента вірусу сказу, розчину перекису водню (H_2O_2) за 3% в кінцевій концентрації та експозиції 2 год при температурі 4°C . У своїх дослідженнях Abd-Elghaffar A.A. et al. (2016) стверджують, що перекис водню

може замінити Я-пропіолактон як інактиватор для вірусу сказу, що дозволить зменшити час і вартість процесу інактивації. Дослідження було спрямоване на вивчення здатності перекису водню до незворотної інактивації вірусу сказу, не впливаючи на його антигенність та імуногенність [69].

Висока імунна відповідь організму на пряму залежить від дози антигену, який буде введений, оскільки занадто велика доза може викликати імунне виснаження організму, а замала – недостатнє імунне подразнення. Результати вивчення залежності антитілоутворення від кратності введення антигену показали, що кількість імунізацій підбирають емпіричним шляхом залежно від виду тварин-продуцентів, антигену, а також ад'ювантів та імуностимулюючих препаратів, які застосовуються для гіперімунізації [28].

Внутрішньошкірне введення антигенного препарату значно зменшує об'єм використаного імуногену і скорочує термін гіперімунізації [470]. Встановлено, що за внутрішньошкірного введення кролям антирабічної вакцини на 7-у і 14-у добу титр антитіл був вищим, ніж при внутрішньом'язовому, в той же час на 45-у добу титр був вищим в разі внутрішньом'язового введення [300, 187].

Підвищення біологічної активності антигену та імуного статусу тварин-продуцентів гіперімуних сироваток крові є важливим етапом отримання гіперімуних сироваток та антирабічного імуноглобуліну (як з діагностичною, так і з лікувальною метою у гуманній медицині), тому поряд із ад'ювантами актуальним є також використання різноманітних імуномодулюючих препаратів в якості молекулярних ад'ювантів вакцинних препаратів. Для вивчення імуностимулюючого впливу препаратів за антирабічної імунізації нами досліджено такі препарати, як «Фоспреніл», «Ронколейкін» і «РБС» [26].

Отримані нами результати досліджень корелюють з дослідженнями інших вчених. Ряд дослідників успішно використовували у своїх дослідженнях імуностимулюючі препарати [113, 439].

Було з'ясовано, що ІЛ-2, на моделі білих безпородних мишей, підвищує імуногенну активність інактивованої антирабічної вакцини щонайменше у 25 разів [319]. Однак, за результатами наших досліджень імуностимулюючий

препарат «Ронколейкін» не вплинув на ефективність антирабічної вакцинації білих мишей – показник ED₅₀, за яким проводили порівняння, був нижчим ніж у тварин контрольної групи [26].

Важливим етапом в процесі отримання гіперімунної сироватки крові є підбір тварин-продуцентів. Для отримання антирабічного імуноглобуліну, з метою постекспозиційної профілактики сказу в людей, є доступними: антирабічний імуноглобулін з сироватки крові людини, гетерологічний антирабічний імуноглобулін з сироватки крові коней і високоочищені F(ab')₂-фрагменти, отримані з імуноглобуліну коней, але для отримання діагностичного антирабічного імуноглобуліну, за інформацією ВООЗ, доцільно застосовувати лабораторних тварин (хом'яки, мурчаки, кролі та ін.) [359]. Слід також зазначити, що не кожні гіперімунні сироватки, отримані від різних тварин придатні як складовий елемент РПФ.

Для підбору тварин-продуцентів антирабічної гіперімунної сироватки нами були відібрані кролі (породи шиншила) і мурчаки. Проведені дослідження проб сироваток крові після двократної комбінованої імунізації (0 та 21 доба) показали, що висока специфічна імунна відповідь на комплекс «культуральний антиген вірусу сказу – імуностимулюючий препарат» була у кролів. Середній титр антитіл до вірусу сказу $21,43 \pm 1,96$ МО/см³. Дослідження проб сироваток крові мурчаків показало, що титр специфічних до вірусу сказу антитіл коливався в межах від 7,2 до 13,5 МО/см³. В цілому по групі середній титр рабічних антитіл становив $10,88 \pm 0,82$ МО/см³ [28].

Аналогічно нашим результатам, деякі автори також відмічають кролів, як оптимальний вид тварин-продуцентів для отримання гіперімунних антирабічних сироваток з діагностичною метою [19, 45, 20].

Наступним етапом роботи була розробка схеми антирабічної гіперімунації із врахуванням використання кролів, як тварин-продуцентів та всіх раніше підібраних факторів для імунізації. В основу розробленої нами схеми гіперімунації поставлено завдання розробити ефективний спосіб одержання гіперімунної антирабічної сироватки крові із зменшеною кількістю

введення меншого об'єму антигену за відносно короткий період часу. Запропонована схема полягала в чотирикратному введенні тваринам антигену внутрішньошкірно та внутрішньом'язово на 0-ову, 21-у, 35-у та 49-у добу дослідження, комбіновано з імуностимулюючим препаратом «Фоспреніл» на 0-у, 21-у і 49-у добу, з відбором крові на 63-ю добу. Така схема дозволила отримати гіперімунну сироватку з титром антитіл $185 \pm 9,2$ МО/см³ в РН і $212 \pm 10,4$ МО/см³ в ТФ-ІФА [27, 39, 29].

Для порівняння, Новіцька О.В. (2004) застосовувала у своїй роботі схему гіперімунізації кролів породи шиншила, яка включала п'ятиразове введення вакцини КоКАВ на 1-у, 3-ю, 7-у, 14-у і 30-у добу у дозі 1 см³ з додаванням 25 % ад'юванту (мінеральне масло Montanide ISA 25) на 1-у і 14-у добу, внутрішньом'язово у ділянку стегна. Рівень віруснейтралізуючих антитіл на 45 добу від початку імунізації антигеном з ад'ювантом складав $10,39 \pm 0,7 \log_2$ ЕД₅₀ [45]. Однак, враховуючи різні системи виміру отриманих значень, співставити результати досліджень неможливо.

Далі наша робота була спрямована на виготовлення дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну для діагностики сказу в РПФ.

Згідно методики постановки РПФ, який описано в Керівництві діагностичних тестів ВООЗТ [286], фіксація мазків-відбитків мозкової тканини здійснюється ацетоном протягом мінімум 30 хв за температури мінус 20°C.

В результаті порівняльних досліджень з'ясували, що за фіксації мазків-відбитків мозкової тканини ацетоном та шляхом двократного проведення предметних скелець над полум'ям спиртівки отримані результати є співставними [294]. Подібне дослідження було проведено Davis C. et al. (1997) з метою усунення ацетону з процесу постановки РПФ. Автори відмічають повну кореляцію між результатами біопроби та реакцією імунофлуоресценції з фіксованими ацетоном або нефіксованими висушеними на повітрі мазками-відбитками, яка була виявлена у 245 із 246 зразків мозку, використовуваних у дослідженні [138].

В результаті підбору оптимального співвідношення кількості специфічних білків до ФІТЦ та визначення параметрів реакції кон'югації, нами було отримано три зразки флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну [32]. За результатами їх перевірки в РПФ нами визначено, що оптимальна концентрація ФІТЦ для реакції кон'югації з антирабічним імуноглобуліном складає 1,5 мг/100 мг білку, оскільки за кон'югації специфічного білку з вищою концентрацією флуорохрому, в результаті, отримали аналогічний за якістю препарат. Однак, стандартна реакція кон'югації флуорохрому із специфічними білками, описана деякими авторами та у Керівництві діагностичних тестів ВООЗТ (МЄБ) [415, 286, 148], передбачає застосування ФІТЦ і білку у співвідношенні 1 мг/100 мг. Отриманий нами діагностикум мав «фарбуючий» титр 1:32. В результаті повторної перевірки діагностикума після ліофільного висушування, визначено «фарбуючий» титр 1:16, робоче розведення – 1:8. [30].

Отриманий нами діагностичний препарат дає стабільно позитивний результат із зразками головного мозку, які знаходяться в колекції патологічних матеріалів лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН, серед яких було досліджено зразків від котів – 17, від собак – 16, 5 від куниць, 3 від борсуків, 14 від лисиць, 6 від єнотовидних собак, 2 від вовків та по одному від лося та рисі [30].

Окремим напрямом розробки імунодіагностичних препаратів є використання у якості продуцентів імуноглобулінів – птиці та отримання, внаслідок гіперімунізації та очищення, специфічних Ig Y з яєць [156, 254, 469, 468].

В наших дослідженнях також вдалося отримати дослідний діагностичний препарат для виявлення антигену вірусу сказу в мазках-відбитках методом РПФ. Проведені нами дослідження встановили принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу [43].

Удосконалення системи лабораторної діагностики скаазу безумовно передбачає перехід діагностичних методів з систем *in vivo* до використання систем *in vitro* [91, 286, 324, 359, 360, 463].

Науковцями були проведені порівняльні дослідження чутливості клітин ВНК-21 (С-13) і мишиної нейробластоми (С-1300, клон NA) до виділення вірусу сказу. Було встановлено, що клітини нейробластоми миші більш чутливі до ізолятів вірусу сказу, ніж клітини ВНК-21. Виділення вірусу сказу в клітинах мишиної нейробластоми, біопроба на білих мишах і РПФ показали аналогічну чутливість [352].

В наших дослідження також було показано перевагу клітин нейробластоми миші (N2a). В культурі клітин ВНК-21 С13 виділено вісім з 11-и матеріалів (72,7 %). N2a (ATCC CCL-131) показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на білих мишах [58, 42, 52].

Світовий досвід вказує на необхідність впровадження методів виявлення геному вірусу сказу, вивчення молекулярної епізоотології та біологічних властивостей збудника сказу з метою підвищення ефективності його профілактики [448, 84, 367, 312, 110, 207].

Вірус сказу, завдяки гетерогенності свого РНК геному володіє здатністю адаптовуватися до різних гостальних та територіальних умов. Такі мутації вірусу на генетичному рівні можуть обумовлювати різницю у фенотиповому прояві захворювання, що може обумовлювати зміни у перебігу захворювання, що в свою чергу може призводити до збільшення напруженості ситуації в певному регіоні [425, 351].

Дослідження молекулярно-генетичних характеристик різних ізолятів вірусу сказу, і зокрема їх нуклеотидних послідовностей, дозволяє визначити філогенетичні зв'язки в межах філогрупи та генотипів, встановити їхню еволюційну історію, а також важливим аспектом є прогнозування можливих змін і набуття нових властивостей циркулюючими в певному ареалі ізолятів [354, 425, 110, 295, 332, 116, 324, 177].

Незважаючи на те, що повні нуклеотидні послідовності всіх п'яти генів визначені для більшості фіксованих штамів вірусу сказу, щодо вуличних ізолятів вірусу ці дослідження проведені в неповному обсязі [248].

З розвитком полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стала можлива ампліфікація генів вірусу. Технологія в комбінації з секвенуванням є потужним засобом фундаментального вивчення ліссавірусів, яка дозволила досягти істотного прогресу в розумінні структури, функціональних взаємодій віріона вірусу сказу, а також аналізу еволюційних варіацій вірусу [110].

Враховуючи результати вивчення та аналізу видової характеристики епізоотії сказу на території України, нами було здійснено підбір вуличних ізолятів вірусу з колекції лабораторії нейроінфекцій ІВМ НААН для виконання молекулярно-генетичних досліджень [9, 21, 54, 34, 251, 48]. Підбір виконували таким чином, щоб охопити максимальну кількість природньо-географічних зон та областей нашої країни, з урахування всіх сприйнятливих тварин та природніх резервуарів вірусу сказу. Таким чином, було відібрано 100 вуличних ізолятів вірусу сказу, які були виділені на території України від 12 видів свійських і диких тварин, а також двох людей з 19 областей України в період з 2009 по 2013 рік [22].

Після порівняльних досліджень відібраних зразків різними методами (РПФ, БП, виділення вірусу в культурі клітин, ПЛР), подальші дослідження проводили із 82 зразками, які були придатними для виділення генетичного матеріалу в ЗТ-ПЛР [22].

За дослідження молекулярно-генетичних характеристик, важливим є факт, що середня частота точкових мутацій для РНК-вмісних вірусів становить одну невірну вставку на $10^4 - 10^5$ полімеризованих нуклеотидів, що в мільйон разів більше, ніж у випадку ДНК-вмісних вірусів [237].

Висока частота мутацій у РНК-вмісних вірусів спостерігається внаслідок великої кількості помилок при роботі РНК-залежних РНК-полімераз. Середній розмір геному РНК-вмісного вірусу приблизно 10 – 12 тисяч основ. Якщо рівень помилок при мутаціях досягає однієї помилки на кожний геном вірусу, не можна говорити про РНК-вмісний вірус з єдиним геномом [110].

Таким чином, вуличні ізоляти, представленні не індивідуальним геномом, а сукупністю тісно споріднених геномів, які не є ідентичними, що потребує

проведення молекулярно-генетичних досліджень, та має стати невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики сказу з обов'язковим виділенням РНК вірусу та подальшим філогенетичним аналізом.

Провівши детальний аналіз еволюційної дивергенції досліджуваних зразків між собою та з вакцинними штамми, було встановлено, що польові ізоляти за своїми характеристиками генетично однорідні, належать до 1-шої філогрупи, 1-го генотипу ліссавірусів тварин. Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8% за амінокислотним складом, що є типовим для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи [22].

Варто також відзначити, що наші дослідження підтверджують результати отримані Ж. М. Дрожже, яка відзначила, що досліджувані нею 78 ізолятів вірусу сказу, виділених від 8-и видів тварин з 14-и областей України є генетично однорідними [16]. Також результати досліджень Picard-Meyer E. et al (2012) свідчать про наявність двох варіантів збудника сказу (RV) в Україні. У межах цих двох вказаних груп (С і NEE), віруси були згруповані, головним чином, згідно з їх географічним походженням, проте корекції з видовою приналежністю тварин-господарів виявлено не було. Крім того, в межах двох генетичних варіантів виявлено 9 груп зразків із 100 % спорідненістю за геном нуклеопротеїну [332].

В наших дослідженнях географічна належність випадків, що були виявлені в нових ендемічних спалахах на території країн ЄС показала чітку приуроченість. Так, варіант SE виявлено в республіці Польща, а варіант NEE в Польщі, Словаччині, Угорщині та Румунії в прикордонних з Україною територіях. Філогенетичний аналіз показав, що ізоляти вірусу сказу з України відносяться до кластеру С [348].

Іванов М. Ю. [19] визначив наявність генетичних варіантів вірусу сказу в Україні, які були диференційовані за гомологією до вірусу сказу референс-штаму CVS на два кластери: CVS-подібні (кластер I) та відмінні від CVS (кластер II) за допомогою методу ЗТ-ПЛР з використанням варіант-специфічних праймерів (509, 304), які ампліфікують 3'-кінцеву ділянку гена

нуклеопротейну вірусу сказу. Однак, варто зазначити, що дослідження були проведені без секвенування та філогенетичного аналізу, що значно обмежує можливості для інтерпретації та додаткового порівняльного аналізу представлених результатів.

Філогенетичні дослідження відібраних нами секвенованих ізолятів вірусу сказу, згідно розміщення на дендрограмі, вказують на виражений розподіл їх на 4 кластери за певними географічними зонами та областями. Отриманні результати вказують на існування вираженого географічного розподілу генетичних варіантів вуличних ізолятів вірусу сказу. На правобережній Україні переважають ізоляти вірусу сказу, які відносяться до 1-го та 2-го кластеру, а на лівобережній – 3-го та 4-го кластерів [22].

Отже, незважаючи на високий ступінь генетичної однорідності вірусу сказу, який циркулює на території України, існують відмінності між ізолятами за географічним розподілом.

Також, дослідження на території України унікальні тим, що нами було вивчено ізолят від кажана, який за своїми генетичними характеристиками близький до 3-го та 4-го кластерів, однак мав певні відмінності. В результаті побудови філогенетичного дерева, на якому були представлені всі класифіковані генотипи вірусу сказу виділені від кажанів на території різних країн, визначено приналежність зразку до першої філогрупи п'ятого генотипу ліссавірусів тварин (EBLV-1) [29, 338].

Звичайно, щодо ізоляту від кажана з території Харківської області будь-які висновки за результатами секвенування одного зразку робити завчасно, але той факт, що зразок за своїми характеристиками, незначно, але відрізняється від решти зразків з території України та належить до європейських ліссавірусів кажанів 1-го типу повинен викликати занепокоєння в науковців та практичних лікарів ветеринарної медицини.

Приймаючи до уваги широку антигену й генетичну різноманітність ліссавірусів і виділення нових ізолятів, постає питання про ефективність

існуючих антирабічних вакцин, адже штами вірусу в комерційних вакцинах відносяться лише до першого генотипу.

Разом з тим, для нас становило науковий інтерес дослідження ізолятів вірусу сказу від людей та визначення їх філогенетичних зв'язків з ізолятами від тварин. З метою визначення філогенетичної спорідненості, дослідні зразки від двох людей були порівняні із обраними з GenBank еталонними генетичними послідовностями ізолятів вірусу сказу: від людей для порівняння їх між собою; від лисиць, оскільки вони є основним резервуаром вірус сказу в Україні; від свійських м'ясоїдних тварин (собаки та коти), адже собаки та коти є основним джерелом вірусу сказу для людей; зразки від кажанів та матеріал з України (виділений в Харківській області в 2010 р.), тому що в цих тварин підтверджено циркуляцію різних генотипів вірусу на території Європи, а також належність до різних генотипів і філогруп; вакцинні штами вірусу сказу, які використовуються при виробництві антирабічних вакцин.

За результатами філогенетичних досліджень, зразки HUMANUKRKIEV 01.10.11 та HUMANUKRLVIV 07.10.09 були віднесені до першої філогрупи. За своїми генетичними характеристиками зразки близькі до польового ізоляту, який виділено від лисиці на території Франції в 1991 році (генетичні послідовності внесені до GenBank) і є типовим представником 1-го генотипу ліссавірусів тварин [334].

Крім генетичних послідовностей ізолятів вірусу сказу з України при побудові філогенетичного дерева використано послідовності чотирьох вакцинних штамів, які представляються дві групи штамів – PV (Pasteur virus) і SAD (Street-Alabama-Dufferin). Вакцини, що виготовлені на основі дериватів цих штамів (Віосан R), застосовуються в Україні для профілактичної вакцинації та постекспозиційного антирабічного лікування (КоКАВ) [49].

Також, враховуючи результати наших досліджень, нами запропоновані зміни до стандартної схеми лабораторної діагностики сказу: з метою типування вірусу сказу нами пропонується застосування постановки ЗТ-ПЛР з парою олігонуклеотидних праймерів, які призначені для генотипування всіх відомих

генотипів ліссавірусів тварин, які внесені до міжнародної класифікації, з подальшою детекцією матеріалів в агаровому гелі. Надалі зразки піддавати секвенуванню з тими ж праймерами, які використовувалися при постановці ЗТ-ПЛР. Наступним етапом дослідження є внесення результатів секвенування в форматі FASTA до програм біостатистичної обробки результатів (наприклад MEGA) відповідно до запропонованого алгоритму [24].

Такі доповнення в лабораторній діагностиці сказу, на нашу думку, дозволять контролювати появу нових генетичних варіантів вірусу сказу, що буде вагомим кроком для ерадикації сказу на території України. До того, ВООЗ зі сказу у своїх рекомендаціях підкреслює необхідність проведення постійного вивчення, ідентифікації й типування ізолятів вірусу на основі вірусологічних і молекулярно-генетичних методів, тому проведення таких досліджень повинно бути невід'ємною частиною сучасної лабораторної діагностики сказу з обов'язковим виділенням РНК вірусу та подальшим філогенетичним аналізом [449, 448].

Дослідження напруженості гуморального антирабічного імунітету в тварин є безумовним чинником, який доповнює лабораторну діагностику сказу. Сучасні ефективні й достовірні серологічні тести, а також принципи їх застосування визначені в усіх міжнародних діагностичних керівництвах, як то ВООЗ або ВООЗТ [286, 359, 360]. Здійснення оцінки антирабічного імунітету має важливе значення. Адже ці дослідження є основним елементом оцінки ефективності вакцинації проти сказу [132, 385, 425, 84, 347, 44, 16].

В наших дослідженнях аналіз напруженості специфічного імунітету до вірусу сказу серед собак і котів (3927-и проб сироваток крові) показав в 57-и пробах недостатній рівень (менше $0,50 \text{ МО/см}^3$) антитіл до вірусу сказу, що становить 1,45 %, де 31-а проба була від тварин, що були вакциновані моновалентними антирабічними вакцинами, а 26 – полівалентними вакцинами. Частка проб з недостатнім захисним антирабічним імунітетом у тварин, які були щеплені моновалентними вакцинами, становила 0,97 % (31 з 3181), а частка сироваток крові із недостатнім титром антитіл до вірусу сказу, що

отримані від тварин, яким вводили полівалентні вакцини, становила 3,49 % (26 з 746) [15].

Результати досліджень антирабічної активності сироваток крові протягом тривалого зберігання показали, що для сироваток крові заморожування за температури $t = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ є оптимальною умовою для зберігання. Заморожування зразків показало стабільність та незначні відхилення у збереженні рівня антирабічних антитіл [67, 356].

Враховуючи наявність різних тестів для оцінки наявності антитіл до вірусу сказу, це створює можливості для їхніх порівняльних досліджень і валідації, що проводиться вченими в багатьох країнах [16, 419, 85, 430, 175, 130, 296].

Були проведені дослідження, в яких тест-систему ELISA BioPro оцінювали та порівнювали з FAVN-тест і перевіреною іншим набором ELISA з використанням сироваток крові лисиць і єнотовидних собак, зібраних після кампаній пероральної вакцинації у Франції та Естонії. Відповідність між BioPro ELISA та прямим варіантом ELISA досягла 96,5 % для сироваток крові від лисиць. Тому автори роблять висновок, що набір BioPro ELISA є цінним тестом для оцінки ефективності пероральної вакцинації лисиць і єнотовидних собак проти сказу [428].

В наших дослідженнях оцінкою антирабічної активності сироваток крові наборами BioPro Rabies Elisa Ab та Platelia Rabies II BioRad встановлено, що визначені виробниками порогові значення сероконверсії тотожні. Дослідження 80 проб сироваток крові показало 100 % відповідності у ранжуванні сироваток крові на позитивні (є сероконверсія) та негативні. Виявленні відмінності в групах сироваток крові можна пояснити низькою якістю сироваток крові, що можуть вплинути на результат досліджень [357].

Важливим аспектом визначення титрів антитіл до вірусу сказу є необхідність калібрування позитивних контрольних сироваток, які використовуються для рутинних досліджень [400, 425]. Тому, необхідною була розробка Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну, в якості контрольного, для визначення напруженості антирабічного імунітету.

Найбільш поширеними методами таких досліджень є реакція нейтралізації (РН) на білих мишах, FAVN-тест (fluorescent antibody virus neutralisation) або ж RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test) в культурі клітин [201, 129, 218, 253, 256]. В усіх цих реакціях передбачено використання стандартної сироватки крові з визначеною віруснейтралізуючою активністю до вірусу сказу [286]. В якості такої використовують стандартну позитивну антирабічну сироватку крові собак, рекомендовану ВООЗТ, яку виробляє Європейська референс-лабораторія зі сказу AFSSA (Франція) [429]. Цей стандартний препарат призначений для оцінки напруженості антирабічного імунітету методами *in vitro* у свійських тварин. Партії цього продукту відкалібровані до Другого міжнародного стандарту імуноглобуліну людини [127, 431].

Отже, на сьогодні головним стандартом антирабічної сироватки, який придатний для досліджень титрів антирабічних антитіл методами *in vivo* та *in vitro*, є Другий міжнародний стандарт антирабічного імуноглобуліну людини. Після численних досліджень йому присвоєно антирабічну активність в 30 МО/см³ [277, 174, 450].

Не дивлячись на те, що значна частина імунодіагностичних препаратів на одному із заключних етапів виробництва піддається ліофільному висушуванню, універсального кріо- та ксеропротекторного середовища для всіх біопрепаратів не існує. Тому, підбір параметрів ліофілізації та оптимального складу захисного середовища здійснюється індивідуально в кожному конкретному випадку [451, 118, 415, 271].

Henderson L.O. et al. (1988) з'ясували, що ліофільне висушування без введення стабілізуючих компонентів призводить, в результаті, до значної або повної втрати специфічної активності препарату, а ліофілізований матеріал не виглядає як сформована «таблетка» і розсипаний по дні флакону, внаслідок незначного вмісту сумарного сухого залишку [210].

Відомий спосіб ліофілізації біопрепарату з додаванням захисного середовища із суміші гліцину і маннітолу [341, 86]. Обидві речовини легко кристалізуються при заморожуванні їх водних розчинів, тому не доцільно

вводити в розчин біопрепарату дві і більше формоутворюючих речовини, оскільки вони уповільнюють кристалізацію одна одної.

Відомо застосування в якості стабілізатора, середовища, що вміщує бичачий сироватковий альбумін, етилендіамінтетраацетат (ЕДТА), пептони, сахарозу, аскорбінову кислоту, хлористий калій і бактеріостатик [162]. Однак, ці стабілізатори призначені для ліофілізації ін'єкційних препаратів, що містять Ig M-антитіла, а також референс-сироваток, що містять Ig M-антитіла до вірусних антигенів.

Для ліофільного висушування концентрованого сульфатом амонію антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові кролів ми досліджували захисні властивості наступних підібраних середовищ: 1) Глюкоза + гліцин + желатин; 2) Сахароза + гліцин + желатин; 3) Сахароза + гліцин + крохмаль картопляний; 4) Глюкоза + гліцин + крохмаль картопляний; 5) Сахароза + гліцерин + желатин; 6) Гліцин + гліцерин + желатин.

За результатами досліджень встановлено, що оптимальним кріопротекторним середовищем для ліофільного висушування антирабічного імуноглобуліну є середовище із вмістом сахарози, гліцину та желатину, взятих в рівних кількостях. Застосування цього середовища дало змогу отримати зразок з активністю $9,9 \text{ МО/см}^3$, тобто рівень зниження активності до вірусу сказу після ліофілізації та в результаті застосування тесту «швидкого старіння» був на рівні 2,0%, що є найнижчим відсотковим значенням серед застосованих середовищ [31].

Калібрування отриманого нами зразку антирабічного імуноглобуліну відносно Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (30 МО/см^3) показало активність препарату в РН на білих мишах на рівні $11,03 \text{ МО/см}^3$, а в FAVN-тест – $11,27 \text{ МО/см}^3$ [55, 56].

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, із застосуванням комплексу досліджень, охарактеризовані особливості прояву сказу серед тварин, здійснена оцінка протиепізоотичних антирабічних заходів і ризиків поширення сказу, сформовані рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками, запропонована удосконалена система лабораторної діагностики сказу тварин із використанням удосконалених методів детекції антигену вірусу сказу, виділення вірусу з патологічного матеріалу в культурі клітин, виявлення геному із подальшим філогенетичним аналізом послідовностей, створений галузевий стандарт антирабічного імуноглобуліну та проведена оцінка напруженості поствакцинального антирабічного імунітету.

1. Описово-статистична характеристика прояву сказу на початку ХХІ століття показала, що сказ в Україні, з узагальненням випадків серед людей, диких і свійських тварин, є ендемічним захворюванням, що широко поширене в усіх природно-географічних зонах й адміністративних одиницях нашої держави. Встановлено, що резервуаром збудника сказу на території України – є лисиця звичайна, на частку якої припадає більше 36 % лабораторно виявлених випадків. Серед свійських тварин найбільше реєструється захворювання в собак (19,3 %) і котів (25,3 %), що становлять найбільшу загрозу для людей, так як володіють найвищим епідемічним потенціалом.

2. Просторово-часовими дослідженнями прояву епізоотії сказу в Україні встановлено:

- в центральних і південно-західних районах Чернігівської області в 2011-2016 рр. 18 просторово часових кластерів із трендом «спорадичний». Території цих кластерів є стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу. Виявлено три кластери із тенденцією «новий», які були виявлені на південному сході області, завдяки чому сформоване припущення про опосередкований пресингу на епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області кампаніями з

пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин, що були проведені в суміжних областях в 2006-2015 рр.;

- на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр. три кластери захворювання тварин на сказ, які включали випадки як серед диких, так і свійських тварин, що свідчить про можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Отримані результати підтверджують, що статистично значущі скупчення випадків сказу серед лисиць передували з часом скупченням випадків сказу серед усіх інших видів тварин. Дослідження ендемічних спалахів сказу на території трьох західних областей України (Волинська, Львівська та Закарпатська області) з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній. Включення собак і котів до ендемічних вогнищ показало недостатність існуючої системи профілактики сказу серед свійських тварин;

- відмінність між кількістю гарячих і холодних кластерів випадків сказу в Україні протягом 2018-2022 рр. Ні рівні часового проміжку листопада-грудня 2020 року кількість кластерів була на одному рівні (476 гарячих проти 472 холодних). В подальшому, до кінця 2022 року відмічали зменшення кількості гарячих кластерів та збільшення кількості холодних, що вказує на достовірне поступове зменшення прояву епізоотії сказу в Україні (станом на грудень 2022 р.) внаслідок проведення в Україні кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу.

3. Проведено якісну оцінку ризиків поширення сказу серед диких м'ясоїдних, свійських і сільськогосподарських тварин. Була встановлена дуже висока ймовірність поширення сказу серед популяції диких м'ясоїдних тварин саме від невакцинованих диких м'ясоїдних тварин; було виявлено дуже високу ймовірність неефективності проведення парентеральної вакцинації свійських тварин; визначено високу ймовірність непроведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин. Виходячи з результатів оцінки ризиків, підготовлено звіти та зроблено рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками.

4. Здійснено аналіз ефективності кампаній пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу та розроблено методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», в яких враховано положення відповідного керівництва ЄС, а також сучасні аспекти здійснення повітряного розподілу принад з вакциною і методику фіксування точної локалізації приладами з GPS.

5. Розроблено схему гіперімунізації тварин для отримання гіперімунової антирабічної сироватки, яка полягала у чотирикратному (0 та 21-у, 35-у та 49-у добу) комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в п'ять точок по 0,1 см³ і внутрішньом'язово в одну точку 0,5 см³ культурального антигену вірусу сказу із ін'єкціями препарату «Фоспреніл» за добу до першої імунізації та на 21-у та 49-у добу. Використання такої схеми дало змогу отримати сироватку крові з високими титрами антитіл до вірусу сказу – 185±9,2 МО/см³ в РН і 212±10,4 МО/см³ в ТФ-ІФА.

6. Здійснено розробку дослідного зразку флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну для РППФ. Для чого сконцентровано антирабічну гіперімунону сироватку крові кролів до активності 327,0±48 МО/см³ в РН та 391,6±64 МО/см³ в ТФ-ІФА. Визначено оптимальну концентрацію ФІТЦ (1,5 мг/100 мг) та рН (близько 9,0) для кон'югації з імуноглобуліном. Отриманий дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну мав робоче розведення 1:8, був специфічним (DSp = 100 %) та чутливим до вірусу сказу (DSe = 96,6 %).

7. Проведено гіперімунізацію перепілок антигеном вірусу сказу, отримано два зразки очищеного і концентрованого Ig Y, які при дослідженні в РН на білих мишах володіли специфічною активністю на рівні 26,25 МО/см³ та 81,25 МО/см³. Дослідження концентрованих дослідних зразків антирабічних Ig Y в FAVN-тест продемонструвало тотожні результати: титр зразку № 1 був в межах 23,39-30,83 МО/см³, а зразку № 2 – 70,63-93,10 МО/см³. Після мічення ФІТЦ й очистки, дослідні зразки антирабічного Ig Y досліджували в РППФ, де показали специфічність Ig Y отриманого на антиген вірусу сказу штаму CVS-11, однак із активністю робочого розведення лише 1:2. Проведені дослідження встановили

принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу.

8. Розроблено стандартизовані методичні підходи до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу на основі застосування референс-штаму вірусу сказу CVS-11 (ATCC VR-959) для виготовлення позитивних контрольних зразків. Розроблено принципи характеристики контрольних зразків для забезпечення належної якості та проведено в 2021 році раунд МПВ «Виявлення антигену збудника сказу» відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014 «Оцінка відповідності. Загальні вимоги до перевірки кваліфікації лабораторій (EN ISO/IEC 17043:2010, IDT)».

9. За результатами порівняльних досліджень встановлена абсолютна чутливість культури клітин N2a (ATCC CCL-131) до ізолятів вірусу сказу, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено вірус сказу в 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби. Запропоновано метод виділення вірусу сказу в культурі клітин нейробластоми миші N2a, який забезпечує швидке (протягом 72-76 годин) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби.

10. Здійснено апробацію міжнародних протоколів виявлення геному вірусу сказу методом ПЛР в режимі реального часу, ПЛР в агарозному гелі та гніздового варіанту ПЛР. Порівняльними дослідженнями 100 патологічних матеріалів від тварин методом біологічної проби на білих мишах підтверджено наявність антигену вірусу у 80-и зразках. Після перевірки досліджуваних зразків в ПЛР з'ясовано наявність РНК вірусу сказу в 82 зразках.

11. Аналізом еволюційної дивергенції зразків вірусу сказу встановлено:

- польові ізоляти вірусу сказу з України за своїми характеристиками генетично однорідні, належать до 1-ої філогрупи 1-го генотипу ліссавірусів тварин (RABV). Ступінь генетичної спорідненості становить 99,8 % за амінокислотним складом, що є типовим для представників ліссавірусів тварин, які циркулюють на території північно-східної Європи;

- виділено польовий ізолят від кажана на території Харківської області, який за своїми генетичними характеристиками належить до 5-го генотипу, першої філогрупи ліссавірусів тварин (EBLV-1);

- за своїми генетичними характеристиками зразки вірусу сказу, що були виділені від людей, близькі до ізоляту, який виділено від лисиці на території Франції в 1991 році і є типовим представником 1-го генотипу ліссавірусів тварин (RABV);

- географічну належність випадків, що були виявлені в нових ендемічних спалахах на території країн ЄС. Так, варіант SE виявлено в республіці Польща, а варіант NEE в Польщі, Словаччині, Угорщині та Румунії в прикордонних з Україною територіях. Філогенетичний аналіз показав, що ізоляти вірусу сказу з України (три з Вінницької, один з Кіровоградської та два з Рівненської областей) відносяться до кластеру С. Отже, це може бути підтвердженням ефективності буферної зони з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, що проводиться на території західних областей України з 2012 року, так як свідчить про генетичну відмінність між ізолятами з країн ЄС та України.

12. Удосконалено схему лабораторної діагностики сказу з додатковим використанням ЗТ-ПЛР та подальшим секвенуванням зразків, що дозволить на сучасному рівні здійснювати моніторинг сказу і контролювати появу нових генетичних варіантів вірусу на території України.

13. Розроблено зразок Галузевого стандарту антирабічного глобуліну, який придатний для визначення напруженості антирабічного імунітету методами *in vivo* та *in vitro*. Проведено калібрування зразку антирабічного імуноглобуліну та визначено активність в РН на білих мишах на рівні 11,03 МО/см³, у FAVN-тест – 11,27 МО/см³.

14. Аналіз напруженості специфічного імунітету до вірусу сказу серед собак і котів показав в 1,45 % недостатній рівень (менше 0,50 МО/см³) антитіл до вірусу сказу. Частка проб з недостатнім захисним антирабічним імунітетом у тварин, які були щеплені моновалентними вакцинами, становила 0,97 % (31 з 3181), а частка сироваток крові із недостатнім титром антитіл до вірусу сказу,

що отримані від тварин, яким вводили полівалентні вакцини, становила 3,49 % (26 з 746). Отримані результати свідчать про захищеність популяцій тварин-компаньйонів від зараження вірусом сказу, хоча й демонструють значну неоднорідність популяційного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

Для оцінки епізоотичної ситуації зі сказу в Україні використовувати інформацію про випадки сказу, що зберігає інформацію ГІС.

Для планування протиепізоотичних антирабічних заходів використовувати «Звіт про проведену оцінку ризику поширення сказу серед диких тварин в Україні» та «Звіт про проведену оцінку ризику поширення сказу серед свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні».

Для проведення кампаній пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу використовувати методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу», які розглянуті та схвалені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (Протокол № 1 від 24 квітня 2018 року).

З метою удосконалення лабораторної діагностики сказу використовувати Схему лабораторної діагностики сказу, яка передбачає постановку заключного діагнозу методами РПФ та ЗТ-ПЛР із подальшим секвенуванням та філогенетичним аналізом, що дозволить контролювати появу нових генетичних варіантів вірусу на території України.

Для проведення молекулярно-генетичних досліджень вірусу сказу використовувати методичні рекомендації «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР» (затверджено Вченою радою ІВМ НААН протокол №10 від 11.11.2016 р.).

Для здійснення філогенетичного та біостатистичного аналізу вуличних ізолятів вірусу сказу застосовувати методичні рекомендації «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин» (затверджено Вченою радою ІВМ НААН протокол №10 від 11.11.2016 року).

Для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу в культурі клітин використовувати методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (затверджені Вченою радою ІВМ НААН протокол № 9 від 02.11.2023).

Для біологічної промисловості запропоновано «Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові» (№ 110313 від 10.10.2016); технологічний регламент виготовлення «Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну» (Затверджений Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 13 від 24.10.2016), який може бути використаний в серологічних дослідженнях; технологічний регламент виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу» (затверджений Вченою радою ІВМ НААН, протокол № 10 від 11.10.2016), який може бути використаний в лабораторній діагностики сказу.

Для серологічних досліджень напруженості антирабічного імунітету використовувати методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин» (затверджені Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 7 від 24.12.2015).

Для використання у навчальному процесі рекомендується монографія «Імунопрофілактика сказу в Україні» до лекційного курсу з дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби» (рекомендовано Вченою радою НУБіП України, протокол № 12 від 21.06.2017) та монографія «Лабораторна діагностика сказу» (рекомендовано Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 2 від 23.06.2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антонова, Л.А., Маковская, И.Ф. & Крупинина, Т.И. (2021). История борьбы с бешенством в Украине со времен Пастера до наших дней. *Актуальная инфектология*, 9(1). doi: 10.22141/2312-413X.9.1.2021.228821
2. Атамась, В.Я., Пероцька, Л.В., Масленікова, С.І. (2008). Особливості епізоотології сказу тварин в південних областях України. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 42, 8–12.
3. Ачілов, В.Г., Недосеков, В.В. (2013). Характеристика епізоотичного процесу сказу в Хмельницькій області. *Ветеринарна медицина України*, 6, 14-17.
4. Бабкін, М.В., Стегній, Б.Т., Ничик, С.А. (2006). *Спосіб отримання антирабічної гіперімунної сироватки* (Патент України № 19403). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/2-19403-sposib-otrimannya-giperimunno-antirabichno-sirovatki.html>
5. *Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу: ДСТУ 7053:2009.* (2009). Київ: Держспоживстандарт України.
6. Гібалюк, Ю.О., Недосеков, В.В. (2021). Аналіз ефективності заходів боротьби зі сказом тварин в Україні. *Ветеринарна медицина: міжвідомчий тематичний науковий збірник*, 107, 19–25. doi: 10.36016/VM-2021-107-3
7. Гібалюк, Ю.О., Полупан, І.М., Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи заходів профілактики сказу в Україні. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 28–30). 19 липня, 2018, Київ, Україна.
8. Голік, М. О. (2019). *Епізоотологія та пероральна вакцинопрофілактика сказу в Чернігівській області* (автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. вет. наук). НУБІП України. Київ, Україна.

9. Голік, М.О., Недосєков, В.В., Карловська, К.П., Полупан, І.М. (2015). Характеристика епізоотичної ситуації зі сказу в Україні. *Тваринництво України*. 9. 16–19.
10. Голік, М.О., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2018). Прогнозування епізоотії сказу в Чернігівській області на основі геоінформаційного аналізу. *Наукові доповіді НУБіП України*, 6. (76), <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2018.06.025>
11. Головка, М.А. (2013). *Епізоотологічний моніторинг та молекулярно-генетична діагностика сказу тварин* (автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. вет. наук). ННЦ ІЕКВМ. Харків, Україна.
12. Гришок, Л.П., Недосєков, В.В., Падалка, О.В., Полупан, І.М. (2006). *Особливості епізоотології та проблема контролю сказу в Україні*. Збірник наукових статей Науково-практичної конференції, присвяченій 75-річчю Новогалещенської біофабрики. Полтава.
13. Гришок, Л.П., Недосєков, В.В., Полупан, І.М., Дрожже, Ж.М., Цвіліховський, О.М. (2009). Проблеми специфічної профілактики сказу домашніх тварин в Україні. *Ветеринарна медицина України*, 7, 11–13.
14. Дзюба, Я.М., Дрожже, Ж.М., Рудой, О.В., Полупан, І.М., Гібалюк, Ю.О. (2019). Дослідження сироваток крові від диких лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу після пероральної вакцинації в 2018 р. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 19–20). 27 червня, 2019, Київ, Україна.
15. Дзюба, Я.М., Рудой, О.В., Полупан, І.М. (2018). Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих домашніх м'ясоїдних тварин. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина»*, 104. 382–385.
16. Дрожже, Ж.М. (2016). *Система оцінки поствакцинального антирабічного імунітету в м'ясоїдних тварин* (автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук). ДНКІБШМ. Київ, Україна.

17. Дрожже, Ж.М., Недосєков В.В., Полупан, І.М. (2016). *Методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин»*. Київ: ЦП КОМПРИНТ.
18. *Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей*. (Офіційний переклад). (1986). Вилучено з: http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137
19. Іванов, М.Ю. (2011). *Епізоотологічна та молекулярно-біологічна характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу в Україні* (автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук). НУБІП України, Київ, Україна.
20. Корнієнко, Л.Є. (1998). Загальні принципи отримання противірусних імунних сироваток. *Вісник Білоцерківського ДАУ*, 4(1), 52-56.
21. Мазур, М.В., Мазур, Н.В., Полупан, І.М. (2017). Видова характеристика епізоотії сказу в Україні за 2011 – 2016 рр. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького*, 19. 73. 159–162.
22. Мазур, М.В., Полупан, І.М. (2017). Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 30. 145–152.
23. Мазур, М.В., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). *Методичні рекомендації «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР»*. Київ: ЦП КОМПРИНТ.
24. Мазур, М.В., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). *Методичні рекомендації «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин»*. Київ: ЦП КОМПРИНТ.
25. Мазур, Н.В. (2016). Отримання антирабічного антигену для гіперімунізації тварин. *XV всеукраїнська науково-практична конференція молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини»* (с. 161). 8–9 грудня, 2016, Львів, Україна.

- 26.Мазур, Н.В., Мазур, М.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2015). Застосування імуностимулюючих препаратів за антирабічної вакцинації. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія», 27.* 190–197.
- 27.Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Полупан, І.М. (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія», 28.* 158–165.
- 28.Мазур, Н.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2016). Вибір тварин-продуцентів гіперімунної антирабічної сироватки. *Чотирнадцятий міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини (с. 22–23).* 6–7 жовтня, 2016, Київ, Україна.
- 29.Мазур, Н.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (с. 44–46).* 16 червня 2016, Київ, Україна.
- 30.Мазур, Н.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2017). Визначення специфічності та активності дослідних зразків флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в реакції прямої імунофлуоресценції. *XVI Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (с. 103–104).* 19–20 квітня, 2017, Київ, Україна.
- 31.Мазур, Н.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2017). Підбір кріопротекторного середовища для ліофілізації галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну з сироватки крові кролів. *Науково-технічний бюлетень науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК, 5(1).* 48–52.
- 32.Мазур, Н.В., Полупан, І.М., Недосєков, В.В. (2017). Підбір оптимальних умов кон'югації антирабічного імуноглобуліну з ФІТЦ. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми*

- ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 50–51).
22 червня, 2017, Київ, Україна.
- 33.Маковська, І.Ф. (2021). Особливості епізоотичного процесу сказу в Україні в період з 1950 по 2020 роки (автореф. дис. на здобуття наук. ст. д.філософ). НУБІП України. Київ, Україна.
- 34.Маковська, І.Ф., В.В. Недосєков, І.М. Полупан, Т.С. Латманізова (2018). Аналіз тренду поширення сказу котів в Україні. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки*, 20(92), 18–23.
<https://doi.org/10.32718/nvlvet9204>
- 35.Недосєков, В.В., Гришок, Л.П., Полупан, І.М., Іванов, М.Ю. (2009). Оздоровлення території України від сказу – невідкладні завдання науки і практики. *Ветеринарна медицина України*, 2, 12-13.
- 36.Недосєков, В.В., Гришок, Л.П., Полупан, І.М., Іванов, М.Ю., Щербань, Ю.П. (2010). *Спосіб отримання мозкової суспензії вірусу сказу* (Патент України № 47938). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/3-47938-sposib-otrimannya-mozkovo-suspenzi-virusu-skazu.html>
- 37.Недосєков, В.В., Нікітова, А.П., Полупан, І.М., Ничик, С.А., Галка, І.В., Дрожже, Ж.М., Іванов, М.Ю. (2014). Особливості формування антирабічного імунітету у вакцинованих тварин. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 25. 71-75.
- 38.Недосєков, В.В., Новіцька, О.В., Вербенюк, О.В., Полупан, І.М. (2011). Визначення напруженості антирабічного імунітету у домашніх тварин м. Києва. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. Т. 13, 4(50), Ч. 1*, 320-324.
- 39.Недосєков, В.В., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Ничик, С.А. (2016). *Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові* (Патент України № 110313). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України.

- <https://uapatents.com/6-110313-sposib-oderzhannya-antirabichno-giperimunno-sirovatki-krovi.html>
40. Недосєков, В.В., Полупан, І.М., Гришок, Л.П., Іванов, М.Ю. (2007). Антирабічні вакцини в ветеринарній медицині. *Бюлетень ІВМ УААН «Ветеринарна біотехнологія», 11*, 141–150.
41. Ничик, С.А. (2006). *Розробка та застосування засобів специфічної профілактики сказу тварин* (автореф. дис. на здобуття наук. ст. д-ра вет. наук). ННЦ ІЕКВМ. Харків, Україна.
42. Ничик, С.А., Мінцюк, Є.П., Полупан, І.М. (2023). *Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу* (Патент України № 153299). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743463>
43. Ничик, С.А., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Хоменко, Я.В., Спиридонов, В.Г. (2016). Чутливість та специфічність антирабічних глобулінів, отриманих на основі Ig Y з перепелиних яєць. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія», 29*. 196–204.
44. Нікітова, А.П. (2015). *Формування антирабічного імунітету та вдосконалення методів контролю імуногенності інактивованих антирабічних вакцин* (автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. вет. наук). НУБІП України, Київ, Україна.
45. Новіцька, О.В. (2004). *Розробка тест-системи на основі імуноферментного аналізу для визначення антитіл проти вірусу сказу у сироватці крові тварин* (автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. вет. наук). Національний аграрний університет. Київ, Україна.
46. Падалка, О.В. (2003). Динаміка епізоотичного процесу та напруженість епізоотичної ситуації щодо сказу в різних регіонах України. *Аграрний вісник Причорномор'я. 21*, 46–53.
47. Пероцька, Л.В. (2008). *Особливості перебігу епізоотичного процесу сказу тварин у південному регіоні України* (автореф. дис. на здобуття наук. ст. канд. вет. наук). ОДАУ, Одеса.

- 48.Полупан, І., Дрожже, Ж., Гібалюк, Ю., Мазур, М., Нікітова, А., Ничик, С. (2018). Епізоотологічна характеристика захворюваності тварин на сказ в Україні та прогноз епізоотичної ситуації. *Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (р. 76). 16-20 квітня, 2018, Київ, Україна.
- 49.Полупан, І.М. (2011). *Імунобіологічні властивості вакцинних штамів вірусу сказу* (автореф. дис. канд. на здобуття наук. ступеня вет. Наук). НУБІП України, Київ, Україна.
- 50.Полупан, І.М. (2012). Удосконалення технології отримання вакцинних штамів вірусу сказу в культурі клітин нирки сайги. *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія», 21, 158-163.*
- 51.Полупан, І.М. (2021). Реакція прямої імунофлуоресценції в лабораторній діагностиці сказу тварин в Україні. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 107. 15–18.*
- 52.Полупан, І.М. (2023). *Методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу»*. Київ: Редакційно-видавничий відділ НУБІП.
- 53.Полупан, І.М., Дрожже, Ж.М., Гібалюк, Ю.О., Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи антирабічних заходів в Україні. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, 1-2 (47). 149–152.*
- 54.Полупан, І.М., Мазур, М.В., Голік, М.О., Недосєков, В.В. (2017). Антропургізація сказу в Україні. *Науковий вісник НУБІП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва, 265. 182–189.*
- 55.Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Недосєков, В.В. (2017). Калібрування галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові кролів. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 103. 311–313.*
- 56.Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Мазур, М.В., Нікітова, А.П. (2017). *Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку*

- антирабічного імуноглобуліну* (Патент України №118385). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-118385-sposib-otrimannya-galuzevogo-standartnogo-zrazka-antirabichnogo-imunoglobulinu.html>
- 57.Полупан, І.М., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Нікітова, А.П., Мазур, Н.В. (2017). Імунопрофілактика сказу в Україні. Херсон: Грінь Д.С.
- 58.Полупан, І.М., Недосєков, В.В., Рудой, О.В. (2021). Лабораторна діагностика сказу. Київ: ДНДІЛДВСЕ.
- 59.Полупан, І.М., Ничик, С.А., Недосєков, В.В., Кобаль, Б.І., Солодчук, В.Л., Шарай, Я.М., Хома, Ю.Б., Давиденко, О.Г., Гібалюк, Ю.О., Дрожже, Ж.М., Романенко, О.А. (2019). *Методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу»*. Київ: ПП «Тім-Сервіс К».
- 60.Полупан, І.М., Радзиховський, М.Л., Дишкант, О.В. (2023). Особливості діагностики сказу. *Патоморфологія сьогодення. Збірник тез Міжнародної наукової конференції, присвяченої 125-річчю з часу заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України* (с. 44-45). 28–29 вересня, 2023, Київ, Україна.
- 61.Полупан, І.М., Рудой, О.В., Ложкіна, О.В., Павлунько, В.Г., Купневська, М.В., Теплих, Н.І., Кравченко, А.Л., Гібалюк, Ю.О. (2021). Оцінка ефективності пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу (2018-2020 рр.). *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія»*, 39. 96–107. doi:10.31073/vet_biotech39-09
- 62.*Про ветеринарну медицину. (Закон України). № 2498-ХІІ (1992).*
Вилучено з <http://zakon3.rada.gov.ua/laws/show/2498-12>
- 63.*Про затвердження Вимог щодо ввезення (пересилання) на митну територію України живих тварин та їхнього репродуктивного матеріалу, харчових продуктів тваринного походження, кормів, сіна, соломи, а також побічних продуктів тваринного походження та*

- продуктів їх оброблення, переробки (Наказ Міністерства аграрної політики та продовольства України) № 553 (2018). Вилучено з <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0346-19#Text>
64. *Про заходи щодо боротьби зі сказом тварин* (Інструкція). N 5 (1994). Вилучено з <http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/z0054-94>.
65. Романенко, О.А. (2014). *Система стандартизації та контролю методів лабораторної діагностики і засобів специфічної профілактики сказу* (автореф. дис. на здоб. наук. ступеня канд. вет. наук). ДНКІБШМ. Київ, Україна.
66. Романенко, О.А., Дрожже, Ж.М., Солодчук, В.Л., Шарай, Я.М. (2009). Випробування вакцини антирабічної для імунізації диких м'ясоїдних «Броварабіс V-RG» у лабораторних умовах. *Наук.-техн. бюл. Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок*, 10(4), 188-194.
67. Рудой, О.В., Дзюба, Я.М., Полупан, І.М. (2019). Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина»*, 105. 84–87.
68. Рудой, О.В., Дрожже, Ж.М., Кардаш, О.В., Дедок, Л.А., Полупан, І.М. (2022). Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні. *Ветеринарна біотехнологія*, 40. 110–120. https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-10.
69. Abd-Elghaffar, A. A., Ali, A. E., Boseila, A. A., & Amin, M. A. (2016). Inactivation of rabies virus by hydrogen peroxide. *Vaccine*, 34(6), 798–802. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.041>
70. Acha-Orbea, H., & MacDonald, H. R. (1993). Subversion of host immune responses by viral superantigens. *Trends in microbiology*, 1(1), 32–34. [https://doi.org/10.1016/0966-842x\(93\)90022-j](https://doi.org/10.1016/0966-842x(93)90022-j)
71. Aguilar-Setien, A., Loza-Rubio, E., Salas-Rojas, M., Brisseau, N., Cliquet, F., Pastoret, P. P., Rojas-Dotor, S., Tesoro, E., & Kretschmer, R. (2005). Salivary

- excretion of rabies virus by healthy vampire bats. *Epidemiology and infection*, 133(3), 517–522. <https://doi.org/10.1017/s0950268805003705>
72. Aksel, I. S., & Aykan, T. B. (1957). Le comportement en culture du tissu cérébral infecté par le virus rabique; l'évolution des corpuscules de Negri in vitro dans le tissu cérébral rabique [Behavior of brain tissue cultures infected with rabies virus; in vitro evolution of Negri bodies in rabid brain tissues]. *Annales de l'Institut Pasteur*, 93(1), 30–35.
73. Anderson, A., Kotze, J., Shwiff, S. A., Hatch, B., Sloomaker, C., Conan, A., Knobel, D., & Nel, L. H. (2019). A bioeconomic model for the optimization of local canine rabies control. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(5), e0007377.
74. Anderson, W. (2019). The history in epidemiology. *International journal of epidemiology*, 48(3), 672–674. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy247>
75. Apostolico, A., & Giancarlo, R. (1998). Sequence alignment in molecular biology. *Journal of computational biology : a journal of computational molecular cell biology*, 5(2), 173–196. <https://doi.org/10.1089/cmb.1998.5.173>
76. Arakawa, T., Kita, Y., Ejima, D., & Gagnon, P. (2008). Solvent modulation of column chromatography. *Protein and peptide letters*, 15(6), 544–555. <https://doi.org/10.2174/092986608784966994>
77. Arnheim, N. (1990). The polymerase chain reaction. *Genetic engineering*, 12, 115–137. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0641-2_8
78. Asnin L. (2012). Adsorption models in chiral chromatography. *Journal of chromatography. A*, 1269, 3–25. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.096>
79. Aubert, M. (1994). Control of rabies in foxes: what are the appropriate measures?. *The Veterinary record*, 134(3), 55–59. <https://doi.org/10.1136/vr.134.3.55>
80. Aubert, M. F. (1992). Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 11(3), 735–760. <https://doi.org/10.20506/rst.11.3.622>

81. Avruskin, G. A., Jacquez, G. M., Meliker, J. R., Slotnick, M. J., Kaufmann, A. M., & Nriagu, J. O. (2004). Visualization and exploratory analysis of epidemiologic data using a novel space time information system. *International journal of health geographics*, 3(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-3-26>
82. Badrane, H., Bahloul, C., Perrin, P., & Tordo, N. (2001). Evidence of two Lyssavirus phylogroups with distinct pathogenicity and immunogenicity. *Journal of virology*, 75(7), 3268–3276. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.7.3268-3276.2001>
83. Baer, G. M. (1988). Oral rabies vaccination: an overview. *Reviews of infectious diseases*, 10 Suppl 4, S644–S648. https://doi.org/10.1093/clinids/10.supplement_4.s644
84. Baer, G.M. (1990). *The Natural History of Rabies*. (2nd Ed). New-York: CRC Press.
85. Bahloul, C., Taieb, D., Kaabi, B., Diouani, M. F., Ben Hadjahmed, S., Chtourou, Y., Imen B'Chir, B., & Dellagi, K. (2005). Comparative evaluation of specific ELISA and RFFIT antibody assays in the assessment of dog immunity against rabies. *Epidemiology and infection*, 133(4), 749–757. <https://doi.org/10.1017/s095026880500381x>
86. Bakaltcheva, I., O'Sullivan, A. M., Hmel, P., & Ogbu, H. (2007). Freeze-dried whole plasma: evaluating sucrose, trehalose, sorbitol, mannitol and glycine as stabilizers. *Thrombosis research*, 120(1), 105–116. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2006.07.005>
87. Balvočiūtė, M., & Huson, D. H. (2017). SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT - how do these taxonomies compare?. *BMC genomics*, 18(Suppl 2), 114. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3501-4>
88. Bannazadeh Baghi, H., Alinezhad, F., Kuzmin, I., & Rupprecht, C. E. (2018). A Perspective on Rabies in the Middle East-Beyond Neglect. *Veterinary sciences*, 5(3), 67. <https://doi.org/10.3390/vetsci503006>

89. Bárcenas-Reyes, I., Loza-Rubio, E., Cantó-Alarcón, G. J., Luna-Cozar, J., Enríquez-Vázquez, A., Barrón-Rodríguez, R. J., & Milián-Suazo, F. (2017). Whole genome sequence phylogenetic analysis of four Mexican rabies viruses isolated from cattle. *Research in veterinary science*, *113*, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.08.004>
90. Bárcenas-Reyes, I., Nieves-Martínez, D. P., Cuador-Gil, J. Q., Loza-Rubio, E., González-Ruíz, S., Cantó-Alarcón, G. J., & Milian-Suazo, F. (2019). Spatiotemporal analysis of rabies in cattle in central Mexico. *Geospatial health*, *14*(2), 10.4081/gh.2019.805. <https://doi.org/10.4081/gh.2019.805>
91. Barrat, J., Barrat, M. J., Picard, M., & Aubert, M. F. (1988). Diagnostic de la rage sur culture cellulaire. Comparaison des résultats de l'inoculation au neuroblastome murin et de l'inoculation a la souris [Diagnosis of rabies by cell culture]. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *11*(3-4), 207–214. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(88\)90039-2](https://doi.org/10.1016/0147-9571(88)90039-2)
92. Barrat, J., Picard-Meyer, E., & Cliquet, F. (2006). Rabies diagnosis. *Developments in biologicals*, *125*, 71–77.
93. Baxevanis, A.D. (2006). Searching the NCBI databases using Entrez. *Current protocols in human genetics*, Chapter 6, . <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0610s51>
94. Beauregard, M., & Casey, G. A. (1969). Demonstration of rabies antigen in salivary glands of rabies suspected animals. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*, *33*(1), 55–58.
95. Beauregard, M., Boulanger, P., & Webster, W. A. (1965). The Use Of Fluorescent Antibody Staining In The Diagnosis Of Rabies. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, *29*(6), 141–147.
96. Beck, S., Gunawardena, P., Horton, D. L., Hicks, D. J., Marston, D. A., Ortiz-Pelaez, A., Fooks, A. R., & Núñez, A. (2017). Pathobiological investigation of naturally infected canine rabies cases from Sri Lanka. *BMC veterinary research*, *13*(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1024-5>

97. Bednár M. (2000). DNA microarray technology and application. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 6(4), 796–800.
98. Benmansour, A., Leblois, H., Coulon, P., Tuffereau, C., Gaudin, Y., Flamand, A., & Lafay, F. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *Journal of virology*, 65(8), 4198–4203. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.8.4198-4203.1991>
99. Bergmann-Leitner, E. S., Mease, R. M., Duncan, E. H., Khan, F., Waitumbi, J., & Angov, E. (2008). Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yield of antigen-specific antibodies. *Malaria journal*, 7, 129. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-7-129>
100. Bertolotto, M., Di Martino, S., Ferrucci, F. & Kechadi, T. (2007) Towards a framework for mining and analysing spatio-temporal datasets. *International Journal of Geographical Information Science*, 21:8, 895–906, doi:10.1080/13658810701349052
101. Biggeri, A., Catelan, D., Conesa, D., & Vounatsou, P. (2016). Spatio-temporal statistics: applications in epidemiology, veterinary medicine and ecology. *Geospatial health*, 11(1), 469. <https://doi.org/10.4081/gh.2016.469>
102. Black, E. M., Lowings, J. P., Smith, J., Heaton, P. R., & McElhinney, L. M. (2002). A rapid RT-PCR method to differentiate six established genotypes of rabies and rabies-related viruses using TaqMan technology. *Journal of virological methods*, 105(1), 25–35. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00062-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00062-9)
103. Blancou, J. (1994). Early methods for the surveillance and control of rabies in animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 13(2), 361–372. <https://doi.org/10.20506/rst.13.2.766>
104. Blanton, J. D., Niezgodá, M., Hanlon, C. A., Swope, C. B., Suckow, J., Saidu, B., Nelson, K., Chipman, R. B., & Slate, D. (2018). Evaluation of oral rabies vaccination: protection against rabies in wild caught raccoons (*Procyon Lotor*). *Journal of wildlife diseases*, 54(3), 520–527. <https://doi.org/10.7589/2017-01-007>

105. Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1462), 1935–1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
106. Bones, V. C., Gameiro, A. H., Castilho, J. G., & Molento, C. F. (2015). Comparative costs of the Mouse Inoculation Test (MIT) and Virus Isolation in Cell Culture (VICC) for use in rabies diagnosis in Brazil. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 43(2), 81–87. <https://doi.org/10.1177/026119291504300203>
107. Bonwitt, J., Oltean, H., Lang, M., Kelly, R. M., & Goldoft, M. (2018). Bat rabies in Washington State: Temporal-spatial trends and risk factors for zoonotic transmission (2000-2017). *PloS one*, 13(10), e0205069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205069>
108. Bordignon, J., Piza, A. T., Alvarez-Silva, M., Caporale, G. M., Carrieri, M. L., Kotait, I., & Zanetti, C. R. (2001). Isolation and replication of rabies virus in C6 rat glioma cells (clone CCL-107). *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 29(2), 67–73. <https://doi.org/10.1006/biol.2001.0278>
109. Bos, D. H., & Posada, D. (2005). Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. *Developmental and comparative immunology*, 29(3), 211–227. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.07.007>
110. Bourhy, H., Kissi, B., Audry, L., Smreczak, M., Sadkowska-Todys, M., Kulonen, K., Tordo, N., Zmudzinski, J. F., & Holmes, E. C. (1999). Ecology and evolution of rabies virus in Europe. *The Journal of general virology*, 80 (Pt 10), 2545–2557. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2545>
111. Bourhy, H., Rollin, P. E., Vincent, J., & Sureau, P. (1989). Comparative field evaluation of the fluorescent-antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzyme immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies.

- Journal of clinical microbiology*, 27(3), 519–523.
<https://doi.org/10.1128/jcm.27.3.519-523.1989>
112. Bouslama, Z., Belkhiria, J. A., Turki, I., & Kharmachi, H. (2020). Spatio-temporal evolution of canine rabies in Tunisia, 2011-2016. *Preventive veterinary medicine*, 185, 105195.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105195>
113. Branche, R., & Renoux, G. (1972). Stimulation of rabies vaccine in mice by low doses of polyadenylic:polyuridylic complex. *Infection and immunity*, 6(3), 324–325. <https://doi.org/10.1128/iai.6.3.324-325.1972>
114. Bromham L. (2009). Why do species vary in their rate of molecular evolution?. *Biology letters*, 5(3), 401–404.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0136>
115. Bruckner, L., Cussler, K., Halder, M., Barrat, J., Castle, P., Duchow, K., Gatewood, D. M., Gibert, R., Groen, J., Knapp, B., Levis, R., Milne, C., Parker, S., Stünkel, K., Visser, N., Volkers, P., & ECVAM (2003). Three Rs approaches in the quality control of inactivated rabies vaccines. The report and recommendations of ECVAM workshop 48. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, 31(4), 429–454. <https://doi.org/10.1177/026119290303100409>
116. Brunker, K., Nadin-Davis, S., & Biek, R. (2018). Genomic sequencing, evolution and molecular epidemiology of rabies virus. Genomic sequencing, evolution and molecular epidemiology of rabies virus. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 37(2), 401–408.
<https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2810>
117. Bruyère, V., Vuillaume, P., Cliquet, F., & Aubert, M. (2000). Oral rabies vaccination of foxes with one or two delayed distributions of SAG2 baits during the spring. *Veterinary research*, 31(3), 339–345.
<https://doi.org/10.1051/vetres:2000123>
118. Burton, S. C., Hintz, H. F., Kemen, M. J., & Holmes, D. F. (1981). Lyophilized hyperimmune equine serum as a source of antibodies for neonatal foals. *American journal of veterinary research*, 42(2), 308–310.

119. Cantor, C. R., & Jukes, T. H. (1966). Repetitions in the polypeptide sequence of cytochromes. *Biochemical and biophysical research communications*, 23(3), 319–323. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90548-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90548-1)
120. Cantor, C. R., & Jukes, T. H. (1966). The repetition of homologous sequences in the polypeptide chains of certain cytochromes and globins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1), 177–184. <https://doi.org/10.1073/pnas.56.1.177>
121. Caron, D. A., Countway, P. D., Savai, P., Gast, R. J., Schnetzer, A., Moorthi, S. D., Dennett, M. R., Moran, D. M., & Jones, A. C. (2009). Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology. *Applied and environmental microbiology*, 75(18), 5797–5808. <https://doi.org/10.1128/AEM.00298-09>
122. Chainey, S. (2013). Examining the influence of cell size and bandwidth size on kernel density estimation crime hotspot maps for predicting spatial patterns of crime. *BSGLg*. 60:7–19.
123. Chase H. A. (1994). Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds. *Trends in biotechnology*, 12(8), 296–303. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(94\)90046-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(94)90046-9)
124. Chen, W., & Wang, H. (2015). Variance estimation for nucleotide substitution models. *Molecular phylogenetics and evolution*, 90, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.05.003>
125. Chervyakova, N. A., Linkova, N. S., Chalisova, N. I., Koncevaya, E. A., Trofimova, S. V., & Khavinson, V. K. (2014). *Advances in gerontology = Uspekhi gerontologii*, 27(1), 224–228.
126. Chuquista-Alcarraz, O., Falcón, N., Vigilato, M. A. N., Rocha, F., Toledo-Barone, G., Amorim-Conselheiro, J., Recuenco, S. E., & Castillo-Neyra, R. (2023). Dog Population Rabies Immunity before a Mass Vaccination Campaign in Lima, Peru: Vulnerabilities for Virus Reestablishment. *The*

- American journal of tropical medicine and hygiene*, 109(2), 420–428.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0530>
127. Ciconello, F. N., Katz, I. S. S., Fernandes, E. R., Guedes, F., & Silva, S. R. (2022). A comparative review of serological assays for the detection of rabies virus-specific antibodies. *Acta tropica*, 226, 106254. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106254>
128. Cliquet, F., & Aubert, M. (2004). Elimination of terrestrial rabies in Western European countries. *Developments in biologicals*, 119, 185–204.
129. Cliquet, F., Aubert, M., & Sagné, L. (1998). Development of a fluorescent antibody virus neutralisation test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *Journal of immunological methods*, 212(1), 79–87. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(97\)00212-3](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(97)00212-3)
130. Cliquet, F., Sagné, L., Schereffer, J. L., & Aubert, M. F. (2000). ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine*, 18(28), 3272–3279. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(00\)00127-4](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(00)00127-4)
131. Coetzer, A., Sabeta, C. T., Markotter, W., Rupprecht, C. E., & Nel, L. H. (2014). Comparison of biotinylated monoclonal and polyclonal antibodies in an evaluation of a direct rapid immunohistochemical test for the routine diagnosis of rabies in southern Africa. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(9), e3189. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003189>
132. Corey, L., Hattwick, M. A., Baer, G. M., & Smith, J. S. (1976). Serum neutralizing antibody after rabies postexposure prophylaxis. *Annals of internal medicine*, 85(2), 170–176. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-85-2-170>
133. Corona, T. F., Böger, B., Rocha, T. C. D., Svoboda, W. K., & Gomes, E. C. (2018). Comparative analysis of Mouse Inoculation Test and Virus Isolation in Cell Culture for rabies diagnosis in animals of Parana, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 51(1), 39–43. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0303-2017>

134. Côrtes, V.deA., Côrtes, J.deA., Vasconcellos, S. A., Ito, F. H., Rozas, C. E., Nilsson, M. R., & Paim, G. V. (1979). Estudo comparativo entre a susceptibilidade de camundongos lactentes e adultos para o isolamento de vírus rábico a partir da saliva de cães com raiva natural [Comparative study of the susceptibility of suckling and adult mice used for the isolation of rabies virus from the saliva of dogs with natural rabies]. *Arquivos do Instituto Biológico*, 46(3-4), 97–101.
135. Csako, G. (2019). Immunofixation Electrophoresis for Identification of Proteins and Specific Antibodies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 177–201. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_17
136. Curk, A., & Carpenter, T. E. (1994). Efficacy of the first oral vaccination against fox rabies in Slovenia. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 13(3), 763–775. <https://doi.org/10.20506/rst.13.3.796>
137. Dascalu, M. A., Picard-Meyer, E., Robardet, E., Servat, A., Arseniev, S., Groza, O., Starciuc, N., Vuta, V., Barbuceanu, F., Tanase, O. I., Daraban Bocaneti, F., Quenault, H., Hirschaud, E., Blanchard, Y., Velescu, E., & Cliquet, F. (2023). Whole genome sequencing and phylogenetic characterisation of rabies virus strains from Moldova and north-eastern Romania. *PLoS neglected tropical diseases*, 17(7), e0011446. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011446>
138. Davis, C., Neill, S., & Raj, P. (1997). Microwave fixation of rabies specimens for fluorescent antibody testing. *Journal of virological methods*, 68(2), 177–182. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00124-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00124-9)
139. de Kruif, J., Bakker, A. B., Marissen, W. E., Kramer, R. A., Throsby, M., Rupprecht, C. E., & Goudsmit, J. (2007). A human monoclonal antibody cocktail as a novel component of rabies postexposure prophylaxis. *Annual review of medicine*, 58, 359–368. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.58.061705.145053>

140. Dean, D. J., & Abelseth, M. K. (1973). Laboratory techniques in rabies: the fluorescent antibody test. *Monograph series. World Health Organization*, (23), 73–84.
141. DeAngelis, M. M., Wang, D. G., & Hawkins, T. L. (1995). Solid-phase reversible immobilization for the isolation of PCR products. *Nucleic acids research*, 23(22), 4742–4743. <https://doi.org/10.1093/nar/23.22.4742>
142. Delahaut P. (2017). Immunisation - Choice of host, adjuvants and boosting schedules with emphasis on polyclonal antibody production. *Methods (San Diego, Calif.)*, 116, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.01.002>
143. Denizot F. (1993). An automatic approach for DNA sequencing. *Biochimie*, 75(5), 347–351. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(93\)90168-r](https://doi.org/10.1016/0300-9084(93)90168-r)
144. Dewey C. N. (2019). Whole-Genome Alignment. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1910, 121–147. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0_4
145. Diaz, G., Bridges, C., Lucas, M., Cheng, Y., Schorey, J. S., Dobos, K. M., & Kruh-Garcia, N. A. (2018). Protein Digestion, Ultrafiltration, and Size Exclusion Chromatography to Optimize the Isolation of Exosomes from Human Blood Plasma and Serum. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (134), 57467. <https://doi.org/10.3791/57467>
146. Dietzschold, B., Cox, J. H., & Schneider, G. (1978). Structure and function of rabies virus glycoprotein. *Developments in biological standardization*, 40, 45–55.
147. *Directive EEC CVMP/VICH/393388/06. Target Animal Safety: Pharmaceuticals.* (2008). London. UK.
148. Dorward W. J. (1974). Laboratory Techniques in Rabies – Third Edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 15(9), xix.
149. Dowle, E. J., Morgan-Richards, M., & Trewick, S. A. (2013). Molecular evolution and the latitudinal biodiversity gradient. *Heredity*, 110(6), 501–510. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.4>

150. Drings, A., Jallet, C., Chambert, B., Tordo, N., & Perrin, P. (1999). Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine?. *Vaccine*, *17*(11-12), 1549–1557. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(98\)00357-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(98)00357-0)
151. Driskell, A. C., Ané, C., Burleigh, J. G., McMahon, M. M., O'meara, B. C., & Sanderson, M. J. (2004). Prospects for building the tree of life from large sequence databases. *Science (New York, N.Y.)*, *306*(5699), 1172–1174. <https://doi.org/10.1126/science.1102036>
152. Duong-Ly, K. C., & Gabelli, S. B. (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods in enzymology*, *541*, 105–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00009-4>
153. Dupuis, J. R., Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: one marker is not enough. *Molecular ecology*, *21*(18), 4422–4436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05642.x>
154. Durbin, S. D., & Feher, G. (1996). Protein crystallization. *Annual review of physical chemistry*, *47*, 171–204. <https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.47.1.171>
155. Eckardt, M., Freuling, C., Müller, T., & Selhorst, T. (2015). Spatio-temporal analysis of fox rabies cases in Germany 2005-2006. *Geospatial health*, *10*(1), 313. <https://doi.org/10.4081/gh.2015.313>
156. Eka Saputri, M., Aisyah Rahmalia Effendi, S., Nadila, R., Azzam Fajar, S., Damajanti Soejoedono, R., Handharyani, E., & Nadia Poetri, O. (2022). Immunoglobulin yolk targeting spike 1, receptor binding domain of spike glycoprotein and nucleocapsid of SARS-CoV-2 blocking RBD-ACE2 binding interaction. *International immunopharmacology*, *112*, 109280. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109280>
157. Elias, I., & Lagergren, J. (2007). Fast computation of distance estimators. *BMC bioinformatics*, *8*, 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-89>

158. Ellison, J. A., Gilbert, A. T., Recuenco, S., Moran, D., Alvarez, D. A., Kuzmina, N., Garcia, D. L., Peruski, L. F., Mendonça, M. T., Lindblade, K. A., & Rupprecht, C. E. (2014). Bat rabies in Guatemala. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(7), e3070. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003070>
159. Ermine, A., Tordo, N., & Tsiang, H. (1988). Rapid diagnosis of rabies infection by means of a dot hybridization assay. *Molecular and cellular probes*, 2(1), 75–82. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(88\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0890-8508(88)90046-1)
160. ESRI. (2011). *ArcGIS Desktop: Release 10*. Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA.
161. Evans, J. S., Horton, D. L., Easton, A. J., Fooks, A. R., & Banyard, A. C. (2012). Rabies virus vaccines: is there a need for a pan-lyssavirus vaccine?. *Vaccine*, 30(52), 7447–7454. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.015>
162. Fauvel, A., Labrude, P., & Vigneron, C. (1984). Freeze-drying of oxyhemoglobin: protection against oxidation in the presence of EDTA salts, sulfonic acid buffers, and pantothenic acid derivatives. *Journal of pharmaceutical sciences*, 73(6), 784–787. <https://doi.org/10.1002/jps.2600730619>
163. Fekadu, M., Shaddock, J. H., Sumner, J. W., Sanderlin, D. W., Knight, J. C., Esposito, J. J., & Baer, G. M. (1991). Oral vaccination of skunks with raccoon poxvirus recombinants expressing the rabies glycoprotein or the nucleoprotein. *Journal of wildlife diseases*, 27(4), 681–684. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.4.681>
164. Fenje, P., & Pinteric, L. (1966). Potentiation of tissue culture rabies vaccine by adjuvants. *American journal of public health and the nation's health*, 56(12), 2106–2113. <https://doi.org/10.2105/ajph.56.12.2106>
165. Ferguson, M., & Schild, G. C. (1982). A single-radial-immunodiffusion technique for the assay of rabies glycoprotein antigen: application for potency tests of vaccines against rabies. *The Journal of general virology*, 59(Pt 1), 197–201. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-59-1-197>

166. Ferris, D. H. (1967). Epizootiology. *Advances in veterinary science*, *11*, 261–320.
167. Fey, H., Pfister, H., Messerli, J., Sturzenegger, N., & Grolimund, F. (1976). Methods of isolation, purification and quantitation of bovine immunoglobulins: a technical review. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, *23*(4), 269–300. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1976.tb00682.x>
168. Finke, S., & Conzelmann, K. K. (2003). Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *Journal of virology*, *77*(22), 12074–12082. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.22.12074-12082.2003>
169. Finke, S., & Conzelmann, K. K. (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus research*, *111*(2), 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.004>
170. Fischer, S., Freuling, C. M., Müller, T., Pfaff, F., Bodenhofer, U., Höper, D., Fischer, M., Marston, D. A., Fooks, A. R., Mettenleiter, T. C., Conraths, F. J., & Homeier-Bachmann, T. (2018). Defining objective clusters for rabies virus sequences using affinity propagation clustering. *PLoS neglected tropical diseases*, *12*(1), e0006182. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006182>
171. Fisher, C. R., & Schnell, M. J. (2018). New developments in rabies vaccination. New developments in rabies vaccination. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, *37*(2), 657–672. <https://doi.org/10.20506/rst.37.2.2831>
172. Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2018). Ammonium Sulfate Fractionation of Antibodies. *Cold Spring Harbor protocols*, *2018*(6), 10.1101/pdb.prot099119. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099119>
173. Fishman, J. B., & Berg, E. A. (2019). Purification of Antibodies: Diethylaminoethyl (DEAE) Chromatography. *Cold Spring Harbor protocols*, *2019*(1), 10.1101/pdb.prot099135. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot099135>

174. Fitzgerald, E. A., & Rastogi, S. C. (1985). A collaborative study to establish an International Standard Rabies immunoglobulin of human origin. *Journal of biological standardization*, *13*(4), 327–333. [https://doi.org/10.1016/s0092-1157\(85\)80047-0](https://doi.org/10.1016/s0092-1157(85)80047-0)
175. Fitzgerald, E. A., Cabasso, V. J., Smith, J. S., & Rastogi, S. C. (1979). A collaborative study on the testing of rabies immune globulin (human) by the mouse neutralization test (MNT) and the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT). *Journal of biological standardization*, *7*(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/s0092-1157\(79\)80038-4](https://doi.org/10.1016/s0092-1157(79)80038-4)
176. Flamand, A., Raux, H., Gaudin, Y., & Ruigrok, R. W. (1993). Mechanisms of rabies virus neutralization. *Virology*, *194*(1), 302–313. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1261>
177. Fooks, A. R., Cliquet, F., Finke, S., Freuling, C., Hemachudha, T., Mani, R. S., Müller, T., Nadin-Davis, S., Picard-Meyer, E., Wilde, H., & Banyard, A. C. (2017). Rabies. *Nature reviews. Disease primers*, *3*, 17091. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.91>
178. Fotheringham, A. S., Brunson, C., Charlton, M. (2000). *Quantitative Geography: Perspectives on Spatial Data Analysis*. Sage. London. UK.
179. Fu, Z. F., Dietzschold, B., Schumacher, C. L., Wunner, W. H., Ertl, H. C., & Koprowski, H. (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.2001>
180. Fu, Z. F., Dietzschold, B., Schumacher, C. L., Wunner, W. H., Ertl, H. C., & Koprowski, H. (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *88*(5), 2001–2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.5.2001>
181. Fujii, H., Takita-Sonoda, Y., Mifune, K., Hirai, K., Nishizono, A., & Mannen, K. (1994). Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination

- with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. *The Journal of general virology*, 75 (Pt 6), 1339–1344. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1339>
182. García-Pereira, M. J., Caballero, A., & Quesada, H. (2010). Evaluating the relationship between evolutionary divergence and phylogenetic accuracy in AFLP data sets. *Molecular biology and evolution*, 27(5), 988–1000. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp315>
183. Gebauer, B., Simić, M., Branović, K., Trescec, A., & Benko, B. (1999). Ion-exchange chromatography separation of the detergent and the solvent from immunoglobulins after solvent-detergent treatment. *Journal of chromatography. A*, 852(1), 83–86. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)00230-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)00230-7)
184. Gebru, G., Romha, G., Asefa, A., Hadush, H., & Biedemariam, M. (2019). Risk Factors and Spatio-Temporal Patterns of Human Rabies Exposure in Northwestern Tigray, Ethiopia. *Annals of global health*, 85(1), 119. <https://doi.org/10.5334/aogh.2518>
185. Gee, S. C., Bate, I. M., Thomas, T. M., & Rylatt, D. B. (2003). The purification of IgY from chicken egg yolk by preparative electrophoresis. *Protein expression and purification*, 30(2), 151–155. [https://doi.org/10.1016/s1046-5928\(03\)00076-7](https://doi.org/10.1016/s1046-5928(03)00076-7)
186. Ghassemi, S., Pourbadie, H. G., Prehaud, C., Lafon, M., & Sayyah, M. (2022). Role of the glycoprotein thorns in anxious effects of rabies virus: Evidence from an animal study. *Brain research bulletin*, 185, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.05.001>
187. Gherardin, A., & Lau, S. (2007). Intradermal rabies vaccine. *The Medical journal of Australia*, 187(1), 58–59. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2007.tb01128.x>
188. Gold, S., Donnelly, C. A., Nouvellet, P., & Woodroffe, R. (2020). Rabies virus-neutralising antibodies in healthy, unvaccinated individuals: What

- do they mean for rabies epidemiology?. *PLoS neglected tropical diseases*, *14*(2), e0007933. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007933>
189. GOLDWASSER, R. A., & KISSLING, R. E. (1958). Fluorescent antibody staining of street and fixed rabies virus antigens. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, *98*(2), 219–223. <https://doi.org/10.3181/00379727-98-23996>
 190. Gozdas, H. T., Karabay, O., Ogutlu, A., Guclu, E., Yurumez, Y., Koroglu, M., & Erkorkmaz, U. (2018). The Effect of Concurrent Tetanus-diphtheria Vaccination on the Antibody Response to Rabies Vaccine: A Preliminary Study. *Prague medical report*, *119*(2-3), 113–121. <https://doi.org/10.14712/23362936.2018.11>
 191. Grandien, M., & Olding-Stenkvist, E. (1984). Rapid diagnosis of viral infections in the central nervous system. *Scandinavian journal of infectious diseases*, *16*(1), 1–8. <https://doi.org/10.3109/00365548409068402>
 192. Griffin, H. G., & Griffin, A. M. (1993). DNA sequencing. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *23*, 1–8. <https://doi.org/10.1385/0-89603-248-5:1>
 193. Grodzki, A. C., & Berenstein, E. (2010). Antibody purification: ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *588*, 15–26. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_3
 194. Grover, M., Bessell, P. R., Conan, A., Polak, P., Sabeta, C. T., Reininghaus, B., & Knobel, D. L. (2018). Spatiotemporal epidemiology of rabies at an interface between domestic dogs and wildlife in South Africa. *Scientific reports*, *8*(1), 10864. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29045-x>
 195. Gu, X., & Li, W. H. (1998). Estimation of evolutionary distances under stationary and nonstationary models of nucleotide substitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(11), 5899–5905. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.5899>

196. Guerra, M. A., Curns, A. T., Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., Krebs, J. W., & Childs, J. E. (2003). Skunk and raccoon rabies in the eastern United States: temporal and spatial analysis. *Emerging infectious diseases*, 9(9), 1143–1150. <https://doi.org/10.3201/eid0909.020608>
197. *Guideline on statistical principles for clinical trials for veterinary medicinal products (pharmaceuticals)*. (2022). EMA/CVMP/EWP/81976/2010-Rev.1. Вилучено з
198. *Guidelines to design an EU co-financed programme on eradication and control of Rabies in Wildlife. Working Discussion Document*. (2015). Вилучено 3
http://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_vet-progs_guidance_rabies.pdf
199. Guo, D., Chen, J., MacEachren, A. M., & Liao, K. (2006). A visualization system for space-time and multivariate patterns (VIS-STAMP). *IEEE transactions on visualization and computer graphics*, 12(6), 1461–1474. <https://doi.org/10.1109/TVCG.2006.84>
200. Guo, D., Yin, W., Yu, H., Thill, J. C., Yang, W., Chen, F., & Wang, D. (2018). The role of socioeconomic and climatic factors in the spatio-temporal variation of human rabies in China. *BMC infectious diseases*, 18(1), 526. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3427-8>
201. Haase, M., Seinsche, D., & Schneider, W. (1985). The mouse neutralization test in comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test: differences in the results in rabies antibody determinations. *Journal of biological standardization*, 13(2), 123–128. [https://doi.org/10.1016/s0092-1157\(85\)80017-2](https://doi.org/10.1016/s0092-1157(85)80017-2)
202. Halan, V., Maity, S., Bhambure, R., & Rathore, A. S. (2019). Multimodal Chromatography for Purification of Biotherapeutics - A Review. *Current protein & peptide science*, 20(1), 4–13. <https://doi.org/10.2174/1389203718666171020103559>

203. Hanke, D., Freuling, C. M., Fischer, S., Hueffer, K., Hundertmark, K., Nadin-Davis, S., Marston, D., Fooks, A. R., Bøtner, A., Mettenleiter, T. C., Beer, M., Rasmussen, T. B., Müller, T. F., & Höper, D. (2016). Spatio-temporal Analysis of the Genetic Diversity of Arctic Rabies Viruses and Their Reservoir Hosts in Greenland. *PLoS neglected tropical diseases*, *10*(7), e0004779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004779>
204. Hansen, P., Scoble, J. A., Hanson, B., & Hoogenraad, N. J. (1998). Isolation and purification of immunoglobulins from chicken eggs using thiophilic interaction chromatography. *Journal of immunological methods*, *215*(1-2), 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0022-1759\(98\)00050-7](https://doi.org/10.1016/s0022-1759(98)00050-7)
205. Harvey, A. M., Watson, J. L., Brault, S. A., Edman, J. M., Moore, S. M., Kass, P. H., & Wilson, W. D. (2016). Duration of serum antibody response to rabies vaccination in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *249*(4), 411–418. <https://doi.org/10.2460/javma.249.4.411>
206. Hashimoto, M., Higashi, T., Isomoto, A., Uozumi, M., & Okumura, A. (1984). A dynamic dialysis method for studying protein-ligand binding using chromatographic theory. *Analytical biochemistry*, *137*(2), 344–350. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90096-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90096-4)
207. Heaton, P. R., Johnstone, P., McElhinney, L. M., Cowley, R., O'Sullivan, E., & Whitby, J. E. (1997). Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *Journal of clinical microbiology*, *35*(11), 2762–2766. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2762-2766.1997>
208. Heaton, P. R., McElhinney, L. M., & Lowings, J. P. (1999). Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *Journal of virological methods*, *81*(1-2), 63–69. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00060-9](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00060-9)
209. Heimann H. (1970). Epizootology supplements epidemiology. *Archives of environmental health*, *20*(6), 675. <https://doi.org/10.1080/00039896.1970.10665642>

210. Henderson, L. O., Hazlehurst, J. S., Taylor, L., & Hannon, W. H. (1988). Preparation of lyophilized human serum based reference materials with graded levels of apolipoproteins A-I and B. *Clinical biochemistry*, *21*(4), 219–223. [https://doi.org/10.1016/s0009-9120\(88\)80004-3](https://doi.org/10.1016/s0009-9120(88)80004-3)
211. Hill, P. J., & Stewart, G. S. (1992). The polymerase chain reaction in molecular and micro-biology. *Biotechnology & genetic engineering reviews*, *10*, 343–377. <https://doi.org/10.1080/02648725.1992.10647892>
212. Hober, S., Nord, K., & Linhult, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *848*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.030>
213. Hong, H. A., Rooijackers, E. J., Ke, N. T., Groen, J., & Osterhaus, A. D. (1994). Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, *22*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1006/biol.1994.1001>
214. Hooper, D. C., Roy, A., Kean, R. B., Phares, T. W., & Barkhouse, D. A. (2011). Therapeutic immune clearance of rabies virus from the CNS. *Future virology*, *6*(3), 387–397. <https://doi.org/10.2217/fvl.10.88>
215. Hornsby, K., Egenhofer, M. J. (2000). Identity-based change: a foundation for spatio-temporal knowledge representation. *Int J Geogr Inf Sci*. *14*(3):207–224.
216. Horton, D. L., Ismail, M. Z., Siryan, E. S., Wali, A. R., Ab-dulla, H. E., Wise, E., Voller, K., Harkess, G., Marston, D. A., McElhinney, L. M., Abbas, S. F., & Fooks, A. R. (2013). Rabies in Iraq: trends in human cases 2001-2010 and characterisation of animal rabies strains from Baghdad. *PLoS neglected tropical diseases*, *7*(2), e2075. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002075>
217. Horton, R. M., Raju, R., & Conti-Fine, B. M. (1997). A T-linker strategy for modification and directional cloning of PCR products. *Methods in*

- molecular biology (Clifton, N.J.)*, 67, 101–110. <https://doi.org/10.1385/0-89603-483-6:101>
218. Hostnik, P. (2000). The modification of fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) test for the detection of antibodies to rabies virus. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, 47(6), 423–427. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00362.x>
<https://www.ema.europa.eu/en/statistical-principles-clinical-trials-veterinary-medicinal-products-pharmaceuticals-scientific-guideline>
219. Hughes, A. L., & Yeager, M. (1997). Molecular evolution of the vertebrate immune system. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 19(9), 777–786. <https://doi.org/10.1002/bies.950190907>
220. Huisman, O, Santiago, I. F., Kraak, M.-J. & Retsios, B. (2009) Developing a Geovisual Analytics Environment for Investigating Archaeological Events: Extending the Space–Time Cube. *Cartography and Geographic Information Science*, 36:3, 225–236, doi: 10.1559/152304009788988297
221. Hussain, M. H., Ward, M. P., Body, M., Al-Rawahi, A., Wadir, A. A., Al-Habsi, S., Saqib, M., Ahmed, M. S., & Almaawali, M. G. (2013). Spatio-temporal pattern of sylvatic rabies in the Sultanate of Oman, 2006-2010. *Preventive veterinary medicine*, 110(3-4), 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.01.001>
222. International Office of Epizootics. (2010). *Handbook on import risk analysis for animals and animal products: Volume 1*. Paris: OIE.
223. Irvine G. B. (2001). Determination of molecular size by size-exclusion chromatography (gel filtration). *Current protocols in cell biology, Chapter 5*, . <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0505s06>
224. *ISO Guide 30:1992 Terms and definitions used in connection with reference material*. (1992). Вилучено 3
http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=21638

225. *ISO Guide 31:2001 Reference material – Content of certificates and labels.* (2001). Вилучено з <http://www.en-standard.eu/iso-guide-31-reference-materials-contents-ofcertificates-and-labels>
226. *ISO Guide 33:2002 Uses of certified reference materials.* (2002). Вилучено з <http://www.enstandard.eu/iso-guide-33-uses-of-certified-reference-materials>
227. *ISO Guide 34:2009 General requirements for the competence of reference material producers.* (2009). Вилучено з http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=50174
228. *ISO Guide 35:2006 Reference Material – General and statistical principles for certification.* (2006). Вилучено з <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:guide:35:ed-3:v1:en>
229. Jackson, A. C., & Rintoul, N. E. (1992). Effects of post-mortem autolysis on the detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse brain by using in situ hybridization. *Molecular and cellular probes*, 6(3), 231–235. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90021-o](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90021-o)
230. Jackson, A. C., & Wunner, W. H. (1991). Detection of rabies virus genomic RNA and mRNA in mouse and human brains by using in situ hybridization. *Journal of virology*, 65(6), 2839–2844. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.6.2839-2844.1991>
231. Jackson, A. C., Reimer, D. L., & Wunner, W. H. (1989). Detection of rabies virus RNA in the central nervous system of experimentally infected mice using in situ hybridization with RNA probes. *Journal of virological methods*, 25(1), 1–11. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(89\)90095-5](https://doi.org/10.1016/0166-0934(89)90095-5)
232. Jakel, V., König, M., Cussler, K., Hanschmann, K., & Thiel, H. J. (2008). Factors influencing the antibody response to vaccination against rabies. *Developments in biologicals*, 131, 431–437.
233. Jayakumar, R., Nachimuthu, K., & Padmanaban, V. D. (1995). A Dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot ELISA): comparison with standard fluorescent antibody test (FAT) for the diagnosis of rabies in animals.

- Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 18(4), 269–273. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(95\)00007-u](https://doi.org/10.1016/0147-9571(95)00007-u)
234. Jimenez, I., Spraker, T., Anderson, J., Bowen, R., & Gilbert, A. (2019). Isolation of Rabies Virus from the Salivary Glands of Wild and Domestic Carnivores during a Skunk Rabies Epizootic. *Journal of wildlife diseases*, 55(2), 473–476. <https://doi.org/10.7589/2018-05-127>
235. Johnson, K. P., Swoveland, P. T., & Emmons, R. W. (1980). Diagnosis of rabies by immunofluorescence in trypsin-treated histologic sections. *JAMA*, 244(1), 41–43.
236. Johnson, N., Cunningham, A. F., & Fooks, A. R. (2010). The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine*, 28(23), 3896–3901. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.039>
237. Johnson, N., McElhinney, L. M., Smith, J., Lowings, P., & Fooks, A. R. (2002). Phylogenetic comparison of the genus Lyssavirus using distal coding sequences of the glycoprotein and nucleoprotein genes. *Archives of virology*, 147(11), 2111–2123. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0877-4>
238. Kadowaki, H., Kadowaki, T., Wondisford, F. E., & Taylor, S. I. (1989). Use of polymerase chain reaction catalyzed by Taq DNA polymerase for site-specific mutagenesis. *Gene*, 76(1), 161–166. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90018-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90018-8)
239. Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature reviews. Genetics*, 21(7), 428–444. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>
240. Karamany, R. M., Kazar, J., Malik, S. A., al-Mufti, S., & Badriya, M. (1988). Rapid quantitative assay of rabies post-vaccination antibody by ELISA. *APMIS. Supplementum*, 3, 40–43.
241. Kasempimolporn, S., Saengseesom, W., Lumlertdacha, B., & Sitprija, V. (2000). Detection of rabies virus antigen in dog saliva using a latex agglutination test. *Journal of clinical microbiology*, 38(8), 3098–3099. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.8.3098-3099.2000>

242. Katz, W., Larsson, K. M., & Mead, T. H. (1968). The largest rabies-specific antigen in extracts of infected suckling mouse brains. *The Journal of general virology*, 2(3), 399–426. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-2-3-399>
243. Kaur, M., Garg, R., Singh, S., & Bhatnagar, R. (2015). Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading?. *Expert review of vaccines*, 14(3), 369–381. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.973403>
244. Kawai, A., Anzai, J., Honda, Y., Morimoto, K., Takeuchi, K., Kohno, T., Wakisaka, K., Goto, H., & Minamoto, N. (1997). Monoclonal antibody #5-2-26 recognizes the phosphatase-sensitive epitope of rabies virus nucleoprotein. *Microbiology and immunology*, 41(1), 33–42. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1997.tb01170.x>
245. Kazadi Kaway, E., Marcotty, T., Mfumu-Kazadi, L. M., Marcotty, D., Van Gucht, S., & Kirschvink, N. (2022). Evaluation of dog vaccination schemes against rabies in Kinshasa, Democratic Republic of the Congo. *Preventive veterinary medicine*, 198, 105531. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105531>
246. Khrustalev V. V. (2021). The PentaFOLD 3.0 Algorithm for the Selection of Stable Elements of Secondary Structure to be Included in Vaccine Peptides. *Protein and peptide letters*, 28(5), 573–588. <https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123851>
247. Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111–120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
248. Kissi, B., Tordo, N., & Bourhy, H. (1995). Genetic polymorphism in the rabies virus nucleoprotein gene. *Virology*, 209(2), 526–537. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1285>
249. Koch, F. J., Sagartz, J. W., Davidson, D. E., & Lawhaswasdi, K. (1975). Diagnosis of human rabies by the cornea test. *American journal of clinical pathology*, 63(4), 509–515. <https://doi.org/10.1093/ajcp/63.4.509>

250. Koepfel, K. N., van Schalkwyk, O. L., & Thompson, P. N. (2022). Patterns of rabies cases in South Africa between 1993 and 2019, including the role of wildlife. *Transboundary and emerging diseases*, *69*(2), 836–848. <https://doi.org/10.1111/tbed.14080>
251. Kornienko, L., Moroz, O., Mezhensky, A., Skorokhod, S., Datsenko, R., Karpulenko, M., Polupan, I., Dzyuba, Y., Nedosekov, V., Makovskaya, I., Hibaliuk, Y., Sonko, M., Tsarenko, T., & Pishchanskyi, O. (2019). Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти сказу в Україні за період 1999-2018 рр. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*, (3), 90-109. <https://doi.org/10.31890/vttp.2019.03.14>
252. Kosiol, C., Bofkin, L., & Whelan, S. (2006). Phylogenetics by likelihood: evolutionary modeling as a tool for understanding the genome. *Journal of biomedical informatics*, *39*(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2005.08.003>
253. Kostense, S., Moore, S., Companjen, A., Bakker, A. B., Marissen, W. E., von Eyben, R., Weverling, G. J., Hanlon, C., & Goudsmit, J. (2012). Validation of the rapid fluorescent focus inhibition test for rabies virus-neutralizing antibodies in clinical samples. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *56*(7), 3524–3530. <https://doi.org/10.1128/AAC.06179-11>
254. Kota, R. K., Reddy, P. N., & Sreerama, K. (2020). Application of IgY antibodies against staphylococcal protein A (SpA) of *Staphylococcus aureus* for detection and prophylactic functions. *Applied microbiology and biotechnology*, *104*(21), 9387–9398. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10912-5>
255. Koutchoukali, M. A., Blancou, J., Chappuis, G., Tixier, G., Eloit, M., Ganiere, J. P., Chantal, J., Simon, S., Berthier, A., & Toma, B. (1985). Réponse sérologique du chien après primovaccination antirabique à l'aide de vaccins adjuvés ou non [Serological response of the dog after primary antirabies vaccination using adjuvant or non-adjuvant vaccines]. *Annales de recherches vétérinaires. Annals of veterinary research*, *16*(4), 345–349.

256. Krämer, B., Schildger, H., Behrendorf-Nicol, H. A., Hanschmann, K. M., & Duchow, K. (2009). The rapid fluorescent focus inhibition test is a suitable method for batch potency testing of inactivated rabies vaccines. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 37(2), 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.01.001>
257. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95–125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
258. Kubo, N., Nishii, M., Inoue, S., Noguchi, A., & Hatta, H. (2022). Preparation of Anti-Rabies Virus N Protein IgYs by DNA Immunization of Hens Using Different Types of Adjuvants. *The journal of poultry science*, 59(2), 191–196. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0210053>
259. Kumar, S., Stecher, G., Peterson, D., & Tamura, K. (2012). MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(20), 2685–2686. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts507>
260. Kweon, C. H., Kwon, B. J., Woo, S. R., Kim, J. M., Woo, G. H., Son, D. H., Hur, W., & Lee, Y. S. (2000). Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (Ig Y) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *The Journal of veterinary medical science*, 62(9), 961–964. <https://doi.org/10.1292/jvms.62.961>
261. Larghi, O. P., González, E., & Held, J. R. (1973). Evaluation of the corneal test as a laboratory method for rabies diagnosis. *Applied microbiology*, 25(2), 187–189. <https://doi.org/10.1128/am.25.2.187-189.1973>
262. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and

- Clustal X version 2.0. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
263. Layan, M., Dellicour, S., Baele, G., Cauchemez, S., & Bourhy, H. (2021). Mathematical modelling and phylodynamics for the study of dog rabies dynamics and control: A scoping review. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(5), e0009449. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009449>
264. Lee, K. E., Han, B. K., Han, J. Y., Hong, J. Y., Kim, M. N., Heo, W. I., Sohn, M. H., Kim, K. W., & Kim, K. E. (2014). Production of egg yolk antibodies specific to house dust mite proteins. *Yonsei medical journal*, 55(4), 999–1004. <https://doi.org/10.3349/ymj.2014.55.4.999>
265. Lembo, T., Niezgod, M., Velasco-Villa, A., Cleaveland, S., Ernest, E., & Rupprecht, C. E. (2006). Evaluation of a direct, rapid immunohistochemical test for rabies diagnosis. *Emerging infectious diseases*, 12(2), 310–313. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050812>
266. Leow, B. L., Khoo, C. K., Syamsiah Aini, S., Roslina, H., & Faizah Hanim, M. S. (2021). Phylogenetic analysis of nucleoprotein gene of Rabies virus in Malaysia from 2015 to 2018. *Tropical biomedicine*, 38(2), 72–78. <https://doi.org/10.47665/tb.38.2.043>
267. Lépine P. (1973). Laboratory techniques in rabies: gel-diffusion techniques. *Monograph series. World Health Organization*, (23), 151–157.
268. Lerner, C. G., & Inouye, M. (1994). Localized random polymerase chain reaction mutagenesis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 31, 97–112. <https://doi.org/10.1385/0-89603-258-2:97>
269. Levaditi, J. C., Atanasiu, P., Gamet, A., & Guillon, J. C. (1973). Problèmes posés au diagnostic de la rage par les méthodes d'immunofluorescence et d'immuno-peroxydase [Diagnosis of rabies by the immunofluorescence and immuno-peroxidase methods]. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales*, 66(1), 12–20.
270. Li, J.F. (2015). A fast neighbor joining method. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(3), 8733–8743. <https://doi.org/10.4238/2015.July.31.22>

271. Liu, B., & Zhou, X. (2021). Freeze-Drying of Proteins. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2180, 683–702. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_37
272. Lodmell, D. L., Ray, N. B., & Ewalt, L. C. (1998). Gene gun particle-mediated vaccination with plasmid DNA confers protective immunity against rabies virus infection. *Vaccine*, 16(2-3), 115–118. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(97\)88325-9](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(97)88325-9)
273. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.
274. Luo, J., Zhang, B., Wu, Y., Tian, Q., Mo, M., Long, T., Mei, M., Fan, R., Lyu, Z., Jiang, H., Wu, F., Lin, Y., & Guo, X. (2018). Recombinant rabies virus expressing interleukin-6 enhances the immune response in mouse brain. *Archives of virology*, 163(7), 1889–1895. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3808-8>
275. Luo, J., Zhang, Y., He, H., Liu, Q., Huang, S., & Guo, X. (2019). Artesunate enhances the immune response of rabies vaccine as an adjuvant. *Vaccine*, 37(51), 7478–7481. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.077>
276. Lv, X. J., Ma, X. J., Wang, L. H., Li, H., Shen, X. X., Yu, P. C., Tang, Q., & Liang, G. D. (2012). Preparation and initial application of a monoclonal antibody specific for a newly discovered conserved linear epitope of rabies virus nucleoprotein. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 25(1), 98–103. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2012.01.014>
277. Lyng, J. (1994). Calibration of a replacement preparation for the International Standard for Rabies Immunoglobulin. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 22(3), 249–255. <https://doi.org/10.1006/biol.1994.1036>
278. Lyng, J., Bentzon, M. W., Ferguson, M., & Fitzgerald, E. A. (1992). Rabies vaccine standardization: International Collaborative Study for the Characterization of the fifth International Standard for Rabies Vaccine.

- Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 20(4), 301–313. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(05\)80051-x](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(05)80051-x)
279. Madhusudana, S. N., Paul, J. P., Abhilash, V. K., & Suja, M. S. (2004). Rapid diagnosis of rabies in humans and animals by a dot blot enzyme immunoassay. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 8(6), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2004.02.006>
280. Madhusudana, S. N., Subha, S., Thankappan, U., & Ashwin, Y. B. (2012). Evaluation of a direct rapid immunohistochemical test (dRIT) for rapid diagnosis of rabies in animals and humans. *Virologica Sinica*, 27(5), 299–302. <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3265-6>
281. Madhusudana, S. N., Sundaramoorthy, S., & Ullas, P. T. (2010). Utility of human embryonic kidney cell line HEK-293 for rapid isolation of fixed and street rabies viruses: comparison with Neuro-2a and BHK-21 cell lines. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 14(12), e1067–e1071. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2010.07.004>
282. Maidak, B. L., Cole, J. R., Lilburn, T. G., Parker, C. T., Jr, Saxman, P. R., Farris, R. J., Garrity, G. M., Olsen, G. J., Schmidt, T. M., & Tiedje, J. M. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic acids research*, 29(1), 173–174. <https://doi.org/10.1093/nar/29.1.173>
283. Maiolo, M., Zhang, X., Gil, M., & Anisimova, M. (2018). Progressive multiple sequence alignment with indel evolution. *BMC bioinformatics*, 19(1), 331. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2357-1>
284. Makarov, V. V., Dzhupina, S. I., Vedernikov, V. A., Zavodskikh, A. V., Afonin, V. N., & Baldina, I. V. (2002). Sovremennaiia épi-zootologiiia beshenstva [Current rabies epizootiology]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, (4), 33–36.

285. Maki, J, Guiot, AL, Aubert, M, Brochier, B, Cliquet, F, Hanlon, CA, et al. (2017). Oral vaccination of wildlife using a vaccinia-rabies-glycoprotein recombinant virus vaccine (RABORAL V-RG): a global review. *Vet Res.* 48:57. doi: 10.1186/s13567-017-0459-9.
286. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 3.1.18. Rabies (infection with rabies virus and other lyssaviruses).* (2023). Вилучено 3
https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.18_RABIES.pdf.
287. Marchal, L., Legrand, J., & Foucault, A. (2003). Centrifugal partition chromatography: a survey of its history, and our recent advances in the field. *Chemical record (New York, N.Y.)*, 3(3), 133–143. <https://doi.org/10.1002/tcr.10057>
288. Martinović, T., Andjelković, U., Klobučar, M., Černigoj, U., Vidič, J., Lučić, M., Pavelić, K., & Josić, D. (2017). Affinity chromatography on monolithic supports for simultaneous and high-throughput isolation of immunoglobulins from human serum. *Electrophoresis*, 38(22-23), 2909–2913. <https://doi.org/10.1002/elps.201700216>
289. Masatani, T., Ito, N., Ito, Y., Nakagawa, K., Abe, M., Yamaoka, S., Okadera, K., & Sugiyama, M. (2013). Importance of rabies virus nucleoprotein in viral evasion of interferon response in the brain. *Microbiology and immunology*, 57(7), 511–517. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12058>
290. Mathuranayagam, D., & Rao, P. V. (1984). Antemortem diagnosis of human rabies by corneal impression smears using immunofluorescent technique. *The Indian journal of medical research*, 79, 463–467.
291. Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(2), 560–564. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560>
292. Mayner, R. E., & Needy, C. F. (1987). Evaluation of the single radial-immunodiffusion assay for measuring the glycoprotein content of rabies

- vaccines. *Journal of biological standardization*, 15(1), 1–10.
[https://doi.org/10.1016/0092-1157\(87\)90011-4](https://doi.org/10.1016/0092-1157(87)90011-4)
293. Mazur, N., Nedosekov, V., Polupan, I. (2015). The Role of the FAT in Laboratory Diagnosis of Rabies. *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія»*, 26. 232-237.
294. Mazur, N., Polupan, I., Drozhzhe, Zh., Nedosekov, V., Nikitova, A. (2017). Comparison of the quality of brain tissue smears for the rabies immunofluorescence diagnosis, which were obtained by means of chemical or physical fixation. *CBEP Ukraine regional One Health research symposium and peerreview session* (p. 146). 24–28 квітня, 2017, Київ, Україна.
295. McElhinney, L. M., Marston, D. A., Stankov, S., Tu, C., Black, C., Johnson, N., Jiang, Y., Tordo, N., Müller, T., & Fooks, A. R. (2008). Molecular epidemiology of lyssaviruses in Eurasia. *Developments in biologicals*, 131, 125–131.
296. Mebatsion, T., Sillero-Zubiri, C., Gottelli, D., & Cox, J. H. (1992). Detection of rabies antibody by ELISA and RFFIT in unvaccinated dogs and in the endangered Simien jackal (*Canis simensis*) of Ethiopia. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 39(3), 233–235. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1992.tb01162.x>
297. Meliker, J. R., & Sloan, C. D. (2011). Spatio-temporal epidemiology: principles and opportunities. *Spatial and spatio-temporal epidemiology*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.sste.2010.10.001>
298. Meliker, J. R., Goovaerts, P., Jacquez, G. M., & Nriagu, J. O. (2010). Incorporating individual-level distributions of exposure error in epidemiologic analyses: an example using arsenic in drinking water and bladder cancer. *Annals of epidemiology*, 20(10), 750–758. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2010.06.012>
299. Miao, L., Yang, Y., Yan, M., Li, Y., Zhao, J., Guo, J., & Zheng, D. (2017). Enhanced Immune Response to Rabies Viruses by the Use of a

- Liposome Adjuvant in Vaccines. *Viral immunology*, 30(10), 727–733.
<https://doi.org/10.1089/vim.2017.0093>
300. Mills, D. (2013). Intradermal pre-exposure rabies vaccination. Promises and pitfalls. *Travel medicine and infectious disease*, 11(6), 335–336.
<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2013.10.007>
301. Mogano, K., Suzuki, T., Mohale, D., Phahladira, B., Ngoepe, E., Kamata, Y., Chirima, G., Sabeta, C., & Makita, K. (2022). Spatio-temporal epidemiology of animal and human rabies in northern South Africa between 1998 and 2017. *PLoS neglected tropical diseases*, 16(7), e0010464.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010464>
302. Montaña-Hirose, J. A., Lafage, M., & Lafon, M. (1995). Measurement of rabies virus N protein in rabies vaccines. *Research in virology*, 146(3), 217–224. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(96\)80582-6](https://doi.org/10.1016/0923-2516(96)80582-6)
303. Moore, S. M. (2021). Challenges of Rabies Serology: Defining Context of Interpretation. *Viruses*, 13(8), 1516. <https://doi.org/10.3390/v13081516>
304. Moore, S. M., & Hanlon, C. A. (2010). Rabies-specific antibodies: measuring surrogates of protection against a fatal disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 4(3), e595. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000595>.
305. Morris, J., Crowcroft, N. S., Fooks, A. R., Brookes, S. M., & Andrews, N. (2007). Rabies antibody levels in bat handlers in the United Kingdom: immune response before and after purified chick embryo cell rabies booster vaccination. *Human vaccines*, 3(5), 165–170.
<https://doi.org/10.4161/hv.3.5.4216>
306. Morrison, D.A. (1996). Phylogenetic tree-building. *International journal for parasitology*, 26(6), 589–617. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(96\)00044-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(96)00044-6)
307. Moussy, C., Atterby, H., Griffiths, A. G., Allnutt, T. R., Mathews, F., Smith, G. C., Aegerter, J. N., Bearhop, S., & Hosken, D. J. (2015). Population genetic structure of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) across Europe and

- implications for the potential spread of bat rabies (European bat lyssavirus EBLV-1). *Heredity*, *115*(1), 83–92. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.20>
308. Müller, T. F., Schröder, R., Wysocki, P., Mettenleiter, T. C., & Freuling, C. M. (2015). Spatio-temporal Use of Oral Rabies Vaccines in Fox Rabies Elimination Programmes in Europe. *PLoS neglected tropical diseases*, *9*(8), e0003953. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003953>
309. Müller, T., Bätza, H. J., Freuling, C., Kliemt, A., Kliemt, J., Heuser, R., Schlüter, H., Selhorst, T., Vos, A., & Mettenleiter, T. C. (2012). Elimination of terrestrial rabies in Germany using oral vaccination of foxes. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*, *125*(5-6), 178–190.
310. Mullis K. B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, *262*(4), 56–65. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0490-56>
311. Mysara, M., Vandamme, P., Props, R., Kerckhof, F. M., Leys, N., Boon, N., Raes, J., & Monsieurs, P. (2017). Reconciliation between operational taxonomic units and species boundaries. *FEMS microbiology ecology*, *93*(4), fix029. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix029>
312. Nadin-Davis S. A. (1998). Polymerase chain reaction protocols for rabies virus discrimination. *Journal of virological methods*, *75*(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(98\)00106-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(98)00106-2)
313. Nadin-Davis, S. A., & Loza-Rubio, E. (2006). The molecular epidemiology of rabies associated with chiropteran hosts in Mexico. *Virus research*, *117*(2), 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.10.006>
314. Nadin-Davis, S. A., Sheen, M., & Wandeler, A. I. (2009). Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *Journal of medical virology*, *81*(8), 1484–1497. <https://doi.org/10.1002/jmv.21547>
315. Nakagawa, K., Nakagawa, K., Omatsu, T., Katayama, Y., Oba, M., Mitake, H., Okada, K., Yamaoka, S., Takashima, Y., Masatani, T., Okadera, K., Ito, N., Mizutani, T., & Sugiyama, M. (2017). Generation of a novel live

- rabies vaccine strain with a high level of safety by introducing attenuating mutations in the nucleoprotein and glycoprotein. *Vaccine*, 35(42), 5622–5628. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.08.050>
316. Nei, M. (1996). Phylogenetic analysis in molecular evolutionary genetics. *Annual review of genetics*, 30, 371–403. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.371>
317. Ng, W. M., Fedosyuk, S., English, S., Augusto, G., Berg, A., Thorley, L., Haselon, A. S., Segireddy, R. R., Bowden, T. A., & Douglas, A. D. (2022). Structure of trimeric pre-fusion rabies virus glycoprotein in complex with two protective antibodies. *Cell host & microbe*, 30(9), 1219–1230.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.07.014>
318. Nishimaki, T., & Sato, K. (2019). An Extension of the Kimura Two-Parameter Model to the Natural Evolutionary Process. *Journal of molecular evolution*, 87(1), 60–67. <https://doi.org/10.1007/s00239-018-9885-1>
319. Nunberg, J. H., Doyle, M. V., York, S. M., & York, C. J. (1989). Interleukin 2 acts as an adjuvant to increase the potency of inactivated rabies virus vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(11), 4240–4243. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.11.4240>
320. Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M., & O'Connor, B. F. (2017). Gel-Filtration Chromatography. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1485, 15–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_2
321. Ogden, T. H., & Rosenberg, M. S. (2007). Alignment and topological accuracy of the direct optimization approach via POY and traditional phylogenetics via ClustalW + PAUP*. *Systematic biology*, 56(2), 182–193. <https://doi.org/10.1080/10635150701281102>
322. Oliveira, F. A. S., Castro, R. J. S., de Oliveira, J. F., Barreto, F. M., Farias, M. P. O., Marinho, G. L. O. C., Soares, M. J. D. S., Silva-Júnior, A., & Schwarz, D. G. G. (2022). Geographical and temporal spread of equine rabies in Brazil. *Acta tropica*, 227, 106302. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106302>

323. Ondřejková, A., Süli, J., Ondrejka, R., Slepecká, E., Prokeš, M., Čechvala, P., & Supuka, P. (2015). Detection of rabies antibodies in dog sera. *Polish journal of veterinary sciences*, *18*(1), 47–51. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2015-0006>
324. Orłowska, A., & Żmudziński, J. F. (2014). Molecular epidemiology of rabies virus in Poland. *Archives of virology*, *159*(8), 2043–2050. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2045-z>
325. Ortega-Sánchez, R., Bárcenas-Reyes, I., Cantó-Alarcón, G. J., Luna-Cozar, J., E, R. A., Contreras-Magallanes, Y. G., González-Ruiz, S., Cortez-García, B., & Milián-Suazo, F. (2022). Descriptive and Time-Series Analysis of Rabies in Different Animal Species in Mexico. *Frontiers in veterinary science*, *9*, 800735. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.800735>
326. Paris, S., Chapat, L., Martin-Cagnon, N., Durand, P. Y., Piney, L., Cariou, C., Bergamo, P., Bonnet, J. M., Poulet, H., Freyburger, L., & De Luca, K. (2020). β -Glucan as Trained Immunity-Based Adjuvants for Rabies Vaccines in Dogs. *Frontiers in immunology*, *11*, 564497. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.564497>
327. Parker, A. R., Lock, E., Iftikhar, A., Barber, R., Stubbs, P. D., Harding, S., & Wallis, G. L. (2017). Purification and characterisation of anti-pneumococcal capsular polysaccharide IgG immunoglobulins. *Clinical biochemistry*, *50*(1-2), 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.08.009>
328. Perosa, F., Carbone, R., Ferrone, S., & Dammacco, F. (1990). Purification of human immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate. *Journal of immunological methods*, *128*(1), 9–16. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(90\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0022-1759(90)90458-8)
329. Perrin, P., Jacob, Y., Desmézières, E., & Tordo, N. (2000). DNA-based immunisation against rabies and rabies-related viruses: towards multivalent vaccines. *Developments in biologicals*, *104*, 151–157.

330. Petersdorf, E. W., & Hansen, J. A. (1995). A comprehensive approach for typing the alleles of the HLA-B locus by automated sequencing. *Tissue antigens*, *46*(2), 73–85. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1995.tb02482.x>
331. Picard-Meyer, E., Bruyère, V., Barrat, J., Tissot, E., Barrat, M. J., & Cliquet, F. (2004). Development of a hemi-nested RT-PCR method for the specific determination of European Bat Lyssavirus 1. Comparison with other rabies diagnostic methods. *Vaccine*, *22*(15-16), 1921–1929. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.11.015>
332. Picard-Meyer, E., Robardet, E., Moroz, D., Trotsenko, Z., Drozhzhe, Z., Biarnais, M., Solodchuk, V., Smreczak, M., & Cliquet, F. (2012). Molecular epidemiology of rabies in Ukraine. *Archives of virology*, *157*(9), 1689–1698. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1351-6>
333. Pickle, L. W. (2009). A history and critique of U.S. mortality atlases. *Spatial and spatio-temporal epidemiology*, *1*(1), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.sste.2009.07.004>
334. Polupan, I.M., Nedosekov, V.V., Stepanova, T.V., Rudoi, O.V., Parshikova, A.V., Drozdova, E.I. (2021). Molecular characteristics isolates of rabies virus isolated from humans in Ukraine. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, *677*, 042025. doi:10.1088/1755-1315/677/4/042025
335. Polupan, I., Bezymennyi, M., Gibaliuk, Y., Drozhzhe, Z., Rudoi, O., Ukhovskiy, V., Nedosekov, V., & De Nardi, M. (2019). An Analysis of Rabies Incidence and Its Geographic Spread in the Buffer Area Among Orally Vaccinated Wildlife in Ukraine From 2012 to 2016. *Frontiers in veterinary science*, *6*, 290. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00290>
336. Polupan, I., Bezymennyi, M., Golik, M., Drozhzhe, Z., Nychyk, S., & Nedosekov, V. (2017). Spatial and temporal patterns of enzootic rabies on the territory of Chernihiv oblast of Ukraine. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*, *3*, Iss. 2, 31-36.
337. Polupan, I., Hibaliuk, Yu., Rudoi, O., Dzyuba, Ya. (2019). Antigenic Activity of Oral Rabies Vaccines for Rabies Vaccination of Wild Carnivorous

- Animals. *Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (p. 212). 20-24 травня, 2019, Київ, Україна.
338. Polupan, I.M., Mazur, M., Mazur, N., Nikitova, A., Nychyk, S.A. (2016). Studies of bat lyssaviruses by RT-PCR. *CBEP Ukraine research forum and peerreview session* (p. 69). 4–8 квітня, 2016, Київ, Україна.
339. Praveena, P. E., Jayakumar, R., Balachandran, C., Thirumurugan, G., Raj, G. D., & Manohar, B. M. (2007). Detection of rabies virus genes by in-situ polymerase chain reaction. *Veterinary research communications*, 31(6), 775–781. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-3492-8>
340. Pryor, R. J., & Wittwer, C. T. (2006). Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 336, 19–32. <https://doi.org/10.1385/1-59745-074-X:19>
341. Pyne, A., Chatterjee, K., & Suryanarayanan, R. (2003). Solute crystallization in mannitol-glycine systems--implications on protein stabilization in freeze-dried formulations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 92(11), 2272–2283. <https://doi.org/10.1002/jps.10487>
342. Rabies hyperimmune serum. (1974). *The Journal of the Oklahoma State Medical Association*, 67(7), 286.
343. Rainham, D., McDowell, I., Krewski, D., & Sawada, M. (2010). Conceptualizing the healthscape: contributions of time geography, location technologies and spatial ecology to place and health research. *Social science & medicine* (1982), 70(5), 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.socscimed.2009.10.035>
344. Real, L. A., Russell, C., Waller, L., Smith, D., & Childs, J. (2005). Spatial dynamics and molecular ecology of North American rabies. *The Journal of heredity*, 96(3), 253–260. <https://doi.org/10.1093/jhered/esi031>
345. Redwan, el-R. M., Fahmy, A., El Hanafy, A., Abd El-Baky, N., & Sallam, S. M. (2009). Ovine anti-rabies antibody production and evaluation. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 32(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.11.004>

346. Regea, G. (2017). Review on economic importance's of rabies in developing countries and its controls. *Archives of Preventive Medicine*, 2(1), 15–21.
347. *Regulation (EU) No 576/2013 of the European Parliament and of the Council of 12 June 2013 on the non-commercial movement of pet animals and repealing Regulation (EC) No 998/2003 Text with EEA relevance.* (2013). Вилучено з <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2013/576/oj>
348. Robardet, E., Smreczak, M., Orłowska, A., Malik, P., Nándori, A., Dirbáková, Z., Jerg, S., Rudoi, O., Polupan, I., Groza, O., Arseniev, S., Barbuceanu, F., Vuta, V., Picard-Meyer, E. (2023). Two sylvatic rabies re-emergences in Central-Eastern Europe over the 2021-2022 period: an unprecedented situation in recent years. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023. Article ID 5589201. doi:10.1155/2023/5589201
349. Robert, J. Kirsch (2006). *The International Accounting Standards Committee: A Political History*. U.K.: Wolters Kluwer Ltd.
350. Rohde, R. E., Neill, S. U., Clark, K. A., & Smith, J. S. (1997). Molecular epidemiology of rabies epizootics in Texas. *Clinical and diagnostic virology*, 8(3), 209–217. [https://doi.org/10.1016/s0928-0197\(97\)10003-4](https://doi.org/10.1016/s0928-0197(97)10003-4)
351. Roossinck, M. J. (1997). Mechanisms of plant virus evolution. *Annual review of phytopathology*, 35, 191–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.191>
352. Rudd, R. J., & Trimarchi, C. V. (1987). Comparison of sensitivity of BHK-21 and murine neuroblastoma cells in the isolation of a street strain rabies virus. *Journal of clinical microbiology*, 25(8), 1456–1458. <https://doi.org/10.1128/jcm.25.8.1456-1458.1987>
353. Rudd, R. J., Appler, K. A., & Wong, S. J. (2013). Presence of cross-reactions with other viral encephalitides in the indirect fluorescent-antibody test for diagnosis of rabies. *Journal of clinical microbiology*, 51(12), 4079–4082. <https://doi.org/10.1128/JCM.01818-13>

354. Rudd, R. J., Smith, J. S., Yager, P. A., Orciari, L. A., & Trimarchi, C. V. (2005). A need for standardized rabies-virus diagnostic procedures: effect of cover-glass mountant on the reliability of antigen detection by the fluorescent antibody test. *Virus research*, *111*(1), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.03.014>
355. Rudd, R. J., Trimarchi, C. V., & Abelseth, M. K. (1980). Tissue culture technique for routine isolation of street strain rabies virus. *Journal of clinical microbiology*, *12*(4), 590–593. <https://doi.org/10.1128/jcm.12.4.590-593.1980>
356. Rudoi, O., Dziuba, Ya., Polupan, I. (2021). Impact of temperature of storage of blood sera on titers of antibodies to rabies virus. *International Biothreat Reduction Symposium* (р. 77 дослідження л). 29 червня – 2 липня, 2021, Київ, Україна.
357. Rudoi, O., Hibaliuk, Yu., Polupan, I. (2022). Description of Threshold Positive Values of Titers of Anti-rabies Antibodies in the Assessment of the Efficacy of Oral Vaccination of Wild Carnivorous Animals. *BTRP Ukraine. 2022 International Biothreat Reduction Symposium* (р. 122). 24-27 жовтня, 2022, Київ, Україна.
358. Rupprecht, C. E., & Dietzschold, B. (2017). Special Issue: Rabies Symptoms, Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment. *Tropical medicine and infectious disease*, *2*(4), 59. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2040059>
359. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., Abela-Ridder, B., & World Health Organization. (2018). *Laboratory techniques in rabies*, Volume 1. World Health Organization: Geneva, Switzerland.
360. Rupprecht, C. E., Fooks, A. R., Abela-Ridder, B., & World Health Organization. (2019). *Laboratory techniques in rabies*, Volume 2. World Health Organization: Geneva, Switzerland.
361. Rupprecht, C. E., Hanlon, C. A., & Slate, D. (2004). Oral vaccination of wildlife against rabies: opportunities and challenges in prevention and control. *Developments in biologicals*, *119*, 173–184.

362. Rupprecht, C. E., Mshelbwala, P. P., Reeves, R. G., & Kuzmin, I. V. (2023). Rabies in a postpandemic world: resilient reservoirs, redoubtable riposte, recurrent roadblocks, and resolute recidivism. *Animal diseases*, 3(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s44149-023-00078-8>
363. Rupprecht, C. E., Xiang, Z., Servat, A., Franka, R., Kirby, J., & Ertl, H. C. J. (2018). Erratum: Rupprecht, C.E., et al. Additional Progress in the Development and Application of a Direct, Rapid Immunohistochemical Test for Rabies Diagnosis. *Vet. Sci.* 2018, 5, 59. *Veterinary sciences*, 5(3), 68. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030068>
364. Rusinko, J., & McPartlon, M. (2017). Species tree estimation using Neighbor Joining. *Journal of theoretical biology*, 414, 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2016.11.005>
365. Russo, C. A., Takezaki, N., & Nei, M. (1996). Efficiencies of different genes and different tree-building methods in recovering a known vertebrate phylogeny. *Molecular biology and evolution*, 13(3), 525–536. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025613>
366. Rzhetsky, A., & Nei, M. (1995). Tests of applicability of several substitution models for DNA sequence data. *Molecular biology and evolution*, 12(1), 131–151. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040182>
367. Sacramento, D., Bourhy, H., & Tordo, N. (1991). PCR technique as an alternative method for diagnosis and molecular epidemiology of rabies virus. *Molecular and cellular probes*, 5(3), 229–240. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(91\)90045-1](https://doi.org/10.1016/0890-8508(91)90045-1)
368. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
369. Santos, L. B., Guedes, F., Achkar, S. M., Duarte, M. I. S., Katz, I. S. S., Silva, S. R., & Fernandes, E. R. (2020). Characterization of the Th17 profile immune response in cases of human rabies transmitted by dogs and its

- interference in the disease pathogenesis. *Journal of neuroimmunology*, 344, 577263. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577263>
370. Sarker, S. A., Casswall, T. H., Juneja, L. R., Hoq, E., Hossain, I., Fuchs, G. J., & Hammarström, L. (2001). Randomized, placebo-controlled, clinical trial of hyperimmunized chicken egg yolk immunoglobulin in children with rotavirus diarrhea. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 32(1), 19–25. <https://doi.org/10.1097/00005176-200101000-00009>.
371. Sartorius, B., Kahn, K., Vounatsou, P., Collinson, M. A., & Tollman, S. M. (2010). Space and time clustering of mortality in rural South Africa (Agincourt HDSS), 1992-2007. *Global health action*, 3, 10.3402/gha.v3i0.5225. <https://doi.org/10.3402/gha.v3i0.5225>
372. Sayers, E. W., & Karsch-Mizrachi, I. (2016). Using GenBank. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1374, 1–22. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3167-5_1
373. Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Sherry, S. T., Yankie, L., & Karsch-Mizrachi, I. (2023). GenBank 2024 Update. *Nucleic acids research*, gkad903. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad903>
374. Schatz, J., Fooks, A. R., McElhinney, L., Horton, D., Echevarria, J., Vázquez-Moron, S., Kooi, E. A., Rasmussen, T. B., Müller, T., & Freuling, C. M. (2013). Bat rabies surveillance in Europe. *Zoonoses and public health*, 60(1), 22–34. <https://doi.org/10.1111/zph.12002>
375. Schatz, J., Teifke, J. P., Mettenleiter, T. C., Aue, A., Stiefel, D., Müller, T., & Freuling, C. M. (2014). Lyssavirus distribution in naturally infected bats from Germany. *Veterinary microbiology*, 169(1-2), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.004>
376. Schneider, M. D., & Furusho, Y. (1966). Immunofluorescence study of wild rabies virus and antibody. *Canadian journal of comparative medicine and veterinary science*, 30(5), 129–141.

377. Schuster P. (2018). Molecular evolution between chemistry and biology : The interplay of competition, cooperation, and mutation. *European biophysics journal : EBJ*, 47(4), 403–425. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1281-7>
378. Schwartz, D. (1966). Research methods in epidemiology. Les méthodes de recherche en épidémiologie. *Bulletin de l'Institut national de la sante et de la recherche medicale*, 21(1), 25–31.
379. Segovia, M., & Garcia-Alfaro, J. (2022). Design, Modeling and Implementation of Digital Twins. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 22(14), 5396. <https://doi.org/10.3390/s22145396>
380. Selhorst, T., Müller, T., Schwermer, H., Ziller, M., Schlüter, H., Breitenmoser, U., Müller, U., Brochier, B., Pastoret, P. P., & Mutinelli, F. (2005). Use of an area index to retrospectively analyze the elimination of fox rabies in European countries. *Environmental management*, 35(3), 292–302. <https://doi.org/10.1007/s00267-003-3055-x>
381. Selimov, M. A. (1972). Nekotorye osobennosti sovremennoï épizootologii i épideimiologii beshenstva [Characteristics of present-day epizootiology and epidemiology of rabies]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*, 49(11), 129–138.
382. Shelke, P., & Rachh, P. R. (2019). Equine Rabies Immunoglobulin: A Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(4-s), 730-735. <https://doi.org/10.22270/jddt.v9i4-s.3388>
383. Shi, L., Cao, S., Wu, X. Li, J., Wang, Y., Yu, Y., Li, Y. (2016). A collaborative study to establish the 6th national standard for anti-Rabies Immunogloblin in China. *J. Appl. Virol.*, 5(2):21. doi:10.21092/jav.v5i2.76
384. Shi, W., Kou, Y., Xiao, J., Zhang, L., Gao, F., Kong, W., Su, W., Jiang, C., & Zhang, Y. (2018). Comparison of immunogenicity, efficacy and transcriptome changes of inactivated rabies virus vaccine with different adjuvants. *Vaccine*, 36(33), 5020–5029. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.07.006>

385. Shiraishi, R., Nishimura, M., Nakashima, R., Enta, C., & Hirayama, N. (2014). Neutralizing antibody response in dogs and cats inoculated with commercial inactivated rabies vaccines. *The Journal of veterinary medical science*, 76(4), 605–609. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0335>
386. Shwiff, S., Hampson, K., & Anderson, A. (2013). Potential economic benefits of eli-minating canine rabies. *Antiviral Research*, 98(2), 352–356.
387. Silva, S. R., Katz, I. S., Mori, E., Carnieli, P., Jr, Vieira, L. F., Batista, H. B., Chaves, L. B., & Scheffer, K. C. (2013). Biotechnology advances: a perspective on the diagnosis and research of Rabies Virus. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 41(4), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.04.002>
388. Silverman, B.W. (1986) *Density Estimation for Statistics and Data Analysis*. Chapman & Hall, London. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-3324-9>
389. Sindi N. (2023). Evaluation of the efficacy of vitamin C on the immune response after rabies virus vaccine in BALB/c mice. *European review for medical and pharmacological sciences*, 27(5), 1808–1815. https://doi.org/10.26355/eurrev_202303_31542
390. Sitthi-Amorn, C., Jiratanavattana, V., Keoyoo, J., & Sonpunya, N. (1987). The diagnostic properties of laboratory tests for rabies. *International journal of epidemiology*, 16(4), 602–605. <https://doi.org/10.1093/ije/16.4.602>
391. Sloan, D. B., Warren, J. M., Williams, A. M., Kuster, S. A., & Forsythe, E. S. (2023). Incompatibility and Interchangeability in Molecular Evolution. *Genome biology and evolution*, 15(1), evac184. <https://doi.org/10.1093/gbe/evac184>
392. Smith, J., McElhinney, L. M., Heaton, P. R., Black, E. M., & Lowings, J. P. (2000). Assessment of template quality by the incorporation of an internal control into a RT-PCR for the detection of rabies and rabies-related viruses. *Journal of virological methods*, 84(2), 107–115. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00124-x](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00124-x)

393. Snyder L. R. (1970). Adsorption chromatography. *Methods in medical research*, 12, 1.
394. Stallones, R. A. (1980). To advance epidemiology. *Annual review of public health*, 1, 69–82. <https://doi.org/10.1146/annurev.pu.01.050180.000441>
395. Steck, F., Wandeler, A., Bichsel, P., Capt, S., Häfliger, U., & Schneider, L. (1982). Oral immunization of foxes against rabies. Laboratory and field studies. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 5(1-3), 165–171. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(82\)90031-5](https://doi.org/10.1016/0147-9571(82)90031-5)
396. Strady, A., Lang, J., Lienard, M., Blondeau, C., Jaussaud, R., & Plotkin, S. A. (1998). Antibody persistence following preexposure regimens of cell-culture rabies vaccines: 10-year follow-up and proposal for a new booster policy. *The Journal of infectious diseases*, 177(5), 1290–1295. <https://doi.org/10.1086/515267>
397. Suárez-Díaz E. (2016). Molecular Evolution in Historical Perspective. *Journal of molecular evolution*, 83(5-6), 204–213. <https://doi.org/10.1007/s00239-016-9772-6>
398. Sun, L. J., Xu, G. L., Wang, H. L., Wu, J., Hu, Z. H., & Zhou, Y. W. (2007). *Fa yi xue za zhi*, 23(6), 411–413.
399. Sun, S., Mo, W., Ji, Y., & Liu, S. (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 15(9), 708–712. <https://doi.org/10.1002/rcm.271>
400. Susan, M. Moore. (2015). *Rabies serology: relationship between assay type, interpretation, and application of results* (dissertation PhD.). Kansas. USA.
401. Suzuki, K., Pereira, J. A., López, R., Morales, G., Rojas, L., Mutinelli, L. E., & Pons, E. R. (2007). Descriptive spatial and spatio-temporal analysis of the 2000-2005 canine rabies endemic in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Acta tropica*, 103(3), 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.06.003>

402. Szlachta, H. L., & Habel, R. E. (1953). Inclusions resembling Negri bodies in the brains of nonrabid cats. *The Cornell veterinarian*, 43(2), 207–212.
403. Tajima F. (1993). Unbiased estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*, 10(3), 677–688. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040031>
404. Tajima, F., & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*, 1(3), 269–285. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040317>
405. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1596–1599. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>
406. Tantawichien, T., & Rupprecht, C. E. (2020). Modern biologics for rabies prophylaxis and the elimination of human cases mediated by dogs. *Expert opinion on biological therapy*, 20(11), 1347–1359. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1766021>
407. *Target Animal Safety for Veterinary Pharmaceutical Products. VICH GL 43. Pharmaceuticals*. (2009). London. UK.
408. Tepsumethanon, V., Lumlertdacha, B., Mitmoonpitak, C., Fagen, R., & Wilde, H. (1997). Fluorescent antibody test for rabies: prospective study of 8,987 brains. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 25(6), 1459–1461. <https://doi.org/10.1086/516151>
409. *The International Pharmacopoeia. Fourth Edition (incl. First and Second Supplements)*. (2011). Вилучено з <http://apps.who.int/phint/en/p/about>
410. Thulke, H. H., Tischendorf, L., Staubach, C., Selhorst, T., Jeltsch, F., Müller, T., Schlüter, H., & Wissel, C. (1999). The spatio-temporal dynamics of a post-vaccination resurgence of rabies in foxes and emergency vaccination

- planning. *Preventive veterinary medicine*, 47(1-2), 1–21.
[https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(00\)00167-7](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(00)00167-7)
411. Tippmann H. F. (2004). Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Briefings in bioinformatics*, 5(1), 82–87.
<https://doi.org/10.1093/bib/5.1.82>
412. Tomas, J. A. (2017). *epitools: Epidemiology Tools. R package version 0.5–9*. Вилучено з <http://CRAN.R-project.org/package=epitools>
413. Tordo, N., Bahloul, C., Jacob, Y., Jallet, C., Perrin, P., & Badrane, H. (2006). Rabies: epidemiological tendencies and control tools. *Developments in biologicals*, 125, 3–13.
414. Trimarchi, C. V., & Debbie, J. G. (1972). Standardization and quantitation of immunofluorescence in the rabies fluorescent-antibody test. *Applied microbiology*, 24(4), 609–612. <https://doi.org/10.1128/am.24.4.609-612.1972>
415. Trimarchi, C. V., & Debbie, J. G. (1974). Production of rabies fluorescent conjugate by immunization of rabbits with purified rabies antigen. *Bulletin of the World Health Organization*, 51(5), 447–449.
416. Troupin, C., Picard-Meyer, E., Dellicour, S., Casademont, I., Kergoat, L., Lepelletier, A., Dacheux, L., Baele, G., Monchâtre-Leroy, E., Cliquet, F., Lemey, P., & Bourhy, H. (2017). Host Genetic Variation Does Not Determine Spatio-Temporal Patterns of European Bat 1 Lyssavirus. *Genome biology and evolution*, 9(11), 3202–3213. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx236>
417. Tscheliessnig, A., Satzer, P., Hammerschmidt, N., Schulz, H., Helk, B., & Jungbauer, A. (2014). Ethanol precipitation for purification of recombinant antibodies. *Journal of biotechnology*, 188, 17–28.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.07.436>
418. Ulloa-Stanojlovic, F. M., & Dias, R. A. (2020). Spatio-temporal description of bovine rabies cases in Peru, 2003-2017. *Transboundary and emerging diseases*, 67(4), 1688–1696. <https://doi.org/10.1111/tbed.13512>

419. Um, J., Chun, B. C., Lee, Y. S., Hwang, K. J., Yang, D. K., Park, J. S., & Kim, S. Y. (2017). Development and evaluation of an anti-rabies virus phosphoprotein-specific monoclonal antibody for detection of rabies neutralizing antibodies using RFFIT. *PLoS neglected tropical diseases*, *11*(12), e0006084. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006084>
420. Vasanth, J. P., Madhusudana, S. N., Abhilash, K. V., Suja, M. S., & Muhamuda, K. (2004). Development and evaluation of an enzyme immunoassay for rapid diagnosis of rabies in humans and animals. *Indian journal of pathology & microbiology*, *47*(4), 574–578.
421. Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2008). The history and evolution of human dengue emergence. *Advances in virus research*, *72*, 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00401-6)
422. Velander, L., Fogelberg, J., Putthana, V., Keosengthong, A., & Lindahl, J. F. (2022). Rabies Vaccination in Dogs in Laos: Owner Knowledge and Serological Status of Dogs. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *11*(1), 69. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010069>
423. Ver, B. A., Rao, S. S., & Jhala, H. I. (1962). Antigenic analysis of rabies fixed virus by gel diffusion technique. *Indian journal of pathology & bacteriology*, *5*, 131–136.
424. Vos, A. (2003). Oral vaccination against rabies and the behavioural ecology of the red fox (*Vulpes vulpes*). *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, *50*(10), 477–483. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00712.x>
425. Wandeler, A. I. (2006). Rabies vaccinology and immunology. *Developments in biologicals*, *125*, 181–184.
426. Wandeler, A. (1997). Laboratory Techniques in Rabies, 4th ed. *The Canadian Veterinary Journal*, *38*(7), 457–458.
427. Warner, C. K., Whitfield, S. G., Fekadu, M., & Ho, H. (1997). Procedures for reproducible detection of rabies virus antigen mRNA and

- genome in situ in formalin-fixed tissues. *Journal of virological methods*, 67(1), 5–12. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00068-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00068-2)
428. Wasniewski, M., & Cliquet, F. (2012). Evaluation of ELISA for detection of rabies antibodies in domestic carnivores. *Journal of virological methods*, 179(1), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.10.019>
429. Wasniewski, M., Barrat, J., Fooks, A. R., Franka, R., Müller, T., Sabeta, C., & Cliquet, F. (2017). Production and calibration of the second batch of OIE anti-rabies positive reference serum. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 36(3), 779–788. <https://doi.org/10.20506/rst.36.3.2713>
430. Wasniewski, M., Guiot, A. L., Schereffer, J. L., Tribout, L., Mähar, K., & Cliquet, F. (2013). Evaluation of an ELISA to detect rabies antibodies in orally vaccinated foxes and raccoon dogs sampled in the field. *Journal of virological methods*, 187(2), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.11.022>
431. Wasniewski, M., Laurentie, M., Rizzo, F., Servat, A., Aubert, M., & Cliquet, F. (2019). Proficiency test for rabies serology: A design complying with international standards for a reliable assessment of participating laboratories. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(12), e0007824. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007824>
432. Webster L. T. (1936). Diagnostic and Immunological Tests of Rabies in Mice. *American journal of public health and the nation's health*, 26(12), 1207–1210. <https://doi.org/10.2105/ajph.26.12.1207>
433. Webster, L.T. (1936). Diagnostic and Immunological Tests of Rabies in Mice. *American journal of public health and the nation's health*, 26(12), 1207–1210. <https://doi.org/10.2105/ajph.26.12.1207>
434. Whelan W. J. (2001). Partition chromatography revisited. *IUBMB life*, 51(5), 329–330. <https://doi.org/10.1080/152165401317190851>
435. Whitby, J. E., Heaton, P. R., Black, E. M., Wooldridge, M., McElhinney, L. M., & Johnstone, P. (2000). First isolation of a rabies-related virus from a

- Daubenton's bat in the United Kingdom. *The Veterinary record*, 147(14), 385–388. <https://doi.org/10.1136/vr.147.14.385>
436. Whitby, J. E., Heaton, P. R., Whitby, H. E., O'Sullivan, E., & Johnstone, P. (1997). Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of virological methods*, 69(1-2), 63–72. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00143-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00143-2)
437. Whitfield, S. G., Fekadu, M., Shaddock, J. H., Niezgoda, M., Warner, C. K., Messenger, S. L., & Rabies Working Group (2001). A comparative study of the fluorescent antibody test for rabies diagnosis in fresh and formalin-fixed brain tissue specimens. *Journal of virological methods*, 95(1-2), 145–151. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(01\)00304-4](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(01)00304-4)
438. Whitlam, J. B., & Brown, K. F. (1981). Ultrafiltration in serum protein binding determinations. *Journal of pharmaceutical sciences*, 70(2), 146–150. <https://doi.org/10.1002/jps.2600700208>
439. Wiktor, T. J., Kamo, I., & Koprowski, H. (1974). In vitro stimulation of rabbit lymphocytes after immunization with live and inactivated rabies vaccines. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 112(6), 2013–2019.
440. Wilde, H., & Chutivongse, S. (1990). Equine rabies immune globulin: a product with an undeserved poor reputation. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 42(2), 175–178. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.175>
441. Wilde, H., Chomchey, P., Prakongsri, S., Puyaratabandhu, P., & Chutivongse, S. (1989). Adverse effects of equine rabies immune globulin. *Vaccine*, 7(1), 10–11. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(89\)90003-0](https://doi.org/10.1016/0264-410x(89)90003-0)
442. Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 4(11), 1120–1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300662>
443. Willer, H., & Müller, I. (1967). Beitrag zum gegenwärtigen Stand der Biologischen Statistik in der Veterinärmedizin [The latest developments of

- biological statistics in veterinary medicine]. *Monatshefte fur Veterinarmedizin*, 22(14), 561–563.
444. Williams, K. W., & Smith, R. C. (1975). Recent advances in column chromatography. *Progress in medicinal chemistry*, 12, 105–158. [https://doi.org/10.1016/s0079-6468\(08\)70175-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6468(08)70175-9)
445. Wilson, M. L., Bretsky, P. M., Cooper, G. H., Jr, Egbertson, S. H., Van Kruiningen, H. J., & Cartter, M. L. (1997). Emergence of raccoon rabies in Connecticut, 1991-1994: spatial and temporal characteristics of animal infection and human contact. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 57(4), 457–463. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.57.457>
446. Winzor D. J. (2000). From gel filtration to biosensor technology: the development of chromatography for the characterization of protein interactions. *Journal of molecular recognition : JMR*, 13(5), 279–298. [https://doi.org/10.1002/1099-1352\(200009/10\)13:5<279::AID-JMR506>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1099-1352(200009/10)13:5<279::AID-JMR506>3.0.CO;2-K)
447. Wolfe, K. H., & Li, W. H. (2003). Molecular evolution meets the genomics revolution. *Nature genetics*, 33 Suppl, 255–265. <https://doi.org/10.1038/ng1088>
448. World Health Organization (2018). *WHO Expert Consultation on Rabies. Third report. World Health Organization technical report series 1012*. Geneva, Switzerland
449. World Health Organization. (2013). *WHO Expert Consultation on Rabies. Second report. World Health Organization technical report series 982*. Geneva, Switzerland.
450. World Health Organizations. (2004). *Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. WHO Technical report series 932*. Geneva, Switzerland.
451. Worwood, M., Thorpe, S. J., Heath, A., Flowers, C. H., & Cook, J. D. (1991). Stable lyophilized reagents for the serum ferritin assay. *Clinical and*

- laboratory haematology*, 13(3), 297–305. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2257.1991.tb00285.x>
452. Wunderli, P. S., Dreesen, D. W., Miller, T. J., & Baer, G. M. (2003). Effect of heterogeneity of rabies virus strain and challenge route on efficacy of inactivated rabies vaccines in mice. *American journal of veterinary research*, 64(4), 499–505. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.499>
453. Wunderli, P. S., Shaddock, J. H., Schmid, D. S., Miller, T. J., & Baer, G. M. (1991). The protective role of humoral neutralizing antibody in the NIH potency test for rabies vaccines. *Vaccine*, 9(9), 638–642. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(91\)90188-c](https://doi.org/10.1016/0264-410x(91)90188-c)
454. Wunner, W. H., Dietzschold, B., Curtis, P. J., & Wiktor, T. J. (1983). Rabies subunit vaccines. *The Journal of general virology*, 64 (Pt 8), 1649–1656. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-8-1649>
455. Xu, G., Weber, P., Hu, Q., Xue, H., Audry, L., Li, C., Wu, J., & Bourhy, H. (2007). A simple sandwich ELISA (WELYSSA) for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens using mouse monoclonal antibodies. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 35(4), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2006.10.002>
456. Xu, G., Weber, P., Hu, Q., Xue, H., Audry, L., Li, C., Wu, J., & Bourhy, H. (2008). WELYSSA: a simple tool using mouse monoclonal antibodies for the detection of lyssavirus nucleocapsid in rabies suspected specimens. *Developments in biologicals*, 131, 555–561.
457. Yakobson, B., Taylor, N., Dveres, N., Rozenblut, S., Tov, B. E., Markos, M., Gallon, N., Homer, D., & Maki, J. (2015). Cattle rabies vaccination--A longitudinal study of rabies antibody titres in an Israeli dairy herd. *Preventive veterinary medicine*, 121(1-2), 170–175. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.05.004>
458. Yang, F., Lin, S., Ye, F., Yang, J., Qi, J., Chen, Z., Lin, X., Wang, J., Yue, D., Cheng, Y., Chen, Z., Chen, H., You, Y., Zhang, Z., Yang, Y., Yang,

- M., Sun, H., Li, Y., Cao, Y., Yang, S., ... Lu, G. (2020). Structural Analysis of Rabies Virus Glycoprotein Reveals pH-Dependent Conformational Changes and Interactions with a Neutralizing Antibody. *Cell host & microbe*, 27(3), 441–453.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.12.012>
459. Yang, L. M., Zhao, L. Z., Hu, R. L., Shi, Z. S., & Liu, W. J. (2006). A novel double-antigen sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for Measurement of Antibodies against rabies virus. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 13(8), 966–968. <https://doi.org/10.1128/CVI.00102-06>
460. Yankowski, C., Kurup, D., Wirblich, C., & Schnell, M. J. (2023). Effects of adjuvants in a rabies-vectored Ebola virus vaccine on protection from surrogate challenge. *NPJ vaccines*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00615-z>
461. Yuan, R., Chen, X., Chen, Y., Gu, T., Xi, H., Duan, Y., Sun, B., Yu, X., Jiang, C., Liu, X., Wu, C., Kong, W., & Wu, Y. (2014). Preparation and diagnostic use of a novel recombinant single-chain antibody against rabies virus glycoprotein. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(4), 1547–1555. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5351-6>
462. Zaidman, G. W., & Billingsley, A. (1998). Corneal impression test for the diagnosis of acute rabies encephalitis. *Ophthalmology*, 105(2), 249–251. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(98\)92860-3](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(98)92860-3)
463. Zamudio, R. M., Garcia, J. G., Barboza, C. M., Rodrigues, A. C., de Arruda, T. S., Francisco, A. L. A., de Oliveira Fahl, W., Castilho, J. G., da Silva, M. C. C., & de Carvalho Ruthner Batista, H. B. (2021). Human embryonic kidney (HEK-293) cell line: An alternative for rabies virus diagnosis and research. *Journal of virological methods*, 294, 114195. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114195>
464. Zhang, H., Huang, J., Song, Y., Liu, X., Qian, M., Huang, P., Li, Y., Zhao, L., & Wang, H. (2022). Regulation of innate immune responses by rabies virus. *Animal models and experimental medicine*, 5(5), 418–429. <https://doi.org/10.1002/ame2.12273>

465. Zhang, J. N., Meng, Y. J., Bai, Y. H., Li, Y. F., Yang, L. Q., Shi, N. M., Han, H. X., Gao, J., Zhu, L. J., Li, S. P., Zhang, J., Zhao, Q. H., Wang, X. Q., Wei, J. S., Ren, L. M., Cao, C. H., Chen, C., Zhao, W., & Li, L. (2022). Rabies Virus Neutralizing Activity, Safety, and Immunogenicity of Recombinant Human Rabies Antibody Compared with Human Rabies Immunoglobulin in Healthy Adults. *Biomedical and environmental sciences : BES*, *35*(9), 782–791. <https://doi.org/10.3967/bes2022.103>
466. Zhang, M., Dong, S., Cheng, H., & Li, F. (2021). Spatio-temporal evolution of urban thermal environment and its driving factors: Case study of Nanjing, China. *PloS one*, *16*(5), e0246011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246011>
467. Zhang, W., Zheng, X., Cheng, N., Gai, W., Xue, X., Wang, Y., Gao, Y., Shan, J., Yang, S., & Xia, X. (2016). Isatis indigotica root polysaccharides as adjuvants for an inactivated rabies virus vaccine. *International journal of biological macromolecules*, *87*, 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.02.023>
468. Zhang, X., Calvert, R. A., Sutton, B. J., & Doré, K. A. (2017). IgY: a key isotype in antibody evolution. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *92*(4), 2144–2156. <https://doi.org/10.1111/brv.12325>
469. Zhang, X., Chelliappan, B., S, R., & Antonysamy, M. (2021). Recent Advances in Applications of Bioactive Egg Compounds in Nonfood Sectors. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, *9*, 738993. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.738993>
470. Zhao, H., Li, P., Bian, L., Zhang, W., Jiang, C., Chen, Y., Kong, W., & Zhang, Y. (2023). Immune Response of Inactivated Rabies Vaccine Inoculated via Intraperitoneal, Intramuscular, Subcutaneous and Needle-Free Injection Technology-Based Intradermal Routes in Mice. *International journal of molecular sciences*, *24*(17), 13587. <https://doi.org/10.3390/ijms241713587>

ДОДАТКИ

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**Монографії:**

1. **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Нікітова, А.П., Мазур, Н.В. (2017). Імунопрофілактика сказу в Україні. Херсон: Грінь Д.С. *(Здобувачем підготовлено аналіз літературних щодо особливостей вакцинопрофілактики сказу, оформлено ілюстративний матеріал, підготовлено монографію до друку).*
2. **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В., Рудой, О.В. (2021). Лабораторна діагностика сказу. Київ: ДНДІЛДВСЕ. *(Здобувачем підготовлено аналіз літератури та оформлено протоколи методів діагностики сказу РПФ, ПЛР, біологічною пробою. Представлено основи філогенетичного аналізу та висвітлені власні результати досліджень, підготовлено монографію до друку).*

Статті у наукових фахових виданнях України:

3. Недосєков, В.В., Нікітова, А.П., **Полупан, І.М.**, Ничик, С.А., Галка, І.В., Дрожже, Ж.М., Іванов, М.Ю. (2014). Особливості формування антирабічного імунітету у вакцинованих тварин. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія», 25. 71-75. (Здобувачем здійснені серологічні дослідження та їх аналіз).*
4. Mazur, N., Nedosekov, V., **Polupan, I.** (2015). The Role of the FAT in Laboratory Diagnosis of Rabies. *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія», 26. 232-237. (Здобувачем проведено аналіз літератури та обрахунок кількості досліджень з підозрою на сказ різними методами).*
5. Мазур, Н.В., Мазур, М.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2015). Застосування імуностимулюючих препаратів за антирабічної вакцинації. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія», 27. 190–197. (Здобувачем*

- здійснені підбір препаратів, серологічні дослідження, їх аналіз та математичні обрахунки).
6. Голік, М.О., Недосєков, В.В., Карловська, К.П., **Полупан, І.М.** (2015). Характеристика епізоотичної ситуації зі сказу в Україні. *Тваринництво України*, 9. 16–19. (Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації, підготовлено карти напруженості та підготовлено статтю до друку).
 7. Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., **Полупан, І.М.** (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 28. 158–165. (Здобувачем здійснено гіперімунізацію тварин, проведено серологічні дослідження і підготовлено статтю до друку).
 8. Ничик, С.А., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Хоменко, Я.В., Спиридонов, В.Г. (2016). Чутливість та специфічність антирабічних глобулінів, отриманих на основі Ig Y з перепелиних яєць. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 29. 196–204. (Здобувачем здійснено підготовку антигену для гіперімунізації перепілок, проведено серологічні дослідження і дослідження мазків-відбитків в РППФ, підготовлено статтю до друку).
 9. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Підбір кріопротекторного середовища для ліофілізації галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну з сироватки крові кролів. *Науково-технічний бюлетень науково-дослідного центру біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*, 5(1). 48–52. (Здобувачем здійснено аналіз літератури, підбір середовищ і серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).
 10. Мазур, М.В., **Полупан, І.М.** (2017). Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України. *Бюлетень «Ветеринарна Біотехнологія»*, 30. 145–152. (Здобувачем здійснено підбір ізолятів вірусу сказу, постановку ЗТ-ПЛР, філогенетичний аналіз).

11. **Полупан, І.М.,** Мазур, Н.В., Недосєков, В.В. (2017). Калібрування галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові кролів. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 103.* 311–313. (Здобувачем здійснено аналіз порівняльні серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).
12. **Polupan, I.,** Bezymennyi, M., Golik, M., Drozhzhe, Z., Nychyk, S., & Nedosekov, V. (2017). Spatial and temporal patterns of enzootic rabies on the territory of Chernihiv oblast of Ukraine. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety, 3, 2,* 31-36. (Здобувачем сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).
13. Мазур, М.В., Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.** (2017). Видова характеристика епізоотії сказу в Україні за 2011 – 2016 рр. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького, 19. 73.* 159–162. (Здобувачем здійснено описово-статистичний аналіз прояву сказу в Україні).
14. **Полупан, І.М.,** Мазур, М.В., Голік, М.О., Недосєков, В.В. (2017). Антропургізація сказу в Україні. *Науковий вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва, 265.* 182–189. (Здобувачем здійснено аналіз прояву сказу в Україні, визначені основні вектори і причини значного прояву сказу серед свійських тварин, підготовлено статтю до друку).
15. **Полупан, І.М.,** Дрожже, Ж.М., Гібалюк, Ю.О., Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи антирабічних заходів в Україні. *Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету, 1-2 (47).* 149–152. (Здобувачем проведені аналіз літератури, епізоотологічні дослідження, визначені методичні основи повітряного розподілу вакцини для пероральної вакцинації диких тварин проти сказу, підготовлено статтю до друку).

- 16.Дзюба, Я.М., Рудой, О.В., **Полупан, І.М.** (2018). Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих домашніх м'ясоїдних тварин. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 104.* 382–385. (Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).
- 17.Маковська, І.Ф., Недосєков, В.В., **Полупан, І.М.**, Латманізова, Т.С. (2018). Аналіз тренду поширення сказу котів в Україні. *НВ ЛНУ ветеринарної медицини та біотехнологій. Серія: Ветеринарні науки, 20(92),* 18–23. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9204> (Здобувачем проведено епізоотологічні дослідження, визначено основні причини прояву сказу серед котів).
- 18.Голік, М.О., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2018). Прогнозування епізоотії сказу в Чернігівській області на основі геоінформаційного аналізу. *Наукові доповіді НУБіП України, б. (76),* <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidi2018.06.025> (Здобувачем здійснено короткостроковий прогноз розвитку епізоотичної аналіз на основі отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).
- 19.Рудой, О.В., Дзюба, Я.М., **Полупан, І.М.** (2019). Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина», 105.* 84–87. (Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).
- 20.Kornienko, L., Moroz, O., Mezhenky, A., Skorokhod, S., Datsenko, R., Karpulenko, M., **Polupan, I.**, Dzyuba, Y., Nedosekov, V., Makovskaya, I., Hibaliuk, Y., Sonko, M., Tsarenko, T., & Pishchanskyi, O. (2019). Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти сказу в Україні за період 1999-2018 рр. *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування, (3),* 90-109. <https://doi.org/10.31890/vtpp.2019.03.14>

- (Здобувачем здійснено описово-статистичний аналіз прояву сказу в Україні).
21. **Полупан, І.М.**, Рудой, О.В., Ложкіна, О.В., Павлунько, В.Г., Купневська, М.В., Теплих, Н.І., Кравченко, А.Л., Гібалюк, Ю.О. (2021). Оцінка ефективності пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу (2018-2020 рр.). *Бюлетень «Ветеринарна біотехнологія»*, 39. 96–107. doi:10.31073/vet_biotech39-09 (Здобувачем здійснено серологічні дослідження, аналіз отриманих даних і підготовку статтю до друку).
22. Полупан, І.М. (2021). Реакція прямої імунофлуоресценції в лабораторній діагностиці сказу тварин в Україні. *Міжвідомчий тематичний науковий збірник «Ветеринарна медицина»*, 107. 15–18. (Здобувачем проведено аналіз літератури, визначено особливості лабораторної діагностики сказу, підготовлено статтю до друку).
23. Рудой, О.В., Дрожже, Ж.М., Кардаш, О.В., Дедок, Л.А., **Полупан, І.М.** (2022). Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні. *Ветеринарна біотехнологія*, 40. 110–120. https://doi.org/10.31073/vet_biotech39-10 (Здобувачем визначено методичні основи проведення міжлабораторних порівняльних досліджень, проведено отримання і характеристика контрольних зразків, аналіз отриманих результатів і підготовлено статтю до друку).

Статті у наукових фахових виданнях інших держав, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

24. **Polupan, I.**, Bezymennyi, M., Gibaliuk, Y., Drozhzhe, Z., Rudoii, O., Ukhovskiy, V., Nedosekov, V., & De Nardi, M. (2019). An Analysis of Rabies Incidence and Its Geographic Spread in the Buffer Area Among Orally Vaccinated Wildlife in Ukraine From 2012 to 2016. *Frontiers in veterinary science*, 6, 290. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00290> (Здобувачем

сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).

25. **Polupan I.M.**, Nedosekov V.V., Stepanova T.V., Rudoi O.V., Parshikova A.V., Drozdova E.I. (2021). Molecular characteristics isolates of rabies virus isolated from humans in Ukraine. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.*, 677, 042025. doi:10.1088/1755-1315/677/4/042025 *(Здобувачем проведений відбір патологічного матеріалу, молекулярно-генетичні дослідження, філогенетичний аналіз, аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).*
26. Robardet, E., Smreczak, M., Orłowska, A., Malik, P., Nándori, A., Dirbáková, Z., Jerg, S., Rudoi, O., **Polupan, I.**, Groza, O., Arseniev, S., Barbuceanu, F., Vuta, V., Picard-Meyer, E. (2023). Two sylvatic rabies re-emergences in Central-Eastern Europe over the 2021-2022 period: an unprecedented situation in recent years. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2023. Article ID 5589201. doi:10.1155/2023/5589201 *(Здобувачем проведений збір зразків патологічного матеріалу, аналіз літератури та отриманих даних).*

Патенти:

27. Недосєков, В.В., **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Ничик, С.А. (2016). *Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові* (Патент України № 110313). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-110313-sposib-oderzhannya-antirabichno-giperimunno-sirovatki-krovi.html> *(Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).*
28. **Полупан, І.М.**, Мазур, Н.В., Недосєков, В.В., Ничик, С.А., Мазур, М.В., Нікітова, А.П. (2017). *Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну* (Патент України №118385). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-118385-sposib-otrimannya-galuzevogo-standartnogo-zrazka-antirabichnogo->

- immunoglobulinu.html (Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, дослідженнях, підготовці матеріалів до патентування).
29. Ничик, С.А., Мінцюк, Є.П., Полупан, І.М. (2023). Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу (Патент України № 153299). Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743463> (Здобувачем прийнято участь у розробці формули корисної моделі, культуральних дослідженнях та підготовці матеріалів до патентування).

Методичні рекомендації:

30. Дрожже, Ж.М., Недосєков В.В., Полупан, І.М. (2016). Методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин». Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем підготовлено протоколи методів дослідження антирабічного імунітету).
31. Мазур, М.В., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). Методичні рекомендації «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР». Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем підготовлено протоколи виявлення РНК вірусу сказу молекулярно-генетичними методами).
32. Мазур, М.В., Полупан, І.М., Мазур, Н.В., Нікітова, А.П., Недосєков, В.В. (2017). Методичні рекомендації «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин». Київ: ЦП КОМПРИНТ. (Здобувачем проведено аналіз літератури і підготовлено порядок проведення філогенетичного аналізу ізолятів вірусу сказу).
33. Полупан, І.М., Ничик, С.А., Недосєков, В.В., Кобаль, Б.І., Солодчук, В.Л., Шарай, Я.М., Хома, Ю.Б., Давиденко, О.Г., Гібалюк, Ю.О., Дрожже, Ж.М., Романенко, О.А. (2019). Методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу». Київ: ПП «Тім-Сервіс К». (Здобувачем проведений аналіз

літератури, визначені основні етапи проведення пероральної вакцинації диких тварин проти сказу та методи оцінки ефективності цього заходу).

34. Полупан І.М. (2023). *Методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу»*. Київ: Редакційно-видавничий відділ НУБІП. (Здобувачем проведений аналіз літератури, вірусологічні дослідження, підготовлено рекомендації до друку).

Тези наукових доповідей:

35. **Polupan, I.M., Mazur, M., Mazur, N., Nikitova, A., Nychuk, S.A.** (2016). Studies of bat lyssaviruses by RT-PCR. *СВЕР Ukraine research forum and peerreview session* (р. 69). 4–8 квітня, 2016, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження ізоляту вірусу сказу від кажана методом ЗТ-ПЛР).
36. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2016). Вибір тварин-продуцентів гіперімунної антирабічної сироватки. *Чотирнадцятий міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини* (с. 22–23). 6–7 жовтня, 2016, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено аналіз літератури та вибір тварин для гіперімунізації).
37. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2016). Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 44–46). 16 червня 2016, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено гіперімунізацію кролів та серологічні дослідження).
38. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Визначення специфічності та активності дослідних зразків флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в реакції прямої імунофлуоресценції. *XVI Міжнародна науково-практична конференція професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми*

- ветеринарної медицини» (с. 103–104). 19–20 квітня, 2017, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).
39. Mazur, N., **Polupan, I.**, Drozhzhe, Zh., Nedosekov, V., Nikitova, A. (2017). Comparison of the quality of brain tissue smears for the rabies immunofluorescence diagnosis, which were obtained by means of chemical or physical fixation. *CBEP Ukraine regional One Health research symposium and peerreview session* (p. 146). 24–28 квітня, 2017, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено підбір патологічного матеріалу і його дослідження в РППФ).
40. Мазур, Н.В., **Полупан, І.М.**, Недосєков, В.В. (2017). Підбір оптимальних умов кон'югації антирабічного імуноглобуліну з ФІТЦ. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 50–51). 22 червня, 2017, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).
41. **Полупан, І.**, Дрожже, Ж., Гібалюк, Ю., Мазур, М., Нікітова, А., Ничик, С. (2018). Епізоотологічна характеристика захворюваності тварин на сказ в Україні та прогноз епізоотичної ситуації. *Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (# 289, P. 76). 16-20 квітня, 2018, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації зі сказу).
42. **Polupan, I.**, Hibaliuk, Yu., Rudoi, O., Dzyuba, Ya. (2019). Antigenic Activity of Oral Rabies Vaccines for Rabies Vaccination of Wild Carnivorous Animals. *Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium* (P. 212). 20-24 травня, 2019, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).
43. Гібалюк, Ю.О., **Полупан, І.М.**, Шарай, Я.М. (2018). Удосконалення системи заходів профілактики сказу в Україні. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 28–30).

- 19 липня, 2018, Київ, Україна. (Здобувачем визначені методичні основи повітряного розподілу вакцини для пероральної вакцинації диких тварин проти сказу).
44. Дзюба, Я.М., Дрожже, Ж.М., Рудой, О.В., **Полупан, І.М.**, Гібалюк, Ю.О. (2019). Дослідження сироваток крові від диких лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу після пероральної вакцинації в 2018 р. *Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин»* (с. 19–20). 27 червня, 2019, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).
45. Rudoï, O., Dziuba, Ya., **Polupan, I.** (2021). Impact of temperature of storage of blood sera on titers of antibodies to rabies virus. *International Biothreat Reduction Symposium* (p. 77). 29 червня – 2 липня, 2021, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом FAVN).
46. Rudoï, O., Hibaliuk, Yu., **Polupan, I.** (2022). Description of Threshold Positive Values of Titers of Anti-rabies Antibodies in the Assessment of the Efficacy of Oral Vaccination of Wild Carnivorous Animals. *BTRP Ukraine. 2022 International Biothreat Reduction Symposium* (p. 122). 24-27 жовтня, 2022, Київ, Україна. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).
47. **Полупан, І.М.**, Радзиховський, М.Л., Дишкант, О.В. (2023). Особливості діагностики сказу. *Патоморфологія сьогодення. Збірник тез Міжнародної наукової конференції, присвяченої 125-річчю з часу заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України* (с. 44-45). 28–29 вересня, 2023, Київ, Україна. (Здобувачем здійснені моніторингові дослідження та їх аналіз).





ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110313** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
A61K 39/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2016 01723</p> <p>(22) Дата подання заявки: 24.02.2016</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.10.2016</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.10.2016, Бюл.№ 19</p>	<p>(72) Винахідник(и): Недосеков Віталій Володимирович (UA), Полупан Іван Миколайович (UA), Мазур Наталія Вікторівна (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АНТИРАБІЧНОЇ ГІПЕРІМУННОЇ СИРОВАТКИ КРОВІ**(57) Реферат:**

Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові полягає в чотирикратному комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в п'ять точок по 0,1 см³ і внутрішньом'язово в одну точку 0,5 см³ культурального антигену вірусу сказу, штаму Щолково-51 К, вироценого в культурі клітин ВНК-21/13 та інактивованого β-пропіолактоном. Інокуляція антигену для гіперімунізації здійснюється на 0 та 21 добу, після чого на 28 добу досліду проводиться відбір крові для визначення рівня антирабічних антитіл. За результатами дослідження для подальшої імунізації відбираються кролі з титрами вище 20 МО. Третя та четверта імунізації здійснюються на 35-у та 49-у добу відповідно, відбір крові та отримання специфічної сироватки - на 63-ю добу. В схемі гіперімунізації застосовується культуральний рабічний антиген концентрований ПЕГ (поліетиленгліколем) з молекулярною масою 6000 в кінцевій концентрації 6% та імуностимулюючий препарат "Фоспреніл" на 0, 21 та 49-у добу імунізації.

UA 110313 U





МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118385** (13) **U**
(51) МПК (2017.01)
С07К 16/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2017 00315</p> <p>(22) Дата подання заявки: 12.01.2017</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.08.2017</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2017, Бюл.№ 15</p>	<p>(72) Винахідник(и): Полупан Іван Миколайович (UA), Мазур Наталія Вікторівна (UA), Недосеков Віталій Володимирович (UA), Ничик Сергій Анатолійович (UA), Мазур Микола Вікторович (UA), Нікітова Аліна Петрівна (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)</p>
--	--

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ГАЛУЗЕВОГО СТАНДАРТНОГО ЗРАЗКА АНТИРАБІЧНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ**(57) Реферат:**

Спосіб отримання Галузевого стандартного зразка антирабічного імуноглобуліну включає ліофільне висушування розведеного в 10 разів фосфатно-сольовим буферним розчином (ФБС) концентрованого антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові гіперімунізованих кролів та калібрування його до Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (The 2nd International Standard for anti-rabies immunoglobulin, human). Як продуценти антирабічної сироватки використано кролів, а також індивідуально підібраний склад захисного середовища для ліофілізації із вмістом кріо-, ксеропротекторних і структуроутворюючих речовин. Калібрування зразка здійснено в реакції нейтралізації та білих мишах та у FAVN-тесті на культурі клітин.

UA 118385 U





УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **153299** (13) **U**
 (51) МПК
 A61K 39/205 (2006.01)
 C12N 1/02 (2006.01)
 C12R 1/93 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
 ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
 "УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
 ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
 ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2022 04522 (22) Дата подання заявки: 01.12.2022 (24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 15.06.2023 (46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 14.06.2023, Бюл.№ 24</p>	<p>(72) Винахідник(и): Ничик Сергій Анатолійович (UA), Мінцюк Євген Павлович (UA), Полупан Іван Миколайович (UA) (73) Володілець (володільці): ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ НААН УКРАЇНИ, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151 (UA)</p>
---	---

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ВІРУСУ СКАЗУ З ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ**(57) Реферат:**

Спосіб виділення польових ізолятів вірусу сказу з патологічного матеріалу включає етапи підготовки зразків, вирощування культури клітин, внесення дослідних зразків, заміни середовища, інкубування, фарбування та оцінки результатів шляхом виявлення специфічного світіння вірусу сказу в інфікованій культурі клітин шляхом люмінесцентної мікроскопії. При цьому для виділення інфекційного вірусу сказу з патологічного матеріалу застосовують систему *in vitro* - перещеплювану культуру клітин нейробластоми миші (C-1300, клон N2a).

UA 153299 U

Додаток В1 (1)

Перелік зразків патологічного матеріалу, що були визнані позитивними на сказ в РППФ регіональними лабораторіями ДПСС

№	Область	Вид	Дата постановки діагнозу	Номер / примітка
1	Івано-Франківська	собака	21.01.09	71
2		кіт	20.01.10	328
3		куниця	24.04.13	1325
4		тхір	24.04.13	1326
5		ВРХ	24.04.13	1327
6		куниця	24.04.13	1328
7		куниця	24.04.13	1329
8		шур	03.09.12	1319
9		кіт	06.09.12	1322
10		борсук	27.04.12	1314
11	Київська	куниця	14.07.11	1235
12		кіт	05.10.12	1324
13		кіт	18.05.12	1315
14		людина	01.10.11	1269
15		кіт	13.01.12	1309
16		кіт	14.01.12	1311
17		собака	12.01.12	1310
18	Закарпатська	лисиця	05.02.10	847
19		собака	18.02.10	848
20		куниця	26.06.10	849
21	Львівська	людина	07.10.09	173
22		собака	30.08.10	726
23		собака	03.03.11	1232
24	Харківська	кіт	30.11.09	602 вимушена вакцинація (G 52 Wistar)
25		кіт	16.03.10	652 вимушена вакцинація (G 52 Wistar)
26		кажан	22.07.10	684
27		кажан	19.08.11	1276
28		енотовидний собака	02.09.11	1278
29		лось	15.10.10	888
30		енотовидний собака	03.11.10	952
31		енотовидний собака	02.12.10	963
32		енотовидний собака	25.02.11	1242
33		Херсонська	ВРХ	04.04.09
34	ВРХ		13.04.09	112
35	енотовидний собака		14.10.09	200
36	Житомирська	собака	19.02.09	106
37		лисиця	15.03.09	108
38		лисиця	15.06.10	826
39		собака	18.08.10	834

Додаток В1 (2)

40	Миколаївська	кіт	15.10.10	248
41		кіт	15.10.10	250
42		кіт	26.10.09	249
43		енотовидний собака	06.04.10	482
44		куниця	01.06.10	738
45	Запорізька	лисиця	05.02.10	313
46		собака	15.02.10	317
47		коза	14.02.10	322
48	АР Крим	кіт	06.10.10	488
49		коза	23.12.10	491
50		ВРХ	05.01.10	503
51		собака	05.05.10	504
52		лисиця	24.12.09	490
53		лисиця	03.02.10	495
54		кіт	24.12.09	489
55		кіт	19.02.10	497
56		лисиця	21.01.10	493
57		куниця	14.04.10	500
58		Хмельницька	собака	13.02.09
59	лисиця		13.02.09	87
60	кіт		08.06.10.	575
61	собака		22.06.10	577
62	ВРХ		06.07.10	578
63	ВРХ		19.07.10	585
64	собака		13.02.10	81
65	собака		13.02.10	82
66	лисиця		13.02.10	83
67	кіт		13.02.10	85
68	собака	13.02.10	86	
69	Тернопільська	кіт	04.08.10	739
70		лисиця	14.10.10	914
71		лисиця	29.09.10	915
72		кіт	24.09.10	917
73	Рівненська	лисиця	07.04.09	119
74		лисиця	24.03.11	1229
75		лисиця	01.04.11	1230
76		кіт	26.04.11	1231
77	Чернігівська	куниця	13.01.10	515
78		лисиця	20.02.10	517
79		куниця	01.07.10	520
80		собака	09.07.10	522
81		кіт	13.07.10	523
82		кіт	07.01.10	514
83		собака	22.01.10	516
84		лисиця	21.06.10	518
85		собака	23.06.10	519
86	Дніпропетровська	енотовидний собака	17.08.09	144

Додаток В1 (3)

87	Вінницька	борсук	29.06.10	484
88		куниця	05.07.10	486
89		куниця	06.08.10	692
90		собака	10.02.11	1152
91		кіт	15.04.11	1215
92		лисиця	15.04.11	1217
93		борсук	11.05.11	1220
94	Черкаська	кіт	27.01.10	299
95		куниця	04.05.11	1206
96		куниця	04.05.11	1207
97		борсук	11.04.11	1208
98	Донецька	вовк	31.08.10	844
99	Чернігівська	рись	03.06.11	1234
100	Луганська	вовк	09.06.10	895

Додаток В2 (1)

Перелік зразків патологічного матеріалу, що були обрані для філогенетичного дослідження

Country	Id Sample	Id sample (Phylo tree)	Year of isolation	Species	County	Phylogenetic clade	This study
China	/	/	2008	Dog	/	Asian	no
Russia	/	/	2011	Red fox	/	C	no
Russia	/	/	2011	Red fox	/	C	no
Russia	/	/	2011	Red fox	/	C	no
Russia	/	/	2014	Cat	/	C	no
Russia	/	/	2014	Red fox	/	C	no
Poland	/	/	1994	Raccoon dog	/	CE	no
Poland	/	/	2020	Red fox	/	CE	no
Poland	/	/	2021	Red fox	/	CE	no
Poland	/	/	2021	Red fox	/	CE	no
Bosnia and Herzegovina	/	/	1986	Wolf	/	EE	no
Greece	/	/	2012	Red fox	/	EE	no
Hungary	/	/	1993	Red fox	/	EE	no
Poland	/	/	1992	Red fox	/	EE	no
Estonia	/	/	1991	No data	/	NEE	no
Poland	/	/	2000	Red fox	/	NEE	no
Poland	/	/	2001	Red fox	/	NEE	no
Hungary	/	/	1991	No data	/	Russia / D	no
Russia	/	/	2008	Red fox	/	Russia / D	no
Russia	/	/	2008	Red fox	/	Russia / D	no

Додаток В2 (2)

Russia	/	/	2009	Red fox	/	Russia / D	no
Russia	/	/	2014	Raccoon dog	/	Russia / D	no
Moldova	2560	# RV_An05_RV2560_Cattle_Mold_2021	2021	Cattle	Transnistria	C	yes
Moldova	5362		2022	Cattle	Singerei	C	yes
Moldova	5434		2022	Cattle	Singerei	C	yes
Moldova	4127	# RV_An08_RV4127_Dog_Mold_2022	2022	Dog	Singerei	C	yes
Ukraine	# RV_03_Vinnytska_Cat_Ukr_2021	# RV_03_Vinnytska_Cat_Ukr_2021	2021	Cat	Vinnytska	C	yes
Ukraine	# RV_04_Vinnytska_Fox_Ukr_2021	# RV_04_Vinnytska_Fox_Ukr_2021	2021	Red fox	Vinnytska	C	yes
Ukraine	# RV_05_Vinnytska_Fox_Ukr_2021	# RV_05_Vinnytska_Fox_Ukr_2021	2021	Red fox	Vinnytska	C	yes
Ukraine	# RV_06_Kirovohradska_Dog_Ukr_2021	# RV_06_Kirovohradska_Dog_Ukr_2021	2021	Dog	Kirovohradska	C	yes
Ukraine	# RV_08_Rivnenska_Cat_Ukr_2021	# RV_08_Rivnenska_Cat_Ukr_2021	2021	Cat	Rivnenska	C	yes
Ukraine	# RV_09_Rivnenska_Cat_Ukr_2021	# RV_09_Rivnenska_Cat_Ukr_2021	2021	Cat	Rivnenska	C	yes
Poland	2266140421L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2276140521L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2277140521J_POL		2021	Raccoon dog	Mazovie	CE	yes
Poland	2259140321L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2283140621L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2344261121L_POL		2021	Red fox	Swietokrzyskie	CE	yes
Poland	2255140121L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2256140121L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2258140221L_POL		2021	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2386060222L_POL		2022	Red fox	Swietokrzyskie	CE	yes
Poland	2388140222L_POL		2022	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2390060322L_POL		2022	Red fox	Lublin	CE	yes
Poland	2391140322L_POL		2022	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2393140222L_POL		2022	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2395140422L_POL		2022	Red fox	Mazovie	CE	yes
Poland	2398140422Br_POL		2022	Badger	Mazovie	CE	yes

Додаток В2 (3)

Poland	2399260422L_POL		2022	Red fox	Swietokrzyskie	CE	yes
Poland	2400140522L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2401140522L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2402260522L_POL		2022	Red fox	Swietokrzyskie	CE	yes
Poland	2403140522L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2404140522L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2405140722L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2406140722L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2372140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2373140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2374140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2375140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2376140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2377140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2379140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2380140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2381140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2382140122L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2383140222L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2384140222L_POL		2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Poland	2385140222P_POL	# RV_2385140222P_Dog_Pol_2022	2022	Dog	Mazowie	CE	yes
Poland	2387140222P_POL	# RV_2387140222P_Dog_Pol_2022	2022	Dog	Mazowie	CE	yes
Poland	2389260222L_POL	# RV_2389260222L_Fox_Pol_2022	2022	Red fox	Swietokrzyskie	CE	yes
Poland	2397140422L_POL	# RV_2397140422L_Fox_Pol_2022	2022	Red fox	Mazowie	CE	yes
Romania	FTA84	# RV_FTA84_Dog_Rom_2014	2014	Dog	Cerașu	D	yes
Romania	FTA63	# RV_FTA63_Fox_Rom_2015	2015	Red fox	Maneciu	D	yes
Hungary	89368		2022	Dog	Magosliget	NEE	yes
Hungary	94133	# RV_9433_jav_RedFox_Hun_2022	2022	Red fox	Uszka	NEE	yes

Додаток В2 (4)

Hungary	96437	# RV_96437_jav_Fox_Hun_2022	2022	Red fox	Kisnameny	NEE	yes
Hungary	77670	#RV_77670_jav_Fox_Hun_2022	2022	Red fox	Botpalad	NEE	yes
Moldova	2561		2021	Cattle	Transnistria	NEE	yes
Moldova	3287		2021	Cattle	Transnistria	NEE	yes
Moldova	1448	# RV_An02_RV1448_Dog_Mold_2021	2021	Dog	AneniiNoi	NEE	yes
Moldova	2230	# RV_An04_RV2230_Dog__Mold_2021	2021	Dog	Transnistria	NEE	yes
Moldova	2940		2022	Cat	Cantemir	NEE	yes
Moldova	3800		2022	Red fox	Transnistria	NEE	yes
Moldova	4246		2022	Cattle	Briceni	NEE	yes
Moldova	6176		2022	Dog	Briceni	NEE	yes
Moldova	804		2022	Cattle	Falesti	NEE	yes
Moldova	1602	# RV_An07_RV1602_Cattle_Mold_2022	2022	Cattle	Telenești	NEE	yes
Moldova	5052	# RV_An12_RV5052_Cattle_Mold_2022	2022	Cattle	Transnistria	NEE	yes
Moldova	6027	# RV_An14_RV6027_Jackal_Mold_2022	2022	Jackal	Briceni	NEE	yes
Poland	2254180121Zb_POL	# RV_2254180121Zb_WCat_Pol_2021	2021	Wild cat	Stubno	NEE	yes
Poland	2257180221L_POL	2257180221L_Redfox_Pol_2021	2021	Red fox	BaszniaDolna	NEE	yes
Romania	FTA29	# RV_FTA29_Fox_Rom_2012	2012	Red fox	Șinca	NEE	yes
Romania	FTA33	# RV_FTA33_Fox_Rom_2012	2012	Red fox	Bătarci	NEE	yes
Romania	FTA46	# RV_FTA46_Fox_Rom_2014	2014	Red fox	Malaia	NEE	yes
Romania	FTA47	# RV_FTA47_Fox_Rom_2015	2015	Red fox	Brâncoveni,	NEE	yes
Romania	13192		2020	Red fox	Iasi	NEE	yes
Romania	13132		2020	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	16812		2020	Cattle	Satu Mare	NEE	yes
Romania	17233		2021	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	17204		2021	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17242		2022	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17538		2022	Dog	Neamt	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17923		2022	Cattle	Botosani	NEE	yes

Додаток В2 (5)

Romania	CA-IDSA-17792		2022	Dog	Suceava	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17350		2022	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17241		2022	Cattle	Sireţel	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17295		2022	Dog	Suceava	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17376		2022	Dog	Suceava	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17230		2022	Dog	Suceava	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17847		2022	Cattle	Suceava	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17324		2022	Cattle	Sireţel	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17351		2022	Red fox	Iasi	NEE	yes
Romania	15340		2022	Red fox	Iasi	NEE	yes
Romania	16362		2022	Cattle	Botosani	NEE	yes
Romania	14992		2022	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	16921		2022	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	17092		2022	Cattle	Iasi	NEE	yes
Romania	16698	# RV_07_Iasi_Fox_Rom_2022	2022	Red fox	Iasi	NEE	yes
Romania	16920	# RV_14_Iasi_Fox_Rom_2022	2022	Red fox	Iasi	NEE	yes
Romania	17139	# RV_17_Suceava_Dog_Rom_2022	2022	Dog	Suceava	NEE	yes
Romania	17148	# RV_18_Botosani_Bov_Rom_2022	2022	Cattle	Botosani	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-16082	# RV_An22_RV16082_Fox_Rom_2022	2022	Red fox	Berezlogi	NEE	yes
Romania	CA-IDSA-17532	# RV_An30_RV17532_Fox_Rom_2022	2022	Red fox	Sireţel	NEE	yes
Slovakia	VB747-2022_Badger_Jablon_SK		2022	Badger	Jablon	NEE	yes
Slovakia	VB1071-2022_Dog_V.Slemence_SK	# RV_VB1071_V.Slemence_SK_Dog_SK_2022	2022	Dog	VelkeSlemence	NEE	yes
Slovakia	VB1135-2022_Fox_Rovne_SK	# RV_VB11352_Rovne_SK_Fox_SK_2022	2023	Red fox	RovnenadUdavou	NEE	yes

Додаток Д (1)

**Результати лабораторних досліджень польових ізолятів вірусу сказу
різними методами**

№ з/п	Методи діагностики сказу			
	РПФ	N2a	ЗТ-ПЛР	Біопроба
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	-	-	-
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	-	-	-
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+
10	+	-	-	-
11	+	+	+	+
12	+	+	+	+
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	+	+	+	+
17	+	+	+	+
18	+	-	-	-
19	+	-	-	-
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	+	+	+	+
23	+	-	+	-
24	+	-	-	-
25	+	+	+	+
26	+	-	+	-
27	+	-	-	-
28	+	-	-	-
29	+	+	+	+
30	+	+	+	+
31	+	+	+	+

Додаток Д (2)

32	+	+	+	+
33	+	+	+	+
34	+	+	+	+
35	+	+	+	+
36	+	+	+	+
37	+	-	-	-
38	+	-	-	-
39	+	+	+	+
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
42	+	+	+	+
43	+	+	+	+
44	+	-	-	-
45	+	+	+	+
46	+	+	+	+
47	+	-	-	-
48	+	+	+	+
49	+	-	-	-
50	+	+	+	+
51	+	+	+	+
52	+	+	+	+
53	+	+	+	+
54	+	-	-	-
55	+	+	+	+
56	+	+	+	+
57	+	+	+	+
58	+	+	+	+
59	+	+	+	+
60	+	+	+	+
61	+	+	+	+
62	+	+	+	+
63	+	+	+	+
64	+	+	+	+
65	+	+	+	+
66	+	+	+	+

Додаток Д (3)

67	+	+	+	+
68	+	+	+	+
69	+	+	+	+
70	+	+	+	+
71	+	+	+	+
72	+	+	+	+
73	+	+	+	+
74	+	+	+	+
75	+	+	+	+
76	+	+	+	+
77	+	+	+	+
78	+	+	+	+
79	+	-	-	-
80	+	+	+	+
81	+	-	-	-
82	+	-	-	-
83	+	-	-	-
84	+	+	+	+
85	+	+	+	+
86	+	+	+	+
87	+	+	+	+
88	+	+	+	+
89	+	+	+	+
90	+	+	+	+
91	+	+	+	+
92	+	+	+	+
93	+	+	+	+
94	+	+	+	+
95	+	+	+	+
96	+	+	+	+
97	+	+	+	+
98	+	+	+	+
99	+	+	+	+
100	+	+	+	+

Примітки: + вірус виявлено, - вірус не виявлено.

Додаток Е (1)

Картки контролю титрів інфекційної активності вірусу сказу референс-штаму CVS-11 та значень \log_{50} позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – 0,5 МО/см³) при постановці FAVN-тест в 2019-2022 рр.

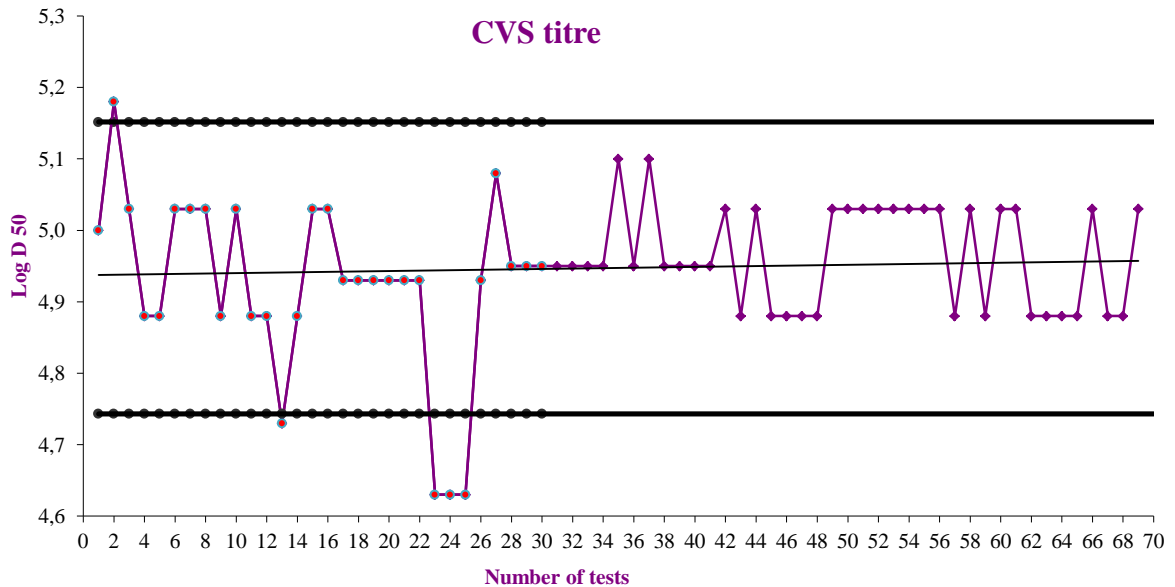


Рис. 1 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2019 (протокол 1-69).

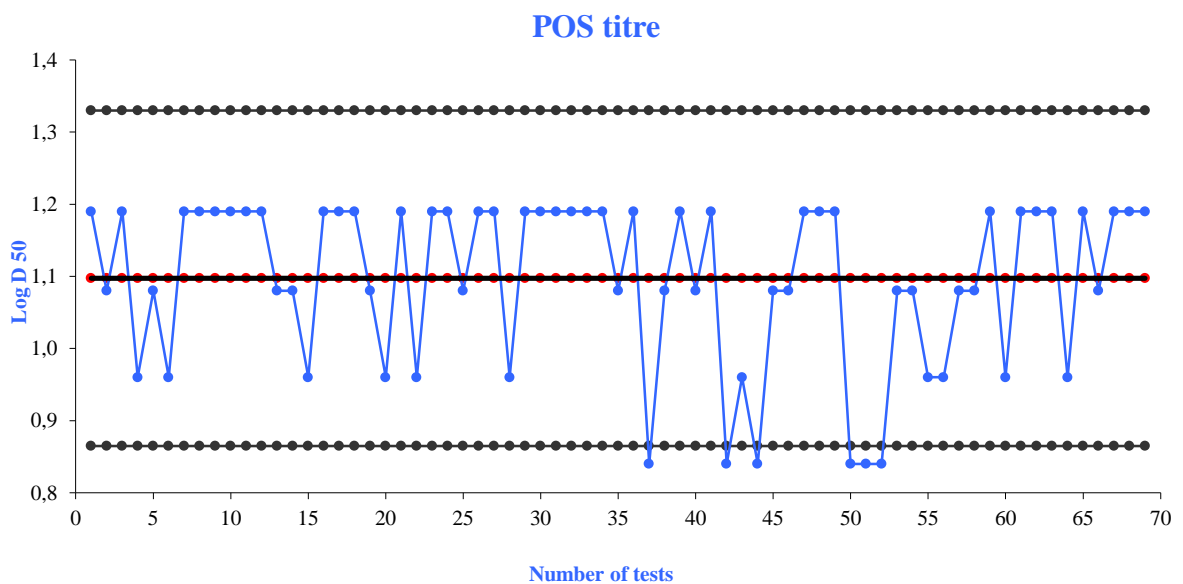


Рис. 2 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – 0,5 МО/см³) при постановці реакції FAVN-тест в 2019 (протокол 1-69).

Додаток Е (2)

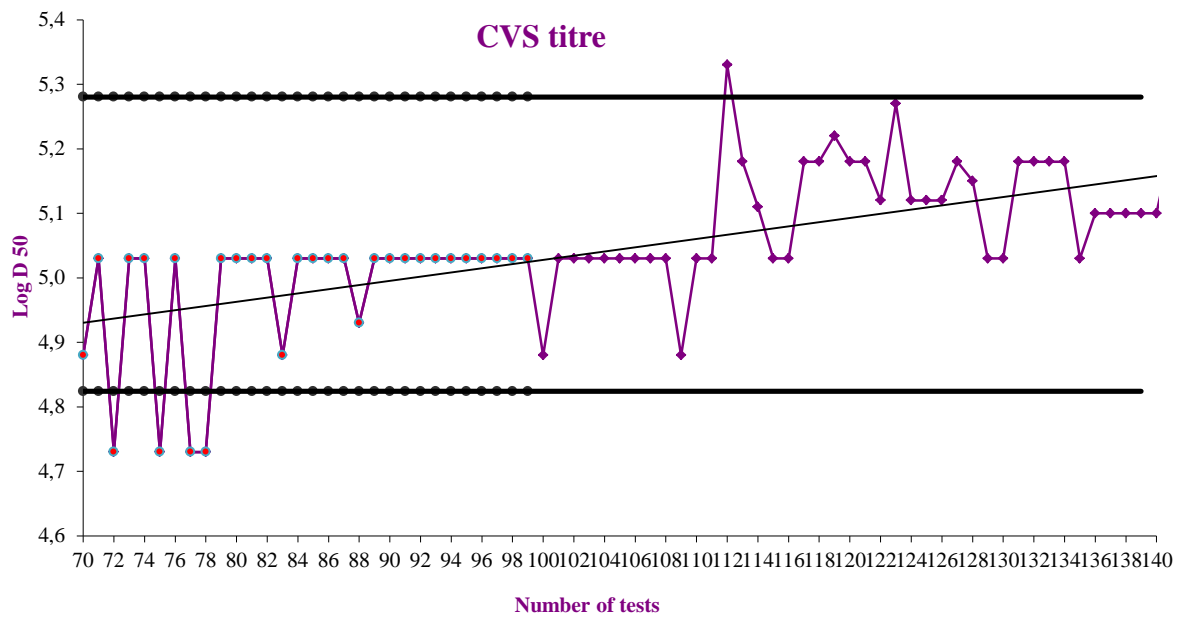


Рис. 3 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2019 (протокол 70-145).

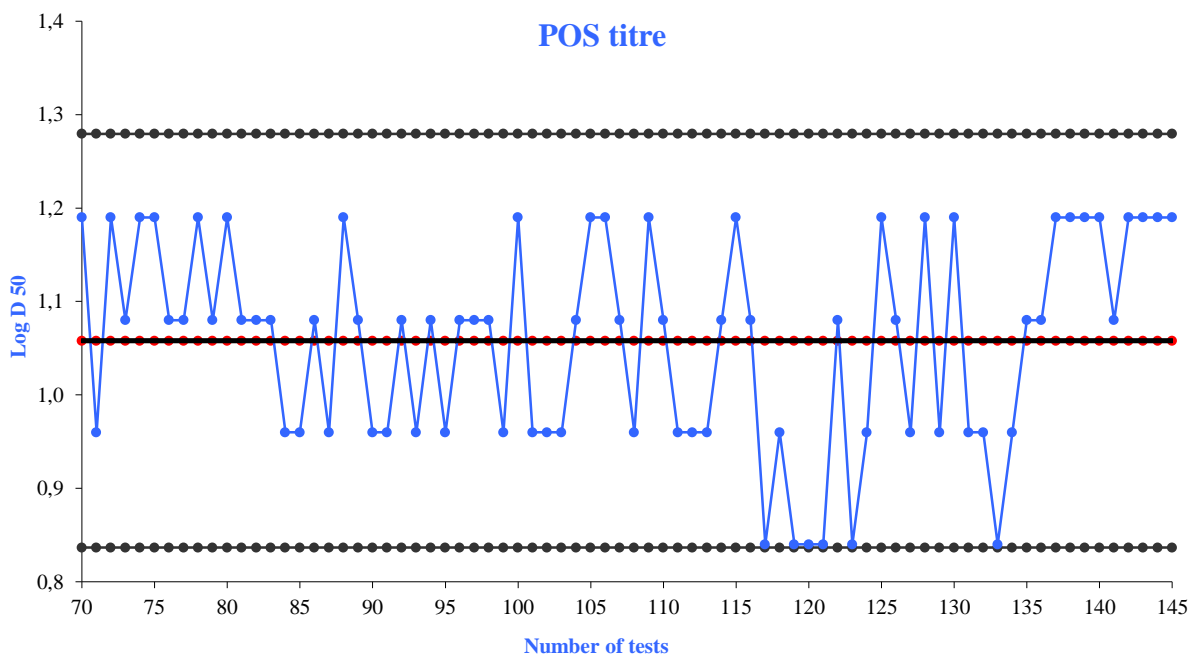


Рис. 4 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – 0,5 МО/см³) при постановці реакції FAVN-тест в 2019 (протокол 70-145).

Додаток Е (3)

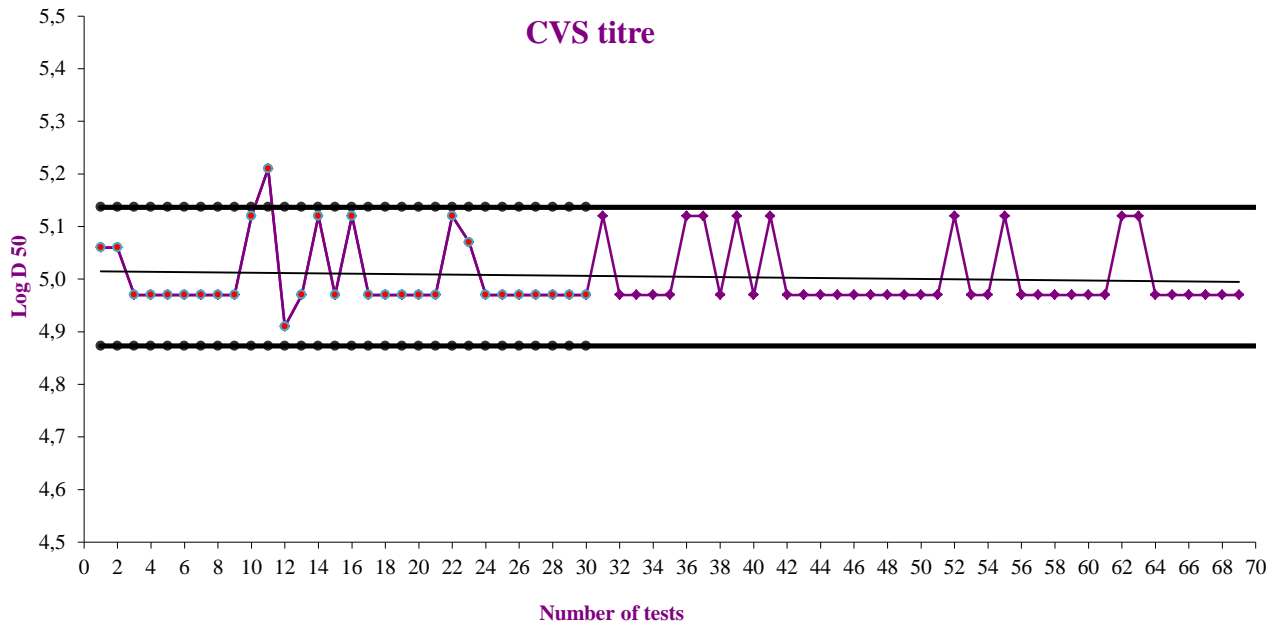


Рис. 5 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2020 (протокол 1-69).

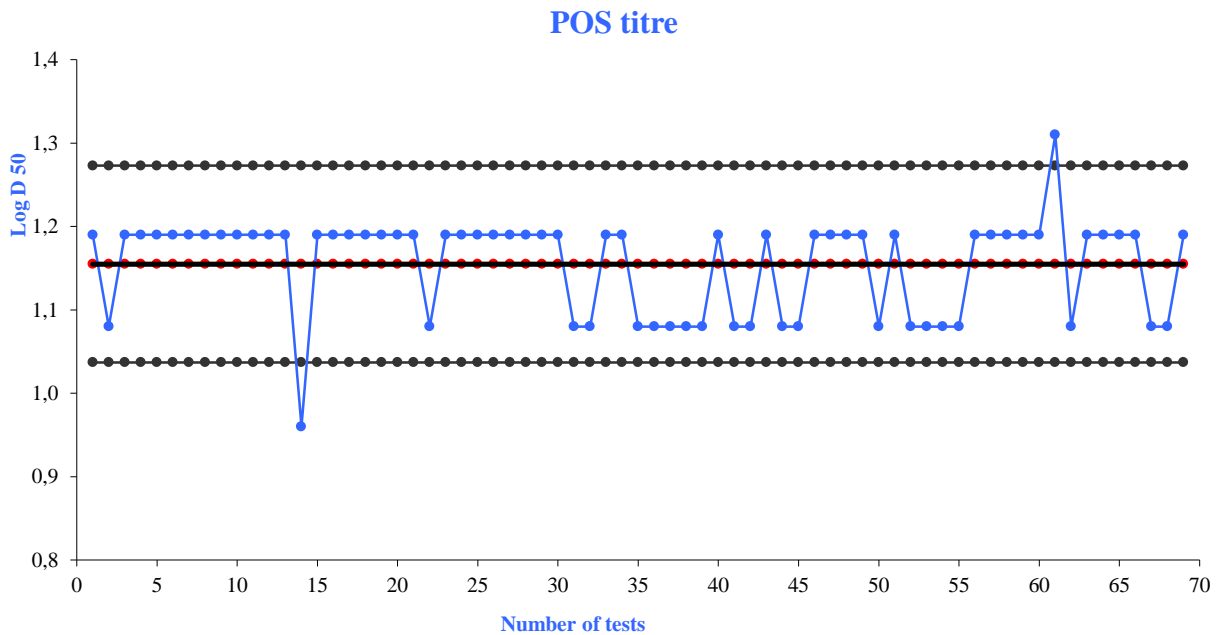


Рис. 6 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – $0,5 \text{ MO/cm}^3$) при постановці реакції FAVN-тест в 2020 (протокол 1-69).

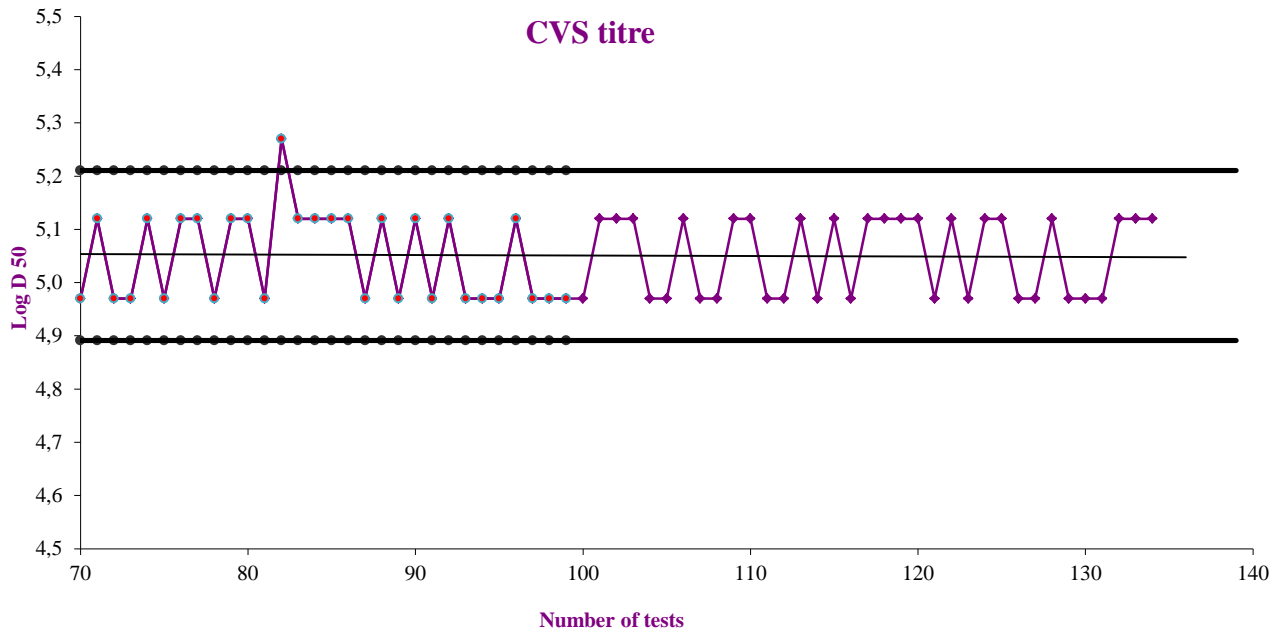


Рис. 7 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2020 (протокол 70-134).

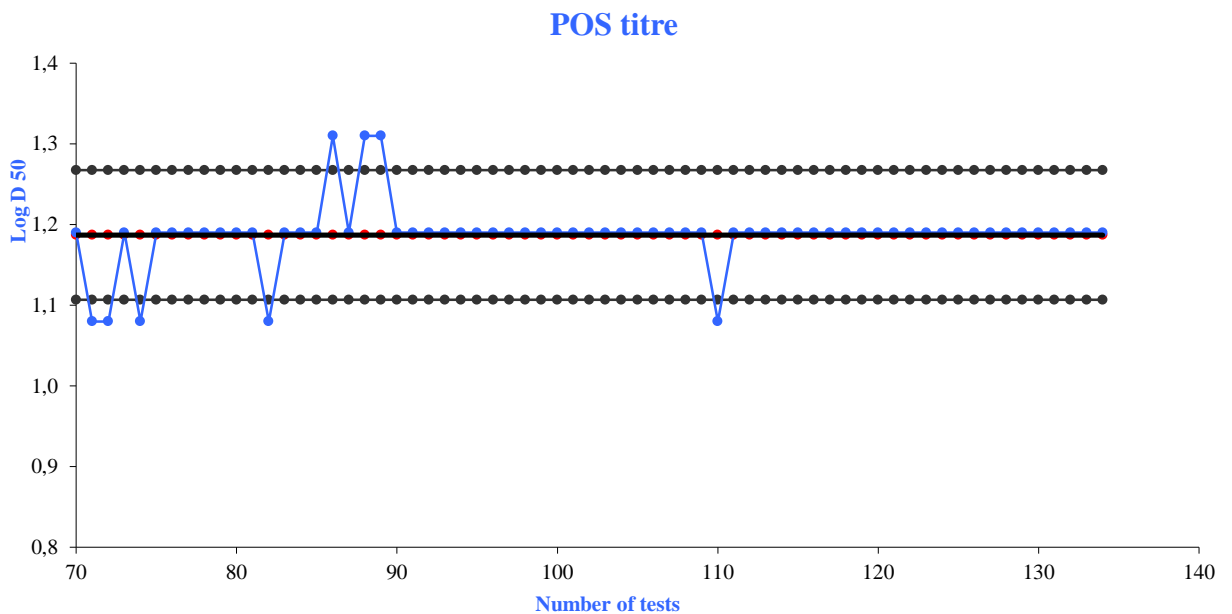


Рис. 8 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – $0,5 \text{ MO/cm}^3$) при постановці реакції FAVN-тест в 2020 (протокол 70-134).

Додаток Е (5)

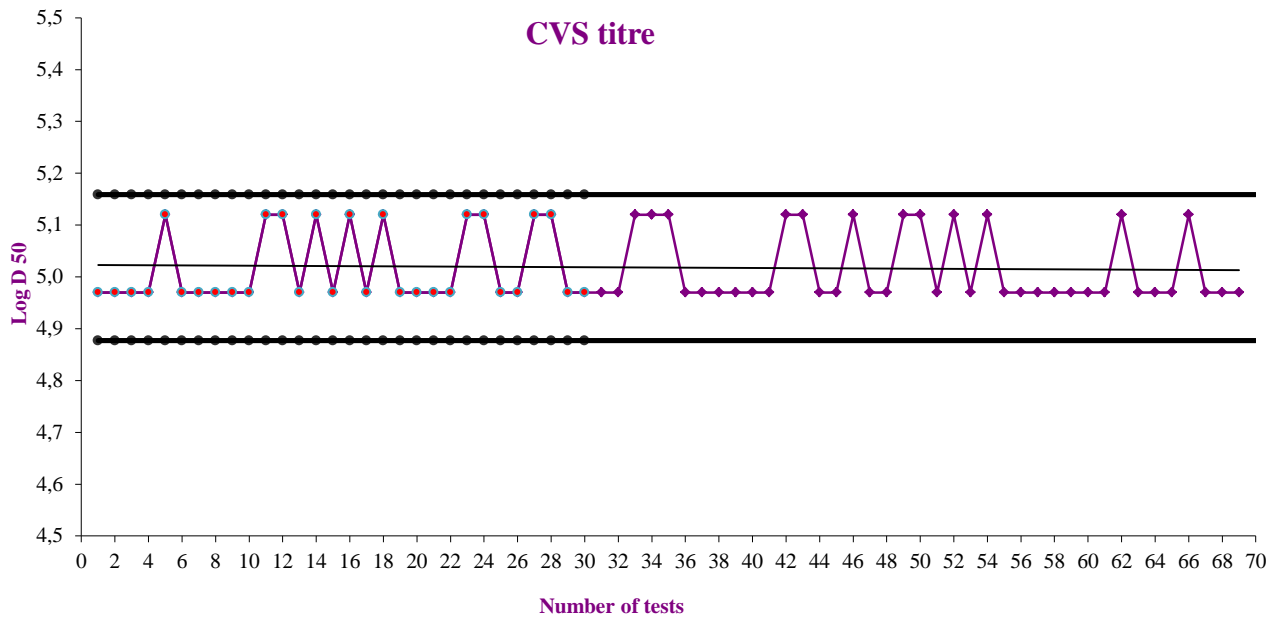


Рис. 9 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2021 (протокол 1-69).

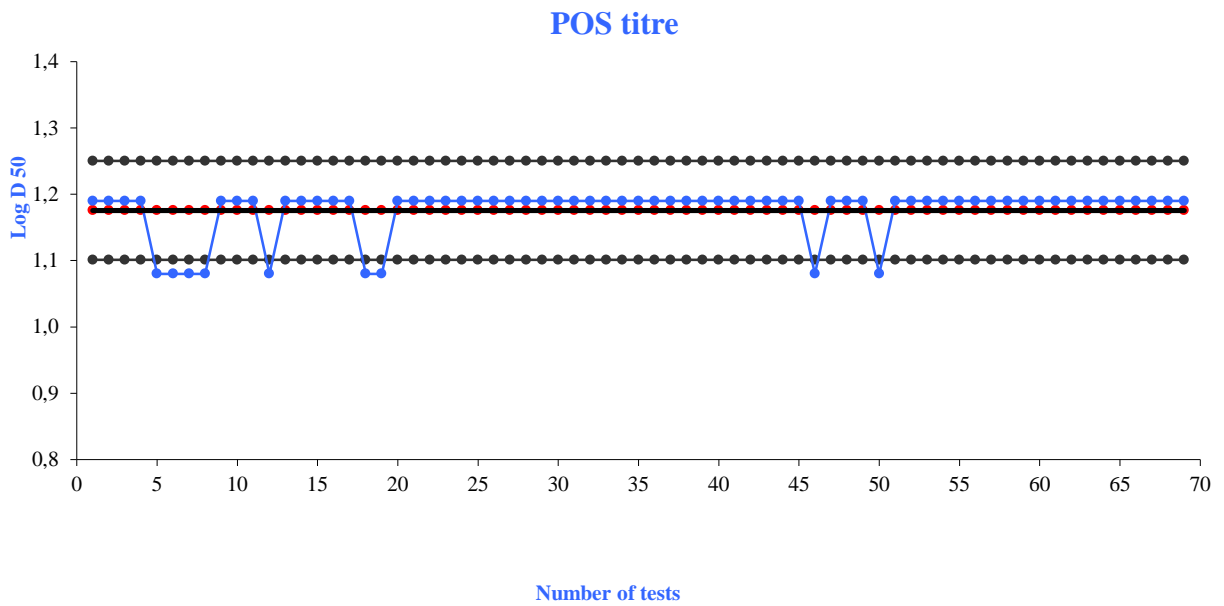


Рис. 10 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – $0,5 \text{ MO/cm}^3$) при постановці реакції FAVN-тест в 2021 (протокол 1-69).

Додаток Е (6)

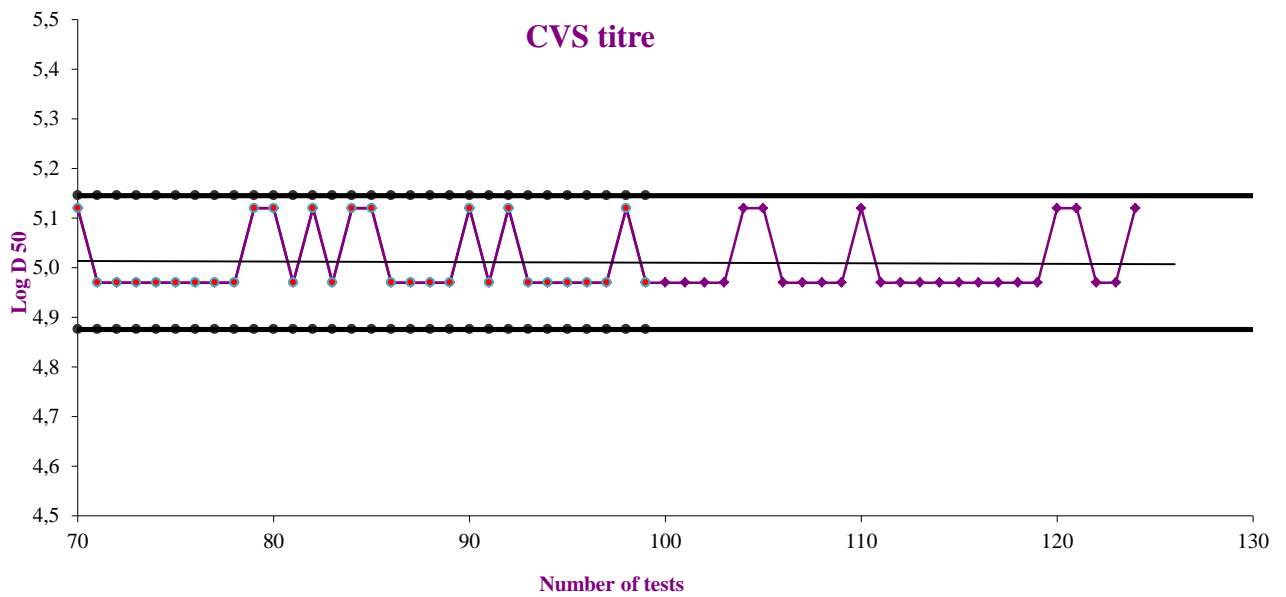


Рис. 11 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2021 (протокол 70-124).

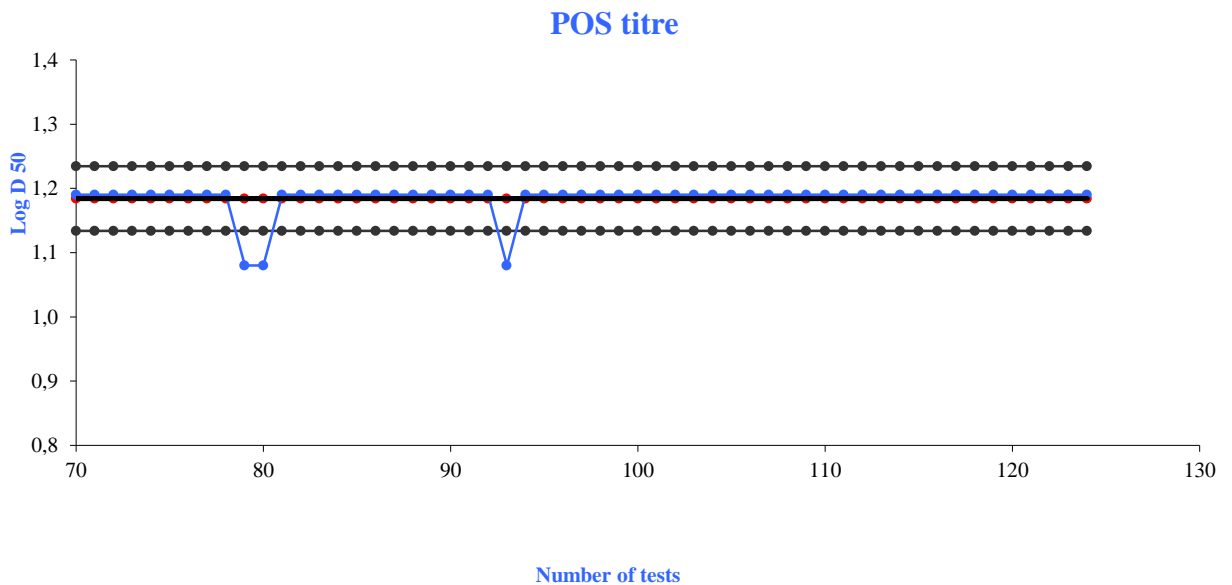


Рис. 12 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – $0,5 \text{ МО/см}^3$) при постановці реакції FAVN-тест в 2021 (протокол 70-124).

Додаток Е (7)

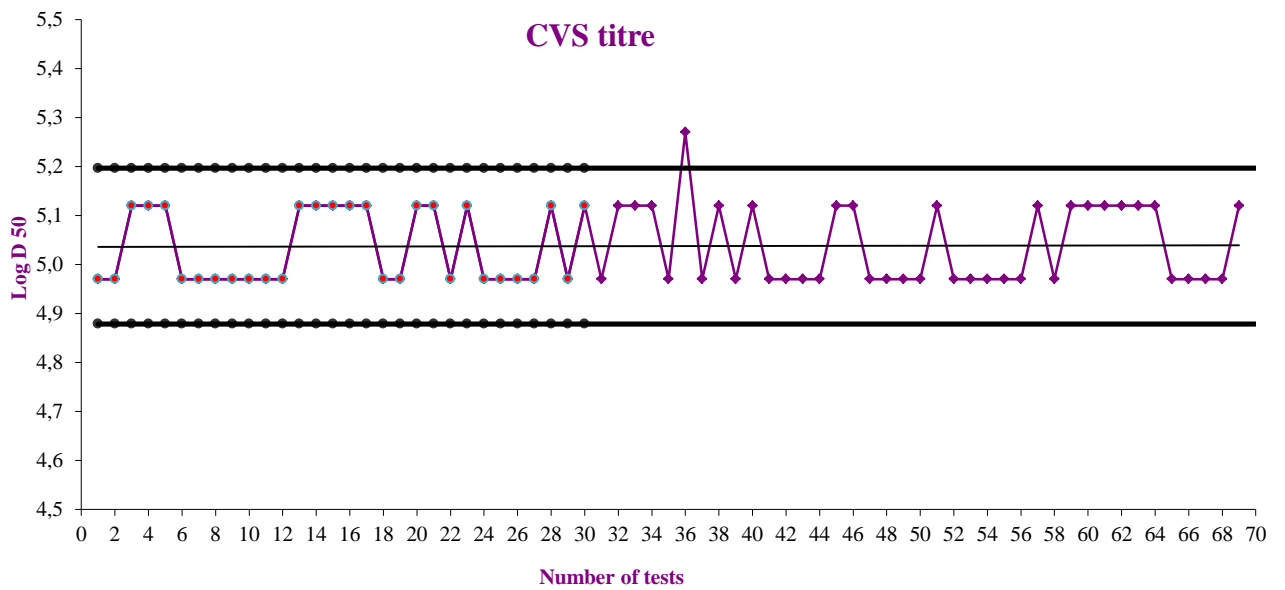


Рис. 13 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2022 (протокол 1-69).

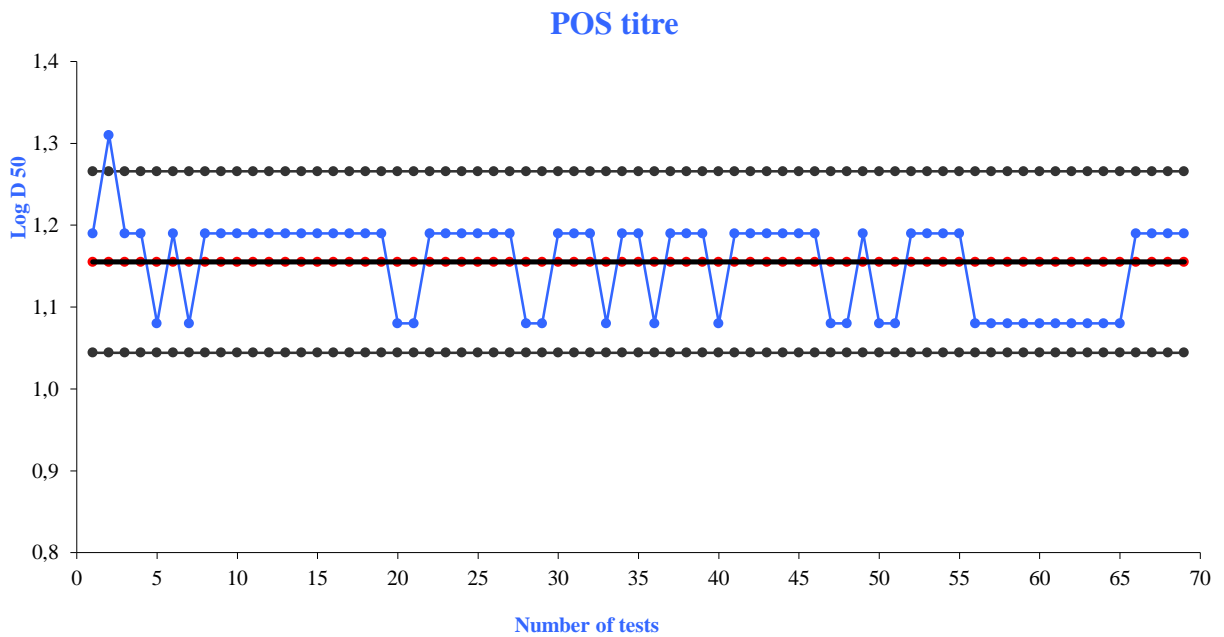


Рис. 14 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – 0,5 МО/см³) при постановці реакції FAVN-тест в 2022 (протокол 1-69).

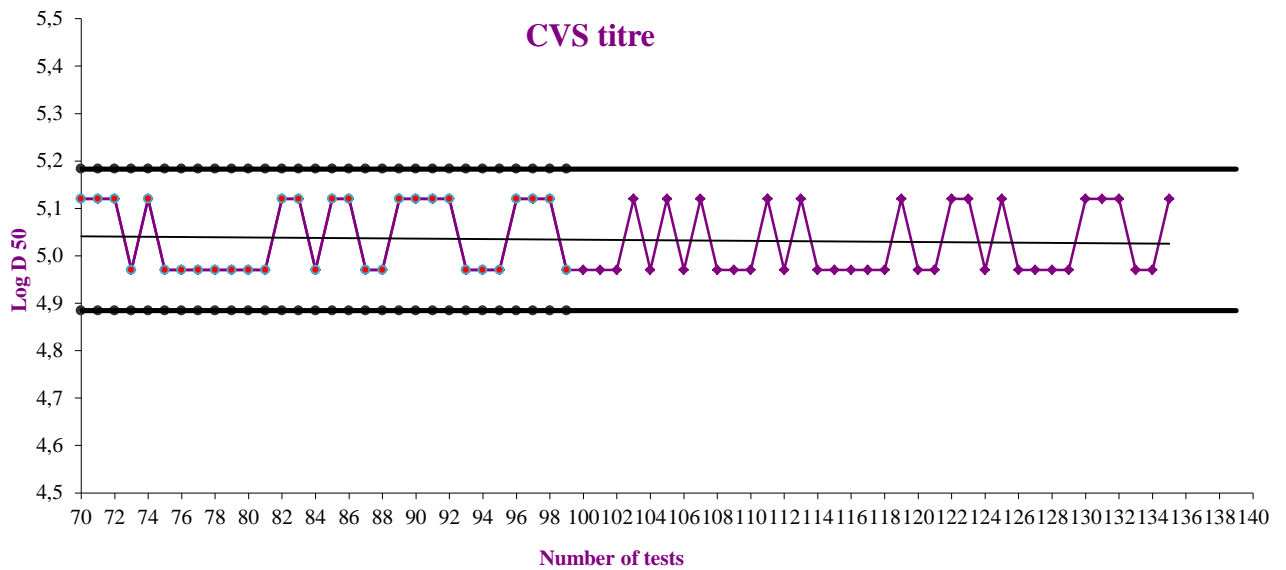


Рис. 15 Значення титрів вірусу сказу референс-штаму CVS-11 при постановці реакції FAVN-тест в 2022 (протокол 70-134).

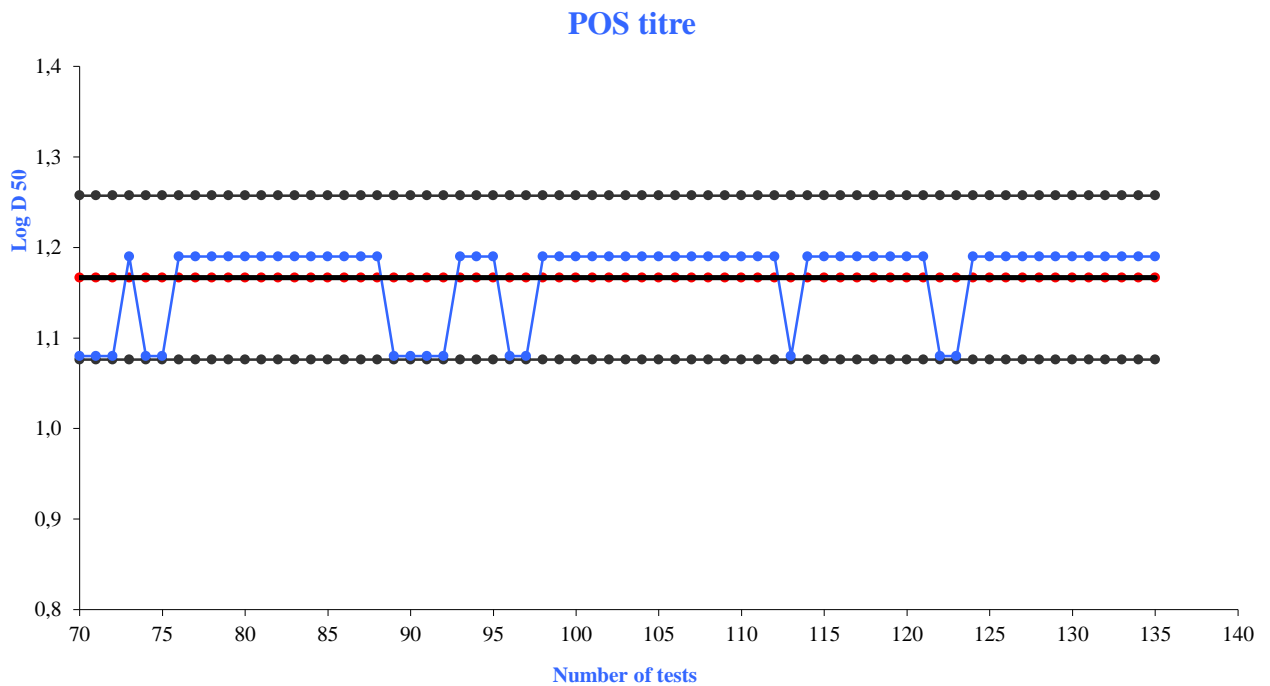


Рис. 16 Значення титрів позитивної стандартної сироватки МЕБ (відновленої та розведеної до теоретичного значення – $0,5 \text{ MO/cm}^3$) при постановці реакції FAVN-тест в 2022 (протокол 70-134).



НАЦІОНАЛЬНЕ АГЕНТСТВО З АКРЕДИТАЦІЇ УКРАЇНИ

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН УКРАЇНИ З АКРЕДИТАЦІЇ

АТЕСТАТ ПРО АКРЕДИТАЦІЮ



Зареєстрований у Реєстрі
06 серпня 2021 року*
за № 50005
дійсний до 10 квітня 2024 року

Дата первинної акредитації: 11 квітня 2019 року

НАЦІОНАЛЬНЕ АГЕНТСТВО З АКРЕДИТАЦІЇ УКРАЇНИ ЦИМ ЗАСВІДЧУЄ
КОМПЕТЕНТНІСТЬ

**Випробувального центру Державного науково-дослідного інституту з
лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи**

**Місцезнаходження юридичної особи: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30
Місцезнаходження ООВ: 03151, м. Київ, вул. Донецька, 30,
03151, м. Київ, вул. Волинська, 12**

0	0	6	9	9	6	9	0
---	---	---	---	---	---	---	---

(Код ЄДРПОУ)

ВІДПОВІДНО ДО ВИМОГ ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2017 (EN ISO/IEC 17043:2010, ISO/IEC 17043:2010 IDT) У СФЕРІ:

перевірка професійного рівня лабораторій за хіміко-токсикологічними, мікробіологічними, бактеріологічними, імунологічними, вірусологічними, патоморфологічними та молекулярно-генетичними дослідженнями.

Сфера акредитації визначена додатком до атестата від 11 квітня 2019 року, що складається з 01 аркуша, доповненням до сфери акредитації від 06 серпня 2021 року, що складається з 02 аркушів, які є невід'ємними частинами цього атестата.

*На заміну виданого від 11 квітня 2019 року у зв'язку з внесенням змін.
Рішення щодо розширення сфери акредитації ООВ від 06 серпня 2021 року.

Т.в.о. директора



Дрослав ПИЦІК

м. Київ, 01133, вул. Генерала Алмазова, 18/7

Зареєстровано у журналі обліку за № 1456

НААУ є підписантом: 1) Угоди EA BIA у сферах «Випробування», «Калібрування», «Сертифікація персоналу», «Сертифікація систем менеджменту» та «Медичні лабораторії»; 2) Угоди ILAC MRA у сферах «Випробування», «Калібрування» та «Медичні лабораторії»; 3) Угоди IAF MLA у сферах «Сертифікація персоналу», «Сертифікація систем менеджменту».

Додаток Є (2)

НААУ

Регістраційний номер заявки

50005

Доповнення від "06" серпня 2021 р.
до додатка до атестата про акредитацію
№ 50005 від "11" квітня 2019 р.

ДОПОВНЕННЯ ДО СФЕРИ АКРЕДИТАЦІЇ

Випробувального центру Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та
ветеринарно-санітарної експертизи
(назва провайдера перевірки кваліфікації)

Назва об'єкта (продукції, матеріалу, речовини і т.п.)	Назва випробувань та (або) характеристик (параметрів), що визначаються	Додаткові дані *
Хіміко-токсикологічні дослідження		
Харчові продукти та корми	Визначення масової частки жиру	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»
	Визначення масової частки сирого протеїну	
	Визначення афлатоксину В1	
	Визначення охратоксину А	
	Нітрати	
Мікробіологічні дослідження		
	Виявлення <i>Listeria monoc.</i> та <i>Listeria spp.</i>	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»
	Виявлення <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Виявлення <i>Salmonella spp.</i>	
Бактеріологічні дослідження		
Патологічний/біологічний матеріал	Сальмонельоз	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»
	Лістеріоз	
	Сибірка	
Імунологічні дослідження		
Сироватка крові тварин	Виявлення антитіл до збудника бруцельозу	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»
	Виявлення антитіл до збудника лептоспірозу	
	Виявлення антитіл до збудника вірусу лейкозу	

Начальник відділу

Ф-08.15.17 (редакція 01) від 25.08.2015

А. Будник

Аркуш 1 з 2

НААУ

Регістраційний номер заявки

50005

Доповнення від "06" серпня 2021 р.
до додатка до атестата про акредитацію
№ 50005 від "11" квітня 2019 р.

Вірусологічні дослідження		
Сироватка крові птиці	Виявлення антитіл до збудника ньюкаслської хвороби птиці	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»
	Виявлення антитіл до збудника грипу птиці	
Мазки-відбитки з головного мозку	Виявлення антигену збудника сказу	
Патоморфологічні дослідження		
Довгастий мозок (Гомогенат головного мозку ВРХ)	Виявлення патологічного пріону методом ІФА	Програма «ВЕТ-ТЕСТ»

*Додаткові дані (за наявності, наприклад, Програма ПК (Протокол схеми, позначення документів на ПК) / процедури / техніки виконання), локалізація, частота, діапазон концентрацій/діапазон вимірювання і т.д.)

Начальник відділу

Ф-08.15.17 (редакція 01) від 25.08.2015

А. Будник

Аркуш 2 з 2

**МІНІСТЕРСТВО АГРАРНОЇ ПОЛІТИКИ ТА ПРОДОВОЛЬСТВА УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА ВЕТЕРИНАРНА ТА ФІТОСАНІТАРНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ
ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ**

**СИСТЕМА ОЦІНКИ АНТИРАБІЧНОГО ІМУНІТЕТУ У
ДОМАШНІХ І ДИКИХ М'ЯСОЇДНИХ ТВАРИН**

(Методичні рекомендації)

КИЇВ – 2015

УДК 636.09:578.824:57.083:311.42

Методичні рекомендації розглянуто та затверджено на засіданні Вченої ради Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 7 від 24.12.2015 р.).

Методичні рекомендації затверджено і прийнято до впровадження в практику ветеринарної медицини Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України (протокол № від р.).

Розробники: Дрожже Ж.М., Недоссков В.В., Полупан І.М.

Рецензенти:

Ложкіна О.В. – к.вет.н., завідувач науково-дослідного патоморфологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Романенко О.А. – к.вет.н., завідувач лабораторії з вивчення сказу тварин ДНКІБШМ.

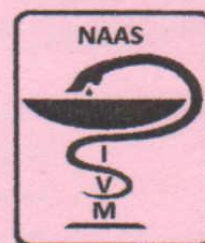
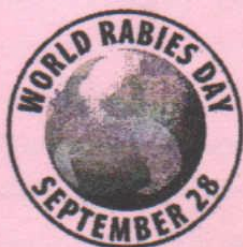
Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин. Методичні рекомендації [Ж.М. Дрожже, В.В. Недоссков, І.М.Полупан]. – К., 2016. – 26 с.

Рекомендації призначені для спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності 6.130501, 8.130501 – «Ветеринарна медицина».

Підписано до друку 02.03.2016 р. Зам. № 140.
Формат 60x90 1/16. Папір офсетний. Друк – ризографія.
Наклад 100 прим. Ум. друк. арк. 1,9.
Друк «ЦП «КОМПРИНТ», Свідоцтво ДК №4131, від 04.08.2011 р.
м. Київ, вул. Предславинська, 28
528-05-42, 067-209-54-30
email: komprint@ukr.net

© Дрожже Жанна Миколаївна,
Недоссков Віталій Володимирович,
Полупан Іван Миколайович

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ



МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
«Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР»

Київ – 2017

УДК 616.98:578.824.11

Методичні рекомендації затверджені Методичною комісією (протокол № 5 від 10 жовтня 2016 р.) та Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 10 від 11 листопада 2016 р.).

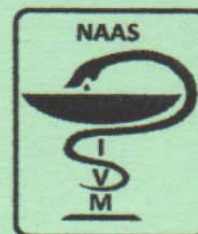
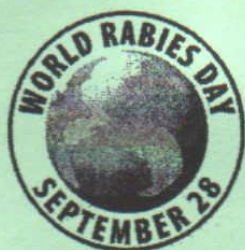
Укладачі: Мазур М.В., аспірант,
Полупан І.М., кандидат ветеринарних наук,
Мазур Н.В., аспірант,
Нікітова А.П., кандидат ветеринарних наук,
Недоссков В.В., доктор ветеринарних наук

Рецензенти: Ситюк М.П., доктор ветеринарних наук, заступник директора з наукової роботи ІВМ НААН,
Синицин В.А., доктор ветеринарних наук, директор Державної наукової установи «Державний центр інноваційних біотехнологій».

Методичні рекомендації розраховані на наукових співробітників установ гуманної і ветеринарної медицини, спеціалістів вірусологічних відділів лабораторій ветеринарної медицини, спеціалістів біологічної промисловості, студентів і фахівців ветеринарної медицини, а також викладачів і студентів закладів освіти III-IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина» та призначені для лабораторної діагностики сказу шляхом виявлення РНК вірусу в патолого-анатомічному матеріалі від усіх видів ссавців методом ЗТ-ПЛР.

© Мазур Микола Вікторович,
Полупан Іван Миколайович,
Мазур Наталія Вікторівна,
Нікітова Аліна Петрівна,
Недоссков Віталій Володимирович

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ



МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
«Застосування біостатистичних методів аналізу
результатів секвенування за молекулярно-генетичних
досліджень сказу тварин»

Київ – 2017

УДК 616.98:578.824.11

Методичні рекомендації затверджені Методичною комісією (протокол № 5 від 10 жовтня 2016 р.) та Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (протокол № 10 від 11 листопада 2016 р.).

Укладачі: Мазур М.В., аспірант,
Полупан І.М., кандидат ветеринарних наук,
Мазур Н.В., аспірант,
Нікітова А.П., кандидат ветеринарних наук,
Недоссков В.В., доктор ветеринарних наук

Рецензенти: Ситюк М.П., доктор ветеринарних наук, заступник директора з наукової роботи ІВМ НААН,
Синицин В.А., доктор ветеринарних наук, директор Державної наукової установи «Державний центр інноваційних біотехнологій».

Методичні рекомендації розраховані на наукових співробітників установ гуманної і ветеринарної медицини, спеціалістів вірусологічних відділів лабораторій ветеринарної медицини, спеціалістів біологічної промисловості, студентів і фахівців ветеринарної медицини, а також викладачів і студентів закладів освіти III-IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина».

© Мазур Микола Вікторович,
Полупан Іван Миколайович,
Мазур Наталія Вікторівна,
Нікітова Аліна Петрівна,
Недоссков Віталій Володимирович.

КАБІНЕТ МІНІСТРІВ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ТА ВЕТЕРИНАРНО-
САНИТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ
ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ БІОТЕХНОЛОГІЇ І ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ
ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ «УКРВЕТПРОМПОСТАЧ»

Методичні рекомендації

Планування, організація та проведення пероральної імунізації
м'ясоїдних тварин проти сказу

Київ-2018

УДК 619:616.98:578.824.11

Методичні рекомендації затверджені Методичною комісією (Протокол № 4 від 23 жовтня 2017 р.) **та Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН** (Протокол № 10 від 23 жовтня 2017 р.).

Методичні рекомендації розглянуті та схвалені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпеки харчових продуктів та захисту споживачів (Протокол № 1 від 24 квітня 2018 р.; із змінами та доповненнями, внесеними згідно із Протоколом № 3 від 20 грудня 2018 р.).

Автори: Полупан І.М., к.вет.н. (ІВМ НААН); Ничик С.А., д.вет.н. (ІВМ НААН); Недосєков В.В., д.вет.н. (НУБіП України); Кобаль Б.І. (Держпродспоживслужба); Солодчук В.Л. (ТОВ «Укрветпромпостач»); Шарай Я.М., к.вет.н. (ТОВ «Укрветпромпостач»); Хома Ю.Б. (ТОВ «Укрветпромпостач»); Давиденко О.Г. (ТОВ «Укрветпромпостач»); Гібалюк Ю.О. (Держпродспоживслужба); Дрожже Ж.М., к.вет.н. (ДНДІЛДВСЕ); Романенко О.А., к.вет.н. (ДНДКІБШМ)

Рецензенти: Ситюк М.П., д.вет.н., заступник директора з наукової роботи ІВМ НААН

Синицин В.А., д.вет.н., директор Державної наукової установи «Державний центр інноваційних біотехнологій»

В рекомендаціях, на підставі власних досліджень та вивчення світового досвіду представлені методичні підходи щодо планування, організації та здійснення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу з використанням живих модифікованих вакцин на основі атенуйованих штамів вірусу сказу, а також антирабійних вакцин, які створені на основі антигену вірусу сказу VR-G (vaccinia-rabies glycoprotein).

Рекомендації розраховані на спеціалістів ветеринарної медицини, працівників лісового та мисливського господарств, охорони природи, наукових співробітників установ ветеринарної медицини та викладачів, магістрантів й аспірантів закладів освіти за напрямом підготовки «Ветеринарна медицина».

Даний документ має рекомендаційний характер, який встановлює загальні підходи щодо планування, організації та здійснення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу. В кожному конкретному випадку в залежності від особливостей території, епізоотичної ситуації та інших непередбачених даним документом факторів, остаточне рішення приймає головний територіальний орган ветеринарної медицини області, де проводиться дана робота.

© Полупан Іван Миколайович,
Ничик Сергій Анатолійович,
Недосєков Віталій Володимирович,
Кобаль Борис Іванович,
Солодчук Володимир Леонідович,
Шарай Ярослав Миколайович,
Хома Юрій Богданович,
Давиденко Оксана Григорівна,
Гібалюк Юрій Олександрович
Дрожже Жанна Миколаївна,
Романенко Олег Анатолійович

Зам. № 745-18
Наклад — 2000 прим.
Умов. друк. арк. — 1,86
Папір крейдований.
Надруковано Рекламно-поліграфічна
фірма ПП «Тім-Сервіс К»

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
«ВИДІЛЕННЯ ВІРУСУ СКАЗУ
З ПАТОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ»**

Київ – 2023

УДК 619:616.98:578.824.11

Методичні рекомендації розглянуто, схвалено та рекомендовано до друку рішенням Методичної комісії Інституту ветеринарної медицини НААН (від 25 жовтня 2023 року, протокол № 3).

Методичні рекомендації розглянуті і затверджені Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН (від 2 листопада 2023 року, протокол № 9).

Укладач: Полупан І.М., кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник.

Рецензенти: Ситюк М.П., доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, ІВМ НААН;

Радзиховський М.Л., доктор ветеринарних наук, доцент, НУБіП України.

В методичних рекомендаціях на підставі власних досліджень та даних наукової літератури представлено аналіз сучасних методів лабораторної діагностики, їх переваги та недоліки, запропонована методика виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу.

Методичні рекомендації розраховані на співробітників наукових установ ветеринарної медицини, спеціалістів державних регіональних лабораторій Держпродспоживслужби, фахівців ветеринарної медицини, а також викладачів і студентів закладів вищої освіти за спеціальністю «Ветеринарна медицина».

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

ЗАТВЕРДЖЕНО

Директор Інституту
ветеринарної медицини НААН
доктор ветеринарних наук
Ничик С.А.

С.А. Ничик
"12" вересня 2016 р.



ТЕХНОЛОГІЧНИЙ РЕГЛАМЕНТ
З ВИГОТОВЛЕННЯ ТА КОНТРОЛЮ ВЕТЕРИНАРНОГО
ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ «ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ
ІМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОЇ ДІАГНОСТИКИ СКАЗУ»

РОЗРОБЛЕНО

Завідувач лабораторією нейроінфекцій
Інституту ветеринарної медицини НААН,
кандидат ветеринарних наук
Полунав І.М.

І.М. Полунав
"12" вересня 2016 р.

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ

ЗАТВЕРДЖЕНО

Директор Інституту
ветеринарної медицини НААН
доктор ветеринарних наук
Ничик С.А.


"24" жовтня 2016 р.

ТЕХНОЛОГІЧНИЙ РЕГЛАМЕНТ
З ВИГОТОВЛЕННЯ ТА КОНТРОЛЮ ВЕТЕРИНАРНОГО
ІМУНОБІОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ «ГАЛУЗЕВИЙ СТАНДАРТНИЙ
ЗРАЗОК АНТИРАБІЧНОГО ІМУНОГЛОБУЛІНУ»

РОЗРОБЛЕНО

Завідувач лабораторією нейроінфекцій
Інституту ветеринарної медицини НААН,
кандидат ветеринарних наук
Полупан І.М.

"12" вересня 2016 р.



Імунопрофілактика СКАЗУ в Україні

І.М. Полупан
В.В. Недосеков
С.А. Ничик
А.П. Нікітова
Н.В. Мазур



УДК 636.09

ББК 48

П 53

*Рекомендовано Вченою радою**Національного університету біоресурсів і природокористування
України (протокол №12 від 21 червня 2017 року).*

Рецензенти:

В.А. Синицин – доктор ветеринарних наук;**М.П. Ситюк** – кандидат ветеринарних наук

П 53 **І.М. Полупан, В.В. Недосєков, С.А. Ничик, А.П. Нікітова, Н.В. Мазур.**
Імунопрофілактика сказу в Україні: монографія – Херсон: Гринь Д.С.,
2017. – 144 с.

ISBN 978-966-930-157-4

Монографія присвячена дослідженню особливостей імунопрофілактики сказу як однієї з найнебезпечніших нозологічних одиниць інфекційної патології домашніх і диких м'ясоїдних тварин. Висвітлено основні аспекти епізоотології сказу в сучасних умовах, особливості парентеральної і пероральної антирабійної вакцинації та роль специфічної профілактики сказу в Україні. Особливу увагу приділено авторським дослідженням імунобіологічних властивостей вакцинних штамінів вірусу сказу і розробкам методів контролю за імуногенною активністю інактивованих антирабійних вакцин.

Монографія стане сучасним та актуальним доповненням до лекційних курсів з дисциплін вірусологія й епізоотологія та інфекційні хвороби, що викладаються на факультетах ветеринарної медицини вищих навчальних закладів України. Видання також буде корисним магістрантам, аспірантам, здобувачам наукового ступеня із ветеринарних наук, слухачам Інституту післядипломного навчання й факультетів підвищення кваліфікації, фахівцям з ветеринарії та біології, які цікавляться питаннями інфекційної патології тварин і епізоотології.

УДК 636.09
ББК 48

ISBN 978-966-930-157-4

© І.М. Полупан, В.В. Недосєков, С.А. Ничик,
А.П. Нікітова, Н.В. Мазур, 2017

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА УКРАЇНИ
З ПИТАНЬ БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ
ТА ЗАХИСТУ СПОЖИВАЧІВ

ДЕРЖАВНИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ
З ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ
ТА ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЇ ЕКСПЕРТИЗИ



Полупан І.М., Недосеков В.В., Рудой О.В.

ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ

МОНОГРАФІЯ

Київ-2021

УДК 636:616.98:578.824.11:616-036.22

Л12

Рекомендовано до друку Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (протокол № 2 від 23.06.2021 року).

Автори: І.М. Полупан, В.В. Недоссков, О.В. Рудой.

Рецензенти:

Уховський В.В., д-р вет. наук, професор, завідувач науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Радзиховський М.Л., д-р вет. наук, професор кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України.

Лабораторна діагностика сказу: монографія / [І.М. Полупан, В.В. Недоссков, О.В. Рудой]. – Київ: ДНДІЛДВСЕ, 2021. – 137 с.

ISBN 978-966-920-639-8

Монографія присвячена одному з аспектів інфекційної патології домашніх, сільськогосподарських, диких тварин та людини. Висвітлені важливі характеристики методів лабораторної діагностики сказу в сучасних умовах; представлені основні методики детекції антигену в патологічному матеріалі, вірусовиділення, визначення геному та здійснення філогенетичного аналізу вірусу сказу, що представлені в «Керівництві з діагностичних тестів та вакцин для наземних тварин» (МЕБ, 2021); вказані методи оцінки антирабічного імунітету та контролю антирабічних вакцин.

Видання також буде цікаве аспірантам та здобувачам ветеринарного профілю, слухачам ФПК, ветеринарним і біологічним фахівцям, яких хвилюють питання інфекційної патології та епізоотології.

© Авторський колектив, 2021

© ДНДІЛДВСЕ, 2021



ЗВІТ ПРО ПРОВЕДЕНУ ОЦІНКУ РИЗИКУ ПОШИРЕННЯ СКАЗУ СЕРЕД ДОМАШНІХ І СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН ЗА ДІЮЧОЇ СИСТЕМИ КОНТРОЛЮ СКАЗУ ТВАРИН В УКРАЇНІ

**«ВДОСКОНАЛЕННЯ ЗАКОНОДАВСТВА, КОНТРОЛЮ ТА ПОІНФОРМОВАНOSTI У СФЕРІ
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ, ЗДОРОВ'Я ТА БЛАГОПЛУЧЧЯ ТВАРИН В УКРАЇНІ»**

Проект фінансується Європейським Союзом

EuropeAid/139852/DH/SER/UA



Введення

Процес оцінки ризику базується на доказах, систематичному зборі та метааналізі даних та розумінні про проблему ризику з урахуванням наявних наукових знань. Результатом такого процесу є об'єктивна оцінка ймовірності та впливу несприятливого ефекту, що спирається на опубліковані наукові дослідження, звіти про нагляд (surveillance), дані галузі та, за необхідності, експертні судження, отримані з використанням відповідних методів.

Угода про СФЗ настійно заохочує країн-членів базувати свої санітарні заходи на міжнародних стандартах, таких як Кодекс здоров'я наземних тварин МЕБ та Кодекс здоров'я водних тварин МЕБ. Однак за відсутності відповідних стандартів, або коли країни-члени вирішили прийняти більш високий рівень захисту, ніж той, що передбачений такими стандартами, науково обґрунтований аналіз ризиків є важливим для визначення того, чи конкретний товар представляє значний ризик для здоров'я людей або тварин, і якщо так, то які санітарні заходи можна вжити, щоб зменшити цей ризик до прийнятного рівня.

Для цілей цього звіту була використана адаптована методологія МЕБ для оцінки ризику імпорту та здоров'я тварин.

Звіт за результатами проведеної якісної оцінки ризику поширення сказу серед домашніх та сільськогосподарських тварин в Україні підготовлений робочою групою експертів "Аналіз ризику щодо поширення сказу тварин в Україні"¹ під координацією Сектору оцінки ризиків Держпродспоживслужби та за технічної підтримки експертів Проекту ЄС «Вдосконалення законодавства, контролю та поінформованості у сфері безпечності харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в Україні» в рамках діяльності 2.2.1 «Надати допомогу Держпродспоживслужбі для прийняття підходу ЄС щодо аналізу ризиків потенційного поширення хвороб тварин на території України, включаючи принципи зонування, що застосовуються в країнах ЄС, а також з розробки опитувальників для оцінки систем моніторингу безпечності харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в третіх країнах відповідно до законодавства ЄС. Навчання фахівців Держпродспоживслужби щодо проведення оцінки систем моніторингу безпечності харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в третіх країнах».

¹Робоча група експертів "Аналіз ризику щодо поширення сказу тварин в Україні":

Корнієнко Леонід Євгенійович, д-р.вет.н., професор, головний науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Полупан Іван Миколайович, к.вет.н., с.н.с., завідувач науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Романенко Олег Анатолійович, к.вет.н., с.н.с., завідувач лабораторії з вивчення сказу тварин ДНКІБШМ;

Троцький Мар'ян Станіславович, експерт у сфері ветеринарної медицини та тваринництва;

Недосєков Віталій Володимирович, д-р.вет.н., професор кафедри епізоотології, мікробіології та вірусології факультету ветеринарної медицини НУБіП України, МНКЕОРПСДМТУ Проекту ЄС ILCA.

Координатор робочої групи експертів: Катерина Чужакіна, в.о. завідувача сектору з оцінки ризиків Держпродспоживслужби.

Експерти Проекту ЄС ILCA: Міна Барова, ГНКЕОР; Вікторія Лець, МНКЕАРХТ.



ЗВІТ ПРО ПРОВЕДЕНУ ОЦІНКУ РИЗИКУ ПОШИРЕННЯ СКАЗУ СЕРЕД ДИКИХ ТВАРИН В УКРАЇНІ

«ВДОСКОНАЛЕННЯ ЗАКОНОДАВСТВА, КОНТРОЛЮ ТА ПОІНФОРМОВАНІСТІ У СФЕРІ
БЕЗПЕЧНОСТІ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ, ЗДОРОВ'Я ТА БЛАГОПОЛУЧЧЯ ТВАРИН В УКРАЇНІ»

Проект фінансується Європейським Союзом

EuropeAid/139852/DH/SER/UA



Введення

Оцінка ризику - це процес, що базується на доказах, систематично збирає та аналізує поточні дані та знання про проблему ризику з урахуванням наявних наукових знань. Результатом такого процесу є об'єктивна оцінка ймовірності та впливу несприятливого ефекту, що спирається на опубліковані наукові дослідження, звіти про нагляд (surveillance), дані галузі та, за необхідності, експертні судження, отримані з використанням відповідних методів.

Угода про СФЗ настійно заохочує країн-членів базувати свої санітарні заходи на міжнародних стандартах, таких як Кодекс здоров'я наземних тварин МЕБ та Кодекс здоров'я водних тварин МЕБ. Однак за відсутності відповідних стандартів або коли країни-члени вирішили прийняти більш високий рівень захисту, ніж той, що передбачений такими стандартами, науково обґрунтований аналіз ризиків є важливим для визначення того, чи конкретний товар представляє значний ризик для здоров'я людей або тварин, і якщо так, то які санітарні заходи можна вжити, щоб зменшити цей ризик до прийняттого рівня.

Для цілей цього звіту була використана адаптована методологія МЕБ для оцінки ризику імпорту та здоров'я тварин.

Звіт за результатами проведеної якісної оцінки ризику поширення сказу серед диких тварин в Україні підготовлений робочою групою експертів "Аналіз ризику щодо поширення сказу тварин в Україні"¹ під координацією Сектору з оцінки ризиків Держпродспоживслужби та за технічної підтримки експертів Проекту ЄС «Вдосконалення законодавства, контролю та поінформованості у сфері безпеки харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в Україні» в рамках діяльності 2.2.1 «Надати допомогу Держпродспоживслужби для прийняття підходу ЄС щодо аналізу ризиків потенційного поширення хвороб тварин на території України, включаючи принципи зонування, що застосовуються в країнах ЄС, а також з розробки опитувальників для оцінки систем моніторингу безпеки харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в третіх країнах відповідно до законодавства ЄС. Навчання фахівців Держпродспоживслужби щодо проведення оцінки систем моніторингу безпеки харчових продуктів, здоров'я та благополуччя тварин в третіх країнах».

¹ Робоча група експертів "Аналіз ризику щодо поширення сказу тварин в Україні":

Корнієнко Леонід Євгенійович, д-р.вет.н., професор, головний науковий співробітник науково-дослідного епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Полупан Іван Миколайович, к.вет.н., с.н.с., завідувач науково-дослідного вірусологічного відділу ДНДІЛДВСЕ;

Романенко Олег Анатолійович, к.вет.н., с.н.с., завідувач лабораторії з вивчення сказу тварин ДНКІБШМ;

Троцький Мар'ян Станіславович, експерт у сфері ветеринарної медицини та тваринництва;

Недосеков Віталій Володимирович, д-р.вет.н., професор кафедри епізоотології, мікробіології та вірусології факультету ветеринарної медицини НУБіП України, МНКЕОРПСДМТУ Проекту ЄС ILCA.

Координатор робочої групи експертів: Катерина Чужакіна, в.о. завідувача Сектору оцінки ризиків Держпродспоживслужби.

Експерти Проекту ЄС ILCA: Міна Барова, ГНКЕОР; Вікторія Лець, МНКЕАРХТ.