

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

ПОЛУПАН ІВАН МИКОЛАЙОВИЧ

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

ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА
СКАЗУ ТВАРИН

16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія»

Реферат дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора ветеринарних наук

Київ – 2024

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Інституті ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України та Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор, академік НААН
УШКАЛОВ Валерій Олександрович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України
Міністерства освіти і науки України,
професора кафедри ветеринарної епідеміології
та охорони здоров'я тварин

доктор ветеринарних наук, професор
ПАЛІЙ Анатолій Павлович,
Національний науковий центр
«Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини»
Національної академії аграрних наук України,
директор

доктор ветеринарних наук, професор
ПЕТРОВ Роман Вікторович,
Сумський національний аграрний університету
Міністерства освіти і науки України,
завідувач кафедри ветеринарно-
санітарного інспектування, мікробіології,
гігієни та патологічної анатомії

Захист відбудеться «28» листопада 2024 року о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.14 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Володимир МЕЛЬНИК

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. 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 (World Health Organization, 2018).

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 (Іванов М. Ю., 2011; Головка М. А., 2013; Голік М. О., 2019; Антонова Л. А., 2021; Маковська І. Ф., 2021).

Аналіз сучасного стану епізоотичної ситуації зі сказу в світі та Україні свідчить про широке поширення інфекції, не зважаючи на використання різноманітних проти-епізоотичних заходів (Tordo N., 2006; Maki J., 2017; Bannazadeh Baghi H., 2018; Layan M., 2021; Rupprecht C. E., 2023). Стратегія боротьби зі сказом в Україні базується на впровадженні визначеного комплексу антирабійних 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 (Пероцька Л. В., 2008; Гришок Л. П., 2009; Романенко О. А., 2009; Недосеков В. В., 2009; Головка М. А., 2013; Гібалюк Ю. О., 2021).

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 (Meliker J. R., 2011; Biggeri A., 2016; Troupin C., 2017; Vonwitt J., 2018), проводити кластеризацію випадків та формулювання, на основі отриманих результатів, пропозицій щодо покращення існуючої системи боротьби та профілактики цієї летальної хвороби (Müller T. F., 2015; Eckardt M., 2015; Guo D., 2018; Bárcenas-Reyes I., 2019; Ortega-Sánchez R., 2022).

У випадку сказу немає чітких патогномонічних уражень, а також специфічних і постійних клінічних ознак сказу, тому заключний діагноз можна поставити лише в лабораторії (World Health Organization, 2018; World Organisation for Animal Health, 2023).

Доцільність використання реакції прямої імунофлуоресценції (РПФ) для виявлення антигену вірусу сказу була доведена багатьма дослідниками (Beauregard M., 1965; Levaditi J. C., 1973; Baer G. M., 1990; Rudd R. J., 2013). Метод найбільше застосовується у світі та рекомендується Всесвітньою організацією охорони здоров'я і Всесвітньою організацією охорони здоров'я тварин. Реакція прямої імунофлуоресценції відрізняється високою чутливістю та специфічністю (96–99 %) і дає надійні результати на свіжих зразках менш ніж за 2 години (Barrat J., 2006; Rupprecht C. E., 2018; World Organisation for Animal Health, 2023).

Іншим тестом, який дає змогу виявити життєздатність (реплікацію) вірусу сказу у зразках патологічного матеріалу, є ізоляція вірусу в культурі клітин. Вважається, що вірусовиділення в культурі клітин володіє аналогічною чутливістю, що й біологічна проба (Barrat J., 1988; Bourhy H., 1989; Orłowska A., 2014; Zamudio R. M., 2021).

Для ідентифікації вірусу сказу все ширше застосовуються методи аналізу геному, насамперед, полімеразно-ланцюгова реакція. Порівняльні оцінювання методів полімеразно-ланцюгової реакції відповідно до стандартів Всесвітньої організації охорони здоров'я тварин показали чутливість і специфічність, подібну до реакції прямої імунофлуоресценції, і можливість виявляти всі відомі ліссавіруси та застосовуватися як метод рутинної діагностики сказу (Sacramento D., 1991; Whitby J. E., 1997; Heaton P. R., 1997; Nadin-Davis S. A., 1998; Bourhy H., 1999; Smith J., 2000; McElhinney L. M., 2008; Picard-Meyer E., 2012).

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 (Whitby J. E., 2000;

Picard-Meyer E., 2004, 2012; Horton D. L., 2013; Ellison J. A., 2014; Orłowska A., 2014; Beck S., 2017; Fooks A. R., 2017; Bruncker K., 2018).

Нині 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 вірус-нейтралізуючих антитіл (Benmansour A., 1991; Flamand A., 1993; Wandeler A. I., 2006; Дрожже Ж. М., 2016).

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 (World Health Organization, 2018). 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, особливо при інтерпретації результатів, з метою недопущення отримання сурогатних результатів захищеності від інфікування летальною дозою вірусу сказу (Bahloul C., 2005; Moore S. M., 2010, 2021; Zhang J. N., 2022).

Таким чином, дослідження особливостей прояву сказу з використанням інструментів геоінформаційних систем, аналіз комплексу протиепізootичних антирабічних заходів в Україні, а також розроблення 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. Дисертацію виконано 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 та завдання дослідження. Метою роботи була епізоотологічна характеристика прояву сказу в Україні та розроблення 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 сільсько-господарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та запропонувати шляхи її удосконалення;
- розробити спосіб гіперімунізації тварин для отримання гіперімунної антирабічної сироватки;
- створити дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну та оцінити його активність та специфічність в РПФ;
- розробити схему гіперімунізації, 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 на виявлення антигену вірусу сказу при організації раундів міжлабораторних порівняльних випробувань;

- провести оцінку придатності різних перещеплюваних культур клітин та розробити методу 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 імунофлуоресценції), 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).

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертації 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. Новизну підтверджено патентом України на корисну модель «Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові» (№ 110313 від 10.10.2016 р.).

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

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 Ig Y 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*. Новизну розробки підтверджено патентом України на корисну модель «Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну» (№ 118385 від 10.08.2017 р.).

Практичне значення одержаних результатів. Результати досліджень доповнюють і поглиблюють сучасні знання про поширення сказу, можуть бути використані при плануванні та проведенні 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. Проаналізовано сучасну систему боротьби та профілактики сказу серед тварин, розглянуто відповідні стратегії управління з метою зменшення визначених ризиків та 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» (розглянуто та схвалено Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів, протокол № 1 від 24.04.2018 р.).

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

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 р.) та монографію «Лабораторна діагностика сказу» (рекомендовано Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 2 від 23.06.2021 р.).

Розроблено методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин» (затверджено Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 12 від 24.12.2015 р.); «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР» (затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10 від 11.11.2016 р.); «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин» (затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10 від 11.11.2016 р.); «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 9 від 02.11.2023 р.).

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 створено програму наукових досліджень, встановлено мету і завдання роботи, виконано пошук та аналіз наукової літератури за темою роботи, проведено експериментальні дослідження, здійснено аналіз та узагальнення отриманих матеріалів, формулювання висновків роботи і пропозицій виробництву.

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

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

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

Молекулярно-генетичну характеристику ізолятів вірусу сказу з України проведено 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).

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

Апробація результатів дисертації. Матеріали наукових досліджень доповідалися та обговорювалися 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» (м. Київ, 2015 р.); XV Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу та аспірантів «Проблеми ветеринарної медицини та якості і безпеки продукції тваринництва» (м. Київ, 2016 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених Інституту ветеринарної медицини НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2016 р.); XIV Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини (м. Київ, 2016 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інновації у ветеринарну освіту, науку, виробництво» (м. Київ, 2016 р.); XV Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених «Молоді вчені у вирішенні актуальних проблем біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 2016 р.); СВЕР Ukraine Regional One Health Research Symposium (м. Київ, 2017 р.); XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2017 р.); 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» (м. Одеса, 2017 р.); щорічній науково-практичній

конференції молодих вчених Інституту ветеринарної медицини НААН «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2017 р.); науково-практичній конференції «Сказ: ерадикація до 2030 року» (м. Київ, 2017 р.); 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)» (м. Харків, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Інфекційна патологія тварин: сучасні методи діагностики, лікування та профілактики» (м. Дніпро, 2018 р.); Міжнародній науковій конференції «Сучасні епідеміологічні виклики в концепції «Єдине здоров'я»» (м. Тернопіль, 2018 р.); Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (м. Київ, 2018 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2018 р.); науково-практичній конференції «СКАЗ: поділись знаннями. Збережи життя» (м. Київ, 2018 р.); VI Всеукраїнській науково-практичній конференції «Сучасні підходи забезпечення здоров'я тварин та якості кормів і харчових продуктів» (м. Житомир, 2019 р.); СВЕР Ukraine Research Forum & Peer Review Session (м. Київ, 2019 р.); щорічній науково-практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (м. Київ, 2019 р.); IX International conference Bioresources And Viruses (м. Київ, 2019 р.); VIII науково-практичній конференції «Лабораторні дослідження як інструмент забезпечення епізоотичного благополуччя та безпеки харчових продуктів» (м. Київ, 2019 р.); 10th International Scientific and Practical Internet Conference (м. Дніпро, 2020 р.); EURL for Rabies Workshop (м. Нансі, Франція, 2021 р.); International Biothreat Reduction Symposium (м. Київ, 2021 р.); III щорічній міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні епідемічні виклики в концепції «Єдине здоров'я»» (м. Тернопіль, 2021 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Біобезпека, захист та благополуччя тварин» (м. Київ, 2022 р.); Міжнародному симпозіумі зі зменшення біологічної загрози (м. Київ, 2022 р.); Міжнародній науково-практичній конференції, присвяченій 125-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України Продовольча та екологічна безпека в умовах війни та повоєнної відбудови: виклики для України та світу» (м. Київ, 2023 р.).

Публікації. Основні положення дисертації викладено у 47 наукових працях, з яких 2 монографії, 3 статті у періодичних виданнях, включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України, та/або наукових періодичних виданнях, проіндексованих у базах даних Web of Science Core Collection та/або Scopus, 21 стаття у наукових виданнях, включених до Переліку наукових фахових видань України, 3 патенти України на корисні моделі, 5 методичних рекомендації та 13 тез наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Загальний обсяг дисертації викладено на 537 сторінках. Робота включає анотацію, вступ, огляд літератури, вибір напрямів досліджень, матеріали і методи досліджень, результати власних досліджень, аналіз та узагальнення результатів досліджень, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел, додатки. Робота ілюстрована 54 таблицями та 78 рисунками. Список літератури містить 470 джерел, у тому числі 402 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень. Дисертація 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 рр.).

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.).

Віруси. Для отримання культурального антигену вірусу сказу використовували вакцинний штам Щолково-51 К. Для постановки реакції нейтралізації на білих мишах використовували вірус сказу референс-штам CVS. Для постановки реакції FAVN-тест, підготовки контрольних позитивних зразків (мазків-відбитків) та гіперімунізації перепілок використовували вірус сказу референс-штам CVS-11 (ATCC VR 959). Для порівняння фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної діагностики сказу використано 65 позитивних на сказ зразків головного мозку тварин. Для порівняння методів лабораторної діагностики сказу (РПФ, біологічна проба, вірусовиділення в культурі клітин та ЗТ-ПЛР) використали 100 зразків головного мозку тварин позитивних на сказ. 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. Для порівняльного філогенетичного дослідження використано шість ізолятів вірусу сказу з Вінницької, Кіровоградської та Рівненської областей. Для порівняння чутливості різних систем *in vitro* та *in vivo* для виділення вуличних ізолятів вірусу сказу використано 11 ізолятів вірусу сказу.

Культури клітин. У дослідженнях використовували культуру клітин ВНК-21 С13 (ATCC CCL-10), лінію клітин нейробластоми миші Neuro-2a (CCL-131) та перещеплювану лінію клітин нирки сайги.

Лабораторні тварини. У дослідженнях використовували клінічно здорових тварин: білі миші, кролі, перепілки, мурчаки, чорнобурі лисиці. Тварин отримували із віварію Інституту ветеринарної медицини НААН.

Імуностимулюючі препарати. Для дослідження в якості імунологічних ад'ювантів використовували Фоспреніл (Мікро-Плюс, Україна), РБС (Ербіс, Україна), Ронколейкін (Біофарма, Україна), повний і неповний ад'ювант Фрейнда (Imject, США).

Міжнародні стандартні зразки антирабічного імуноглобуліну. Другий міжнародний стандарт імуноглобуліну людини та Стандартна позитивна антирабічна сироватка ВООЗТ.

Антирабічні вакцини, антигени та імуноглобуліни. Антирабічна вакцина «Рабістар» (Укрветпромстач, Україна), серія: № 060614, імуногенна активність 6,96 МО/см³; антирабічна вакцина IndiRab (Bharat Biotech International Limited, Індія), серія 62AN10032, імуногенна активність 5,2 МО/см³; некон'югований рекомбінантний химерний білок вірусу сказу G:N з молекулярною масою 4843,7 кДа (Peptides, ЄС); жовткові антитіла DS1802 (Thermo Fisher Scientific, США), антирабічні вакцини для перорального імунізації диких м'ясоїдних проти сказу «Орісвак» і «Броварабіс V-RG», виробництва ТОВ «Укрветпромстач».

Діагностичні набори. Набір Platelia Rabies Kit II (BIO RAD, США); тест-система BioPro Rabies Elisa Ab (BioPro, Чехія); FITC Anti-Rabies Globulin Kit (Fujirebio Diagnostics Inc., США); флуоресціюючий антирабічний глобулін «Рабітест-РІФ» (ТОВ Біотест-лабораторія, Україна); набір для виділення РНК з патологічного матеріалу QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Великобританія).

Специфічні олігонуклеотидні праймери. JW6DPL (CAATTCGCACATTTTGTG); JW12 (ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG); N165 GTCATTAGAGTATGGTGTTC; JW10P GTCATTAGAGTATGGTGTTC; RabGT1 TACAATGGATGCCGACAAGA; LysGT1 CAAATC TTTGATGGCAGGGTA; LysGT5 GATCCCGATTTGAAAACAGC; LysGT6 AGACCATGGCTCCAGCTAAA.

Сироватки крові. Досліджено протягом 2019–2022 рр. методом FAVN-тест 29732 сироватки крові від собак і котів. Методом ІФА протягом 2018–2022 рр. досліджено 32314 сироваток крові диких м'ясоїдних тварин.

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.).

Якісна оцінка ризику. Оцінка ризику проводилася відповідно до методології МЕБ спочатку шляхом розроблення 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 ґрунтується на рекомендаціях Розділу 2 Кодексу наземних тварин МЕБ щодо проведення якісної оцінки ризиків.

Просторово-часова оцінка прояву сказу. Дослідження просторово часових змін поширення сказу проводили з використання пакету інструментів комп'ютерної програми ESRI ArcMap 10.3. та 10.4. Випадки сказу були географічно прив'язані до центроїду найближчого населеного пункту, в якому було зареєстровано випадок сказу. Географічні координати населених пунктів отримували із сервісу GeoHack – модифікованої версії джерел мап з розширенням Egil Kvaleberg's.

Для визначення географічних територій з високою концентрацією випадків сказу (хотспоти – hot spots) застосовано метод ядерної оцінки щільності (Kernel density estimation – KDE). Для просторово-часової характеристики епізоотичної ситуації зі сказу на території Чернігівської області було використано методику – Emerging Hotspot Analysis. З використанням розрахунку статистики Getis-Ord G_i^* було обраховано статистично достовірні географічні кластери, достовірність яких оцінено за допомогою тесту Mann-Kendall. Щоб виявити просторово-часові кластери випадків сказу на території західних областей України використано модель просторово-часової перестановки, реалізовану в SatScan.

Для того, щоб оцінити зміни у просторовому розповсюдженні випадків сказу впродовж 2018–2022 рр. застосовано інструмент Emerging hot spot analysis з пакету інструментів Space Time Pattern Mining Tools. Крім стандартної візуалізації результатів Emerging hot spot analysis візуалізували результати у вигляді серії 2-місячних часових кроків, що складають часовий розмір комірки просторово-часового куба. Для цього скористалися інструментом Visualize Space Time Cube in 3D. Отриманий шейп файл використали для візуалізації за допомогою бібліотеки ggplot2.

Відсоток позитивних проб розраховували як кількість позитивних проб поділену на загальну кількість зразків, проаналізованих у групі з усієї досліджуваної території або від кожної з областей. Точні біноміальні довірчі інтервали (BCI) у відсотках було розраховано за допомогою пакета EpiTools.

Визначення інфекційної активності вірусу сказу. Титрування інфекційної активності вірусу сказу проводили *in vitro* у відповідних культуральних системах, або *in vivo* за методом Н. Корговські (1974). Титр вірусу розраховували за методом Spearman – Kärber.

Постановка біологічної проби та РПФ. Постановку діагностичних реакцій проводили відповідно ДСТУ 7053:2009 «Ветеринарна медицина. Методи діагностики сказу».

Інактивація вірусу сказу. Концентровану вірусомісну суспензію інактивували β -пропіолактоном виробництва Serva (Німеччина) із ступенем очистки 98,5 % в кінцевій концентрації 1:4000.

Визначення імуногенної активності інактивованих антигенів вірусу сказу та антирабічних вакцин проводили методом НІН (1973).

Методика одержання гіперімунної антирабічної сироватки. В якості тварин-продуцентів обрано дорослих кролів (маса 2,4–2,7 кг). Інокуляцію концентрованого

інактивованого препарату здійснювали чотирикратно внутрішньошкірно в п'ять точок по $0,1 \text{ см}^3$ і внутрішньом'язово в одну точку $0,5 \text{ см}^3$ 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 МО/см^3 . Третю імунізації здійснювали на 35 добу досліду без «Фоспренілу», четверту – на 49 добу з імуностимулюючим препаратом. Відбір крові та отримання специфічної сироватки проводили на 63 добу.

Методика отримання контрольних зразків для проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу. У мишей, інфікованих вірусом сказу (штам CVS-11), після прояву специфічних ознак у стадії агонії відбирали головний мозок, готували 20 % суспензію та мазки-відбитки. Отримані мазки-відбитки висушували на повітрі та фіксували в ацетоні за температури -20°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 гіперімуноної сироватки. Концентрування проводили шляхом висолювання специфічних білків насиченим розчином сульфату амонію. Діалізували проти ФСБ для видалення сірчанокислового амонію, для чого використовують діалізні трубки (Serva, Німеччина).

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 мг; 1,5 і 2 мг на 100 мг білку. Доводили рН до 9,0 за допомогою $0,5 \text{ М}$ розчину Na_2CO_3 . Кон'югацію проводили за температури 4°C впродовж 18 год. Очистку від незв'язаного флуорохрому проводили гель-фільтрацією на колонках із сефадексом G-25. Активність дослідних зразків визначали РПФ у розведеннях від 1:2 до 1:128.

Методика імунізації перепілки антигеном вірусу сказу. Для виготовлення препарату для імунізації перепілки використовували наступні антигени вірусу сказу: штам G 52 Wistar (вакцина IndiRab, серія 62AN10032) та штам CVS-11 (отриманий у лабораторних умовах, титр вірусу $6,23 \pm 0,11 \text{ ТКІД}_{50}/0,05 \text{ см}^3$). Для першої імунізації відбирали препарати по $0,5 \text{ см}^3$, додавали рівний об'єм повного ад'юванту Фрейнда (Imject, США). 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 від перепілок відбирали яйця з 45 доби після початку першої імунізації, виділяли жовткові антитіла та перевіряли у непрямому імуноферментному аналізі, використовуючи як контроль рекомбінантний антиген вірусу сказу – химерний білок G:N (RVG-9R).

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, а потім фільтрували через паперовий фільтр. Додавали хлористий натрій до кінцевої концентрації 9,0 %, після чого доводили рН до 4,0 та залишали на 2 год для преципітації Ig Y. Після чого суміш центрифугували при 3700 г протягом 20 хв.

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). Дослідження чутливості та специфічності дослідних зразків флуоресціюючого імуноглобуліну проводили РПФ в розведеннях від 1:2 до 1:16.

Методика отримання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну. В якості стабілізуючих кріопротекторних середовищ для ліофілізації імуноглобуліну використовували сахарозу, глюкозу, гліцин, желатину та крохмаль картопляний в різних варіаціях. 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 у асептичних умовах. Флакони поміщали в касети, які потім ставили в низькотемпературний холодильник за температури мінус 80±0,5 °С на 10–12 год. Після закінчення терміну заморожування, касети поміщали у вакуумну сушильну установку Alpha 1-4, виробництва фірми MartinChristGmbH (Німеччина) згідно рекомендацій виробника. Визначення активності здійснювали в ТФ-ІФА відразу після ліофілізації та після витримування зразків за температури 37 °С протягом 4 тижнів (тест «швидкого старіння»), що відповідало 2 рокам зберігання за температури мінус 18±2 °С. Калібрування отриманого препарату здійснювали відносно Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини в реакціях віруснейтралізації *in vivo* та *in vitro*.

Постановка зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції. Для постановки зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції 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,); Ензим-мікс (1 одиниця Таq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази). Вода для полімеразно-ланцюгової реакції 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 хв.

Для постановки зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції 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); Ензим-мікс (1 одиниця Таq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази); вода для полімеразно-ланцюгової реакції 5,25 мкл. 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 HES на 3'кінці, а для детекції внутрішнього контролю мічений флуоресцентним барвником SY5.

Для постановки гніздового варіанту зворотно-транскриптазної полімеразно-ланцюгової реакції 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); Ензим-мікс (1 одиниця Таq-ДНК полімерази; 0,1 одиниця урацил-ДНК-глікозилази). Вода для полімеразно-ланцюгової реакції 14,65 мкл. Реакція складалася з 30 циклів. Ампліфікацію виконували в ампліфікаторі PCR System Pro Flex згідно інструкції для проведення роботи. У подальшому зразки поміщали в 1,5 % агарозний гель з лунками, із додаванням 0,004 % етидіум броміду, через який пропускали струм 110 V протягом 35 хв.

Секвенування вуличних ізолятів вірусу сказу. Секвенування зразків проводили з допомогою пари олігонуклеотидних праймерів (JW6DPL, позиція 660–641, та JW12, позиція 55–73), яка використовувалася у зворотно-транскриптазній полімеразно-ланцюговій реакції та секвенатора фірми HELICON «Applied Biosystems ABI PRISM».

Філогенетичний аналіз та біостатистична обробка результатів здійснювалася в програмі MEGA 6.06. Використано послідовності ізолятів вірусу сказу з території України, які отримали при проведенні секвенування, послідовності ізолятів вірусу сказу та вакцинних штамів, які взято із GenBank.

Статистична обробка результатів. У 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 методами варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Microsoft Excel 2010.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ АНАЛІЗ

Характеристика прояву сказу в Україні. *Описово-статистична характеристика прояву сказу в Україні на початку XXI століття.* 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 (*Vulpes vulpes*), 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-зимового 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 поширення сказу в Україні з використання інструментів ГІС. Для здійснення аналізу епізоотії сказу, виявлення просторових і часових закономірностей на сучасному рівні обов'язковою умовою є проведення геокодування випадків сказу.

З використання інструменту Create Space Time Cube для ESRI ArcMap 10.3 здійснено Emerging Hotspot Analysis випадків сказу на території Чернігівської області за 2011–2016 рр. та 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 й ні один з інтервалів не був статистично значимою холодною точкою – coldspot) в центральних і південно-західних районах області. Виявлення цих 18 кластерів має практичне значення, адже територія цих кластерів є стаціонарно-неблагополучними пунктами зі сказу. Виявлено на південному сході області 3 кластери із трендом «новий», що може бути пов'язане із припиненням в попередні роки кампаній з пероральної імунізації диких м'ясоїдних проти сказу на території суміжних областей.

Просторово-часова характеристика прояву сказу на території Волинської, Львівської та Закарпатської областей в 2012–2016 рр. з використанням моделі просторово-часової перестановки SatScan для усіх видів тварин показала кластеризацію випадків (рис. 1).

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 серед лисиць, три серед собак і два серед котів.

Другий кластер (23–29 січня 2013 року) радіусом 15,4 км розташований у центрі Волинської області, на межі зони пероральної вакцинації 2012–2013 рр. Цей кластер включав п'ять випадків сказу (чотири серед лисиць, один у енотовидної собаки).

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 серед лисиць, два серед котів).

Виявлення цих трьох кластерів захворювань, включаючи випадки як серед диких, так і серед свійських тварин (хоча це не підтверджено епідеміологічними чи молекулярно-генетичними дослідженнями), а також наявність кластерів серед лисиць і свійських

м'ясоїдних тварин поблизу один від одного, припускають можливу міжвидову передачу вірусу сказу від лисиць до собак і котів. Крім того, результати підтверджують, що статистично значущі скупчення випадків сказу серед лисиць передували з часом скупченням випадків сказу серед інших видів тварин.

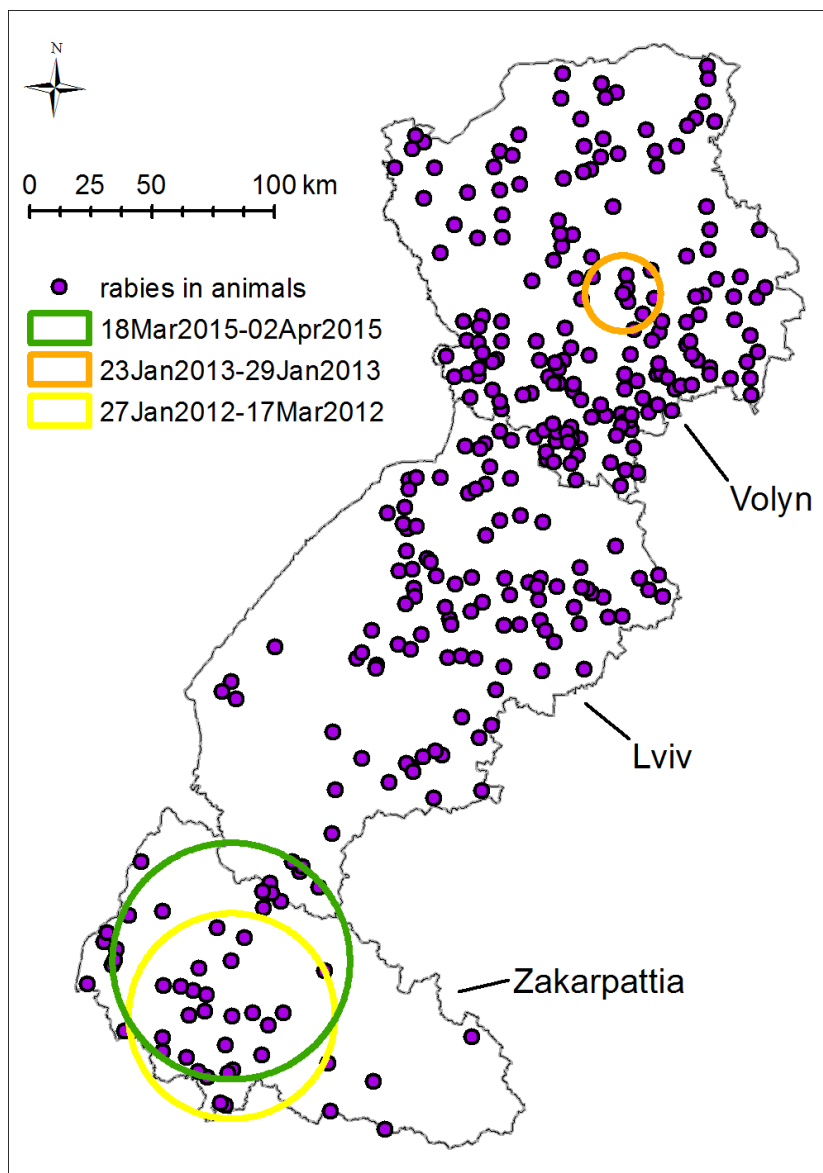


Рис. 1. Просторово-часова кластеризація випадків сказу серед тварин у Волинській, Львівській та Закарпатській областях з 2012 по 2016 рр.

Отже, дослідження 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.

Просторово-часовою оцінкою поширення сказу в Україні протягом 2018–2022 рр. встановлено п'ять видів гарячих кластерів: виявлено дев'ять кластерів Historical Hot Spot в Вінницькій і Черкаській областях, два кластери на межі Вінницької і Черкаської областей Persistent Hot Spot, два кластери Sporadic Hot Spot на території Вінницької області, на території Вінницької області виявлено два кластери Diminishing Hot Spot і на території Хмельницької області виявлено вісім кластерів Oscillating Hot Spot (рис. 2).

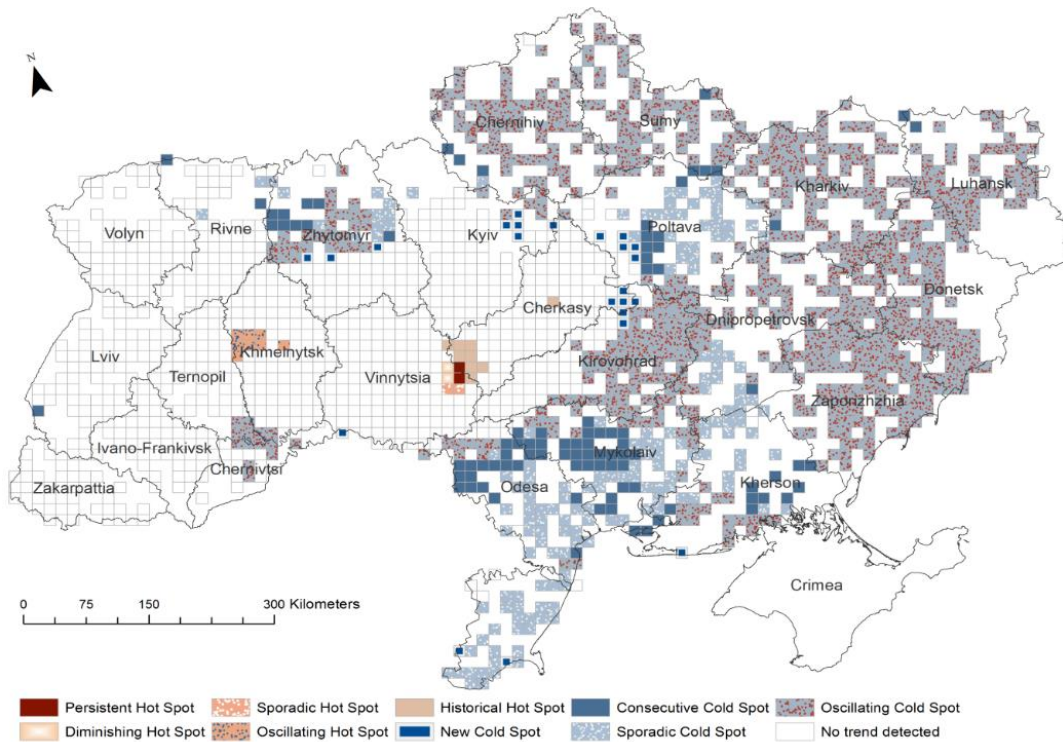


Рис. 2. Emerging hot spot аналіз випадків сказу в Україні в 2018–2022 рр.

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 гарячих кластерів була близько 550 із певними коливаннями. Кількість Cold Spot була близько 100 в кожному двомісячному інтервалі до січня-лютого 2019 року, після чого відмічено тенденцію до збільшення кількості Cold Spot в кожному 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 гарячих кластерів та збільшення кількості холодних. Лише 14 (4 з 95 % достовірністю і 10 з 90 % достовірністю) гарячих кластерів 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 рр. 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 рр. 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.

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 тварин за діючої системи контролю сказу в Україні та формування рекомендацій щодо її удосконалення.

Протягом збору та аналізу даних було ідентифіковано 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 серед 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 неефективності проведення пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин, що сприяє високій ймовірності того, що за існуючої в Україні програми 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 високу ймовірність не проведення вакцинації безпритульних м'ясоїдних тварин, що сприяє поширенню вірусу сказу.

Під час проведення оцінки наслідків було встановлено дуже високу ймовірність поширення сказу серед популяції диких м'ясоїдних тварин саме від невакцинованих диких м'ясоїдних тварин та 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.

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.

З метою удосконалення проведення кампаній пероральної вакцинації лисиць проти сказу розроблено методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу». У рекомендаціях враховано положення відповідного керівництва ЄС, а також сучасні аспекти здійснення повітряного розподілу принад з вакциною і методика фіксування точної локалізації приладами з GPS. Враховані вимоги до антирабічних вакцин, що призначені для пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, вимоги до планування та реалізації цього заходу, а також до контролю його ефективності.

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. було проведено широкомасштабні кампанії пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу. Тому, 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 маркера; 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 р.; в 2020 р. на 160 випадків менше, або на 11,1 % порівняно з 2019 р. В 2021 р. встановлено подальше зниження захворюваності, виявлено на 429 випадків менше порівняно з 2020 р., або на 33,6 % менше.

Дослідження з виявлення біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин проводили методом флуоресцентної мікроскопії. Всього для аналізу ефективності трьох (2018–2020 рр.) кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу проведено 31001 дослідження, з яких позитивних результатів на наявність біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин – 14646. Найвищий показник наявності біомаркера тетрацикліну в зубах диких м'ясоїдних тварин (50,1 %) було виявлено у 2019 р.

Здійснена оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу на території України показала неоднозначні результати. Так, у 2018 р. було виявлено 37,7 % позитивних тварин за серологічними дослідженнями. Однак, у 2019, 2020 і 2021 рр. відсоток позитивних сироваток крові був нижчий: 24,3 %, 18,6 і 15,1 % 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 р. у різних лабораторіях, та, на нашу думку, призвела до завищених результатів в оцінці антирабічної активності сироваток крові лисиць в певних (східних і центральних) областях у 2018 р.

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. Виявлені відмінності у групах сироваток крові можна пояснити низькою якістю сироваток крові, що можуть мати вплив на результат дослідження. Отримані 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.

Загалом оцінка ефективності кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу в 2018–2021 рр. виявила ефективність цього заходу, однак для досягнення належного результату необхідним є формування антирабічного популяційного імунітету не менше ніж у 50 % тварин.

Лабораторна діагностика сказу. Отримання антигену вірусу сказу для розроблення засобів імунофлуоресцентної діагностики сказу. В якості антигену вірусу сказу було обрано для культивування вакцинний штам вірусу сказу Щолково-51 К. Поновлення штаму проводили шляхом пасажування в культурі клітин ВНК-21 С13 (АТСС ССL-10). За результатами експериментальних досліджень отримали вірусомісну суспензію з титром інфекційної активності $6,8 \text{ MLD}_{50}/\text{cm}^3$. У результаті концентрування ПЕГ-6000 отримано вірусомісну рідину в титрі $7,49 \pm 0,2 \text{ MLD}_{50}/\text{cm}^3$. Для інактивації концентрованої очищеної культуральної суспензії вірусу сказу штаму Щолково-51 К застосовували β -пропіолактон в концентрації 1:4000 за температурного режиму $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ з витримуванням впродовж 24 год.

Перевірка отриманого біопрепарату показала його імуногенну активність на рівні $4,2 \text{ МО/см}^3$. Дослідження титрів антитіл до вірусу сказу в лабораторних мишей на 27 добу після імунізації, показало титр $6,22 \text{ МО/см}^3$, що в 12 разів вище мінімального захисного рівня ($\geq 0,5 \text{ МО/см}^3$).

Гіперімунізація тварин для отримання антирабічних сироваток. У результаті досліджень для розроблення схеми гіперімунізації було підібрано імуностимулюючий препарат «Фоспреніл» в дозі 4 мг/гол., який, за експериментального введення лабораторним мишам разом з антирабічною вакциною підвищував показник ефективної дози (ED_{50}) на 15 %, а імуногенність з $6,96 \text{ МО}$ до $11,8 \text{ МО/см}^3$.

Встановлено, що оптимальним видом тварин для проведення антирабічної гіперімунізації 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 ґрундімунізації становив $21,43 \pm 1,96 \text{ МО/см}^3$.

Розроблено схему гіперімунізації, яка полягала у чотирикратному комбінованому введенні кролям внутрішньошкірно в п'ять точок по $0,1 \text{ см}^3$ і внутрішньом'язово в одну точку $0,5 \text{ см}^3$ отриманого культурального антигену вірусу сказу. Ін'єкції «Фоспренілу» проводяться за добу до імунізації та на 21 та 49 добу досліду. Інокуляція антигену для ґрундімунізації здійснювалася на 0 та 21 добу, після чого на 28 добу досліду проводили відбір крові для визначення рівня антирабічних антитіл. Третю та четверту імунізації здійснювали на 35 та 49 добу відповідно, відбір крові та отримання специфічної сироватки – на 63 добу.

Проведені дослідження об'єднаної проби сироваток крові кролів після завершення гіперімунізації показали високі титри антитіл до вірусу сказу – $185 \pm 9,2 \text{ МО/см}^3$ в РН і $212 \pm 10,4 \text{ МО/см}^3$ в ТФ-ІФА.

Отримання дослідного зразка флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну. Здійснено концентрування отриманої антирабічної гіперімуноної сироватки шляхом висолювання білків сульфатом амонію. Після концентрування сироватки імуноглобуліни виділяли за допомогою геліпроникаючої хроматографії в HPLS (Pharmacia) відповідно до вимог виробника. У 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 $327,0 \pm 48 \text{ МО/см}^3$ в РН та $391,6 \pm 64 \text{ МО/см}^3$ в ТФ-ІФА. Концентрація білку становила $28,2 \text{ мг/см}^3$.

Наступним етапом досліджень був підбір оптимальної кількості флуорохрому. Для мічення використовували розчин імуноглобуліну та ФІТЦ із розрахунку 1 мг; 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. Було отримано три зразки флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну для дослідження в РПФ. Встановлено, що оптимальною концентрацією ФІТЦ для реакції кон'югації з антирабічними імуноглобулінами є $1,5 \text{ мг/100 мг}$.

У подальшому проведено ліофільне висушування отриманого зразку. В якості стабілізуючого середовища для ліофільного висушування кон'югату використовували середовище, яке містить сахарозу, гліцин, желатин та $0,1 \text{ М}$ ФСБ (рН 7,2–7,4) в рівних кількостях. Далі, для визначення активності та чутливості кон'югату, проводили постановку РПФ із застосуванням модифікованої методики фіксації мазків мозкової тканини. Встановлено, що дослідний зразок флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну має робоче розведення 1:8, є специфічним ($DSp=100\%$) та чутливим до вірусу сказу ($DSe=96,6\%$).

Отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць. З метою отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць першим етапом було проведення гіперімунізації перепілок, для чого використовували 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 лабораторних мишах зразок № 1 (Ig Y G 52 Wistar 30 мг/см³) володів специфічною активністю на рівні 26,25 МО/см³, а зразок № 2 (Ig Y CVS-11 19,5 мг/см³) – 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 дослідні зразки антирабічного Ig Y досліджували РПФ. Дослідження в РПФ зразків антирабічних Ig Y мічених ФІТЦ показали специфічність тільки зразку № 2, однак із недостатньою активністю робочого розведення – лише 1:2 (рис. 3).

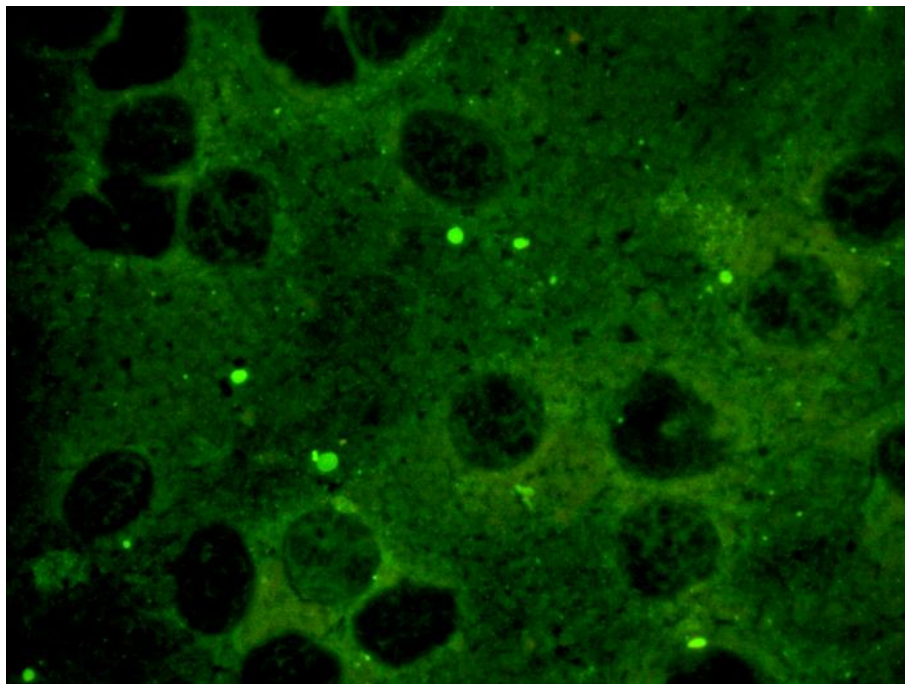


Рис. 3. Позитивний на сказ пат. матеріал (мазок покрашений ФІТЦ-Ig Y CVS-11, робоче розведення 1:2, збільшення $\times 1000$)

Проведені дослідження встановили принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу.

Порівняльна характеристика фіксації мазків-відбитків мозкової тканини хімічним та фізичним способом для імунофлуоресцентної 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 виявилися позитивними на сказ за фіксації обома методами. Із 5 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.

Розроблення стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні. З метою розроблення

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.

Впровадження для підготовки контрольних зразків референс-штаму вірусу сказу та належних принципів характеристики зразків забезпечило умови для розширення сфери акредитації Випробувального центру ДНДІЛДВСЕ відповідно ДСТУ EN ISO/IEC 17043:2014 на показник «Виявлення антигену збудника сказу». Вперше в 2021 році проведено 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)».

Виділення вірусу сказу в культурі клітин. Для розроблення 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 вісім з 11 матеріалів (72,7 %). Neuro-2a (ATCC CCL-131) показала абсолютну чутливість, яка знаходилася на рівні 100 % (виділено 11 з 11 матеріалів) порівняно з результатами біологічної проби на мишах. Низька чутливість до вуличних ізолятів вірусу сказу встановлена у культурі клітин НС, в якій було виділено лише два з 11 (18,2 %) вуличних ізолятів вірусу сказу. За результатами досліджень встановлено, що оптимальною є культура клітин нейробластоми 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 чотирма діагностичними тестами виявлено, що із 100 позитивних на сказ зразків в РПФ, вірусвиділенням в культурі клітин і біологічною пробю підтверджено наявність вірусу у 80 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 год) виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу та володіє чутливістю на рівні біологічної проби на 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.

Детекція вірусу сказу молекулярно-генетичними методами. 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.

Було вивчено ізолят вірусу сказу від кажана та визначено його приналежність до першої філогрупи п'ятого генотипу ліссавірусів тварин (EBLV-1).

У 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 дослідних зразків характерні для ізолятів, які виділяються в географічній зоні степу і лісостепу південно-східної Європи.

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 (рис. 4).

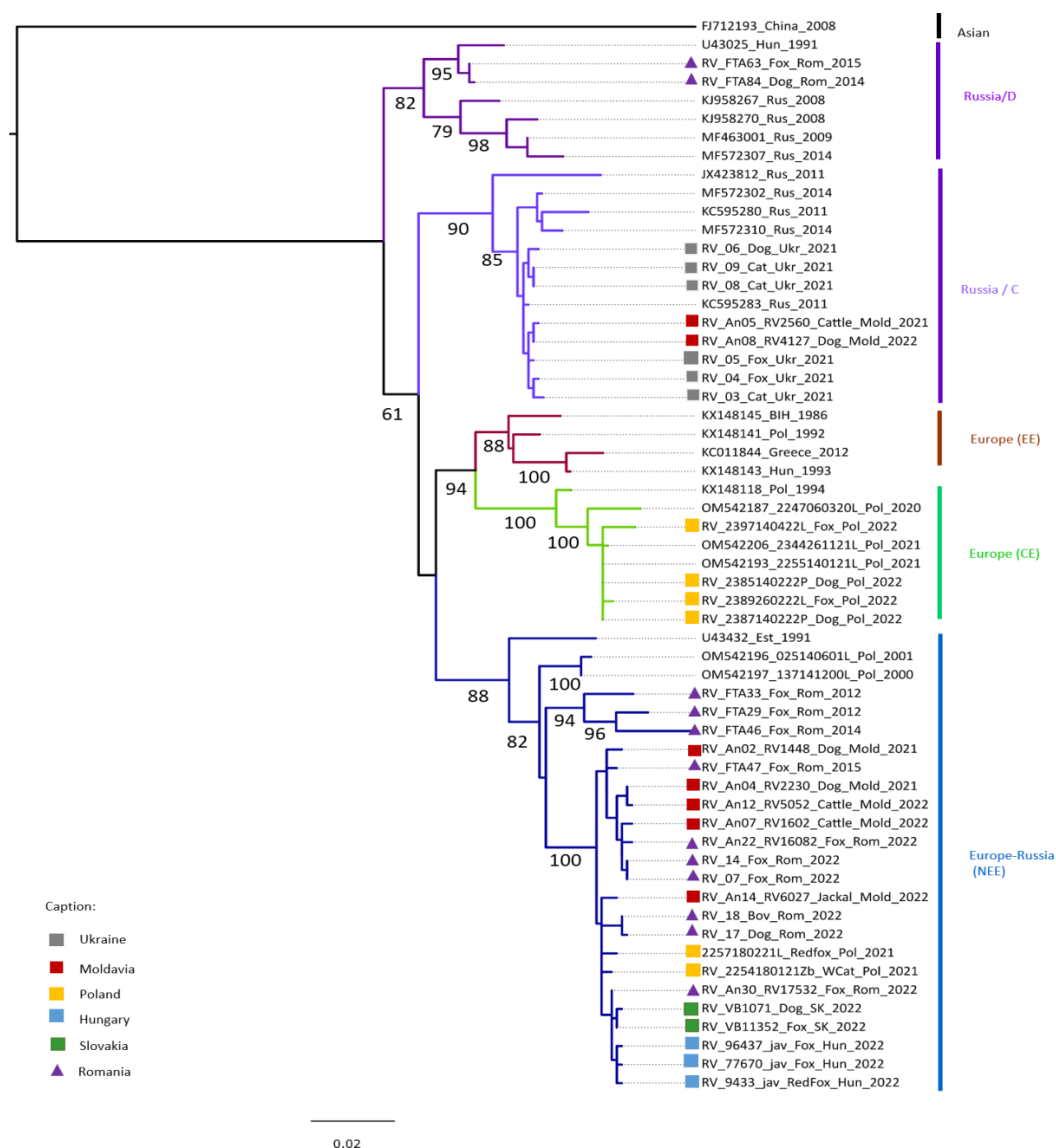


Рис. 4. Філогенетичні зв'язки між усіма послідовностями генів 34 випадків, датованих з 2021 по січень 2023 року, і 2 випадків з 2014–2015 років з послідовностями RABV, що представляють підгрупи NEE, C, EE, SE, WE і D. 100 % гомологічні нові послідовності (n=69) були видалені з аналізу для видимості дерева

Це може бути частковим підтвердженням ефективності буферної зони з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин проти сказу, що проводилася 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 тварин проти сказу дозволили підтримувати імунний пояс шириною щонайменше 100 км, що продемонструвало свою ефективність у попередні роки.

Удосконалення схеми лабораторної діагностики сказу. Запропоновано схему лабораторної діагностики сказу, що передбачає постановку заключного діагнозу методами РПФ та ЗТ-ПЛР із подальшим секвенуванням та філогенетичним аналізом. Представлена 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.

Оцінка антирабічного імунітету. *Створення галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну.* 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 зразку антирабічного імуноглобуліну відносно Другого міжнародного стандарту антирабічного імуноглобуліну людини (30 МО/см^3) показало активність препарату в РН на білих мишах на рівні $11,03 \pm 0,43 \text{ МО/см}^3$, а в FAVN-тест – $11,28 \pm 0,83 \text{ МО/см}^3$.

Розроблений Галузевий стандартний зразок антирабічного імуноглобуліну за своїми характеристиками відповідав необхідним показникам якості, які ставляться перед стандартними зразками, був стабільним за рахунок зберігання в ліофілізованій формі та придатним для визначення антирабічної активності сироваток крові та імуноглобулінів методами *in vivo* та *in vitro*.

Виробнича характеристика спеціалізованих параметрів реакції віруснейтралізації в культурі клітин для виявлення антитіл до вірусу сказу (FAVN-тест). 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 показав необхідність забезпечення контролю за показниками титрів вірусу сказу та стандартної сироватки в кожній реакції, так як стабільність (особливо при зміні серії вірусу сказу, або оновленні лінії культури клітин) цих показників свідчить про якість проведених досліджень і про достовірність отриманих результатів значень дослідних сироваток на наявність антитіл до вірусу сказу.

Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин. Дослідженнями встановлено, що в собак на 14 добу з моменту імунізації спостерігали 100 % захист тварин від зараження вірусом сказу, оскільки титр антитіл був вище мінімально захисного рівня. У сироватках крові котів на 7 добу після вакцинації середній титр антирабічних антитіл знаходився вище мінімально захисного рівня ($1,27 \pm 0,15 \text{ МО/см}^3$). А динаміка росту антитіл до вірусу сказу у сироватках крові собак і котів спостерігалася протягом 27 діб після антирабічної вакцинації.

Аналіз напруженості специфічного імунітету до вірусу сказу серед собак і котів (3927 проб сироваток крові) показав в 57 пробах недостатній рівень (менше $0,50 \text{ МО/см}^3$) антитіл до вірусу сказу, що становить 1,45 %, де 31 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-компаньонів від зараження вірусом сказу, хоча й демонструють значну неоднорідність популяційного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

В іншому досліді було проведено дослідження антирабічної активності сироваток крові безпритульних собак. Дослідженнями встановлено, що у сироватках крові усіх тварин (6 голів) містилися антирабічні антитіла в титрах більше мінімального захисного рівня – $0,5 \text{ МО/см}^3$, в межах $1,12\text{--}5,87 \text{ МО/см}^3$. 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.

Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. Результати досліджень антирабічної активності сироваток крові протягом тривалого зберігання показали, що для сироваток крові заморожування за температури $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ є оптимальною умовою для зберігання. Заморожування зразків показало стабільність та незначні відхилення у збереженні рівня антирабічних антитіл. Після розморожування дослідного зразка сироватки крові в подальшому її слід зберігати за температури $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Однак, зберігання сироваток крові за $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ придатне лише для короточасного зберігання (не більше 14 діб). Повторні цикли температурних перепадів (заморожування-відтаювання) критично впливають на збереженість антирабічних антитіл в сироватках крові, що необхідно враховувати лабораторним фахівцям при плануванні досліджень.

ВИСНОВКИ

У дисертації, із застосуванням комплексу досліджень, охарактеризовано особливості прояву сказу серед тварин, здійснено оцінку протиепізоотичних антирабічних заходів і ризиків поширення сказу, сформовано рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками, запропоновано удосконалену систему 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, створено Галузевий стандарт антирабічного імуноглобуліну та проведено оцінку 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 пресинг на епізоотичну ситуацію зі сказу в Чернігівській області кампаніями з пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин, що були проведені в суміжних областях у 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). У 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. Було встановлено дуже високу 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 гіперімунної антирабічної сироватки, яка полягала у чотирикратному (0 та 21, 35 та 49 добу) комбінованому введенні кролям 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 із ін'єкціями препарату «Фоспреніл» за добу до першої імунізації та на 21 та 49 добу. Використання такої схеми дало змогу отримати сироватку крові з високими титрами антитіл до вірусу сказу – $185 \pm 9,2 \text{ МО/см}^3$ в РН і $212 \pm 10,4 \text{ МО/см}^3$ в ТФ-ІФА.

6. Здійснено розроблення дослідного зразка флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну для РПФ. Для чого сконцентровано антирабічну гіперімунну сироватку крові кролів до активності $327,0 \pm 48 \text{ МО/см}^3$ в РН та $391,6 \pm 64 \text{ МО/см}^3$ в ТФ-ІФА. Визначено оптимальну концентрацію ФІТЦ ($1,5 \text{ мг/100 мг}$) 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 та $81,25 \text{ МО/см}^3$. Дослідження концентрованих дослідних зразків антирабічних Ig Y в FAVN-тест продемонструвало тотожні результати: титр зразку № 1 був в межах $23,39\text{--}30,83 \text{ МО/см}^3$, а зразку № 2 – $70,63\text{--}93,10 \text{ МО/см}^3$. Після мічення ФІТЦ і очистки дослідні зразки антирабічного Ig Y досліджували в РПФ, 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 встановлено абсолютну 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 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 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 польового 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» (*розглянуто та схвалено 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 Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10 від 11 листопада 2016 року*).

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 Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10 від 11 листопада 2016 року*).

Для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу використовувати методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу» (*затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 9 від 02 листопада 2023 року*).

Для біологічної промисловості запропоновано «Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові» (*патент України № 110313 від 10 жовтня 2016 року*); технологічний регламент виготовлення «Галузевого стандарту антирабічного імуноглобуліну» (*затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 13 від 24 жовтня 2016 року*), який може бути використано в серологічних дослідженнях; технологічний регламент виготовлення та контролю ветеринарного імунобіологічного препарату «Тест-система для імунофлуоресцентної діагностики сказу» (*затверджено Вченою радою Інституту ветеринарної медицини НААН, протокол № 10 від 11 жовтня 2016 року*), який може бути використано в лабораторній діагностики сказу.

Для серологічних досліджень напруженості антирабічного імунітету використовувати методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у свійських і диких м'ясоїдних тварин» (*затверджено Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 7 від 24 грудня 2015 року*).

Для використання у навчальному процесі рекомендується монографія «Імунопрофілактика сказу в Україні» до лекційного курсу з дисципліни «Епізоотологія та інфекційні хвороби» (*рекомендовано Вченою радою Національного університету біоресурсів і природокористування України, протокол № 12 від 21 червня 2017 року*) та монографія «Лабораторна діагностика сказу» (*рекомендовано Вченою радою ДНДІЛДВСЕ, протокол № 2 від 23 червня 2021 року*).

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Монографії

1. Полупан І. М., Недосєков В. В., Ничик С. А., Нікітова А. П., Мазур Н. В. Імунопрофілактика сказу в Україні. Херсон, 2017. (*Здобувачем підготовлено аналіз літературних даних щодо особливостей вакцинопрофілактики сказу, оформлено ілюстративний матеріал, підготовлено монографію до друку*).

2. **Полупан І. М.**, Недосєков В. В., Рудой О. В. Лабораторна діагностика сказу. Київ, 2021. *(Здобувачем підготовлено аналіз літератури та оформлено протоколи методів діагностики сказу РППФ, ПЛР, біологічною пробєю, представлено основи філогенетичного аналізу та висвітлено власні результати досліджень, підготовлено монографію до друку).*

**Статті у періодичних наукових виданнях,
включених до категорії «А» Переліку наукових фахових видань України
та/або у закордонних виданнях, проіндексованих у базах даних
Web of Science Core Collection та/або Scopus**

3. **Polupan I.**, Bezymennyi M., Gibaliuk Y., Drozhzhe Z., Rudoi O., Ukhovskyi V., Nedosekov V., De Nardi M. 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*. 2029. Vol. 6. *(Здобувачем сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).*

4. **Polupan I. M.**, Nedosekov V. V., Stepanova T. V., Rudoi O. V., Parshikova A. V., Drozdova E. I. Molecular characteristics isolates of rabies virus isolated from humans in Ukraine. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2021. Vol. 677. 042025. *(Здобувачем проведено відбір патологічного матеріалу, молекулярно-генетичні дослідження, філогенетичний аналіз, аналіз отриманих даних і підготовлено статтю до друку).*

5. 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. 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. 5589201. *(Здобувачем проведено збір зразків патологічного матеріалу, аналіз літератури та отриманих даних).*

Статті у наукових фахових виданнях України

6. 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. *Ветеринарна біотехнологія*. 2014. № 25. С. 71–75. *(Здобувачем здійснено серологічні дослідження та їх аналіз).*

7. Mazur N., Nedosekov V., **Polupan I.** The Role of the FAT in Laboratory Diagnosis of Rabies. *Ветеринарна біотехнологія*. 2015. № 26. С. 232–237. *(Здобувачем проведено аналіз літератури та обрахунок кількості досліджень з підозрою на сказ різними методами).*

8. Мазур Н. В., Мазур М. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. Застосування імуностимулюючих препаратів за антирабічної вакцинації. *Ветеринарна біотехнологія*. 2015. № 27. С. 190–197. *(Здобувачем здійснено підбір препаратів, серологічні дослідження, їх аналіз та математичні обрахунки).*

9. Голік М. О., Недосєков В. В., Карловська К. П., **Полупан І. М.** Характеристика епізоотичної ситуації зі сказу в Україні. *Тваринництво України*. 2015. № 9. С. 16–19. *(Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації, підготовлено карти напруженості та підготовлено статтю до друку).*

10. Мазур Н. В., Недосєков В. В., Ничик С. А., **Полупан І. М.** Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. *Ветеринарна біотехнологія*. 2016. № 28. С. 158–165. *(Здобувачем здійснено гіперімунізацію тварин, проведено серологічні дослідження і підготовлено статтю до друку).*

11. Ничик С. А., **Полупан І. М.**, Мазур Н. В., Хоменко Я. В., Спиридонов В. Г. Чутливість та специфічність антирабічних глобулінів, отриманих на основі Ig Y з перепелиних яєць. *Ветеринарна біотехнологія*. 2016. № 29. С. 196–204. *(Здобувачем здійснено підготовку антигену для гіперімунізації перепілок, проведено серологічні дослідження і дослідження мазків-відбитків в РППФ, підготовлено статтю до друку).*

12. Мазур Н. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. 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. 2017. № 5 (1). С. 48–52. *(Здобувачем здійснено аналіз літератури, підбір середовищ і серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).*

13. Мазур М. В., **Полупан І. М.** Молекулярно-генетична характеристика вуличних ізолятів вірусу сказу виділених на території України. Ветеринарна біотехнологія. 2017. № 30. С. 145–152. *(Здобувачем здійснено підбір ізолятів вірусу сказу, постановку ЗТ-ПЛР, філогенетичний аналіз).*

14. **Полупан І. М.**, Мазур Н. В., Недосєков В. В. Калібрування галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну із сироватки крові кролів. Ветеринарна медицина. 2017. № 103. С. 311–313. *(Здобувачем здійснено аналіз порівняльні серологічні дослідження, підготовлено статтю до друку).*

15. **Polupan I.**, Bezymennyi M., Golik M., Drozhzhe Z., Nychyk S., Nedosekov V. Spatial and temporal patterns of enzootic rabies on the territory of Chernihiv oblast of Ukraine. Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety. 2017. Vol. 3 (2). P. 31–36. *(Здобувачем сформовано базу даних географічних координат випадків сказу, здійснено аналіз отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).*

16. Мазур М. В., Мазур Н. В., **Полупан І. М.** Видова характеристика епізоотії сказу в Україні за 2011–2016 рр. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. 2017. Т. 19. Вип 73. С. 159–162. *(Здобувачем здійснено описово-статистичний аналіз прояву сказу в Україні).*

17. **Полупан І. М.**, Мазур М. В., Голік М. О., Недосєков В. В. Антропургізація сказу в Україні. Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2017. № 265. С. 182–189. *(Здобувачем здійснено аналіз прояву сказу в Україні, визначено основні вектори і причини значного прояву сказу серед свійських тварин, підготовлено статтю до друку).*

18. **Полупан І. М.**, Дрожже Ж. М., Гібалюк Ю. О., Шарай Я. М. Удосконалення системи антирабічних заходів в Україні. Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. 2018. № 1–2 (47). С. 149–152. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, епізоотологічні дослідження, визначено методичні основи повітряного розподілу вакцини для пероральної вакцинації диких тварин проти сказу, підготовлено статтю до друку).*

19. Дзюба Я. М., Рудой О. В., **Полупан І. М.** (2018). Серологічний моніторинг антирабічного імунітету у вакцинованих домашніх м'ясоїдних тварин. Ветеринарна медицина. 2018. № 104. С. 382–385. *(Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).*

20. Маковська І. Ф., Недосєков В. В., **Полупан І. М.**, Латманізова Т. С. Аналіз тренду поширення сказу котів в Україні. Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького. Серія: Ветеринарні науки. 2018. Т. 20. Вип. 92. С. 18–23. *(Здобувачем проведено епізоотологічні дослідження, визначено основні причини прояву сказу серед котів).*

21. Голік М. О., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. Прогнозування епізоотії сказу в Чернігівській області на основі геоінформаційного аналізу. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2018. № 6. (76). <http://dx.doi.org/10.31548/dopovidy2018.06.025> *(Здобувачем здійснено короткостроковий прогноз розвитку епізоотичної аналіз на основі отриманих просторово-часових даних і підготовлено статтю до друку).*

22. Рудой О. В., Дзюба Я. М., **Полупан І. М.** Активність антирабічних антитіл у сироватках крові за різних умов зберігання. Ветеринарна медицина. 2019. № 105. С. 84–87.

(Здобувачем здійснено серологічні дослідження і аналіз отриманих даних, підготовлено статтю до друку).

23. 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. Епізоотологічні та епідеміологічні аспекти сказу в Україні за період 1999–2018 рр. Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування. 2019. № 3. С. 90–109. *(Здобувачем здійснено описово-статистичний аналіз прояву сказу в Україні).*

24. **Полупан І. М.**, Рудой О. В., Ложкіна О. В., Павлунько В. Г., Купневська М. В., Теплих Н. І., Кравченко А. Л., Гібалюк Ю. О. Оцінка ефективності пероральної імунізації диких м'ясоїдних тварин проти сказу (2018–2020 рр.). Ветеринарна біотехнологія. 2021. № 39. С. 96–107. *(Здобувачем здійснено серологічні дослідження, аналіз отриманих даних і підготовку статтю до друку).*

25. Полупан І. М. Реакція прямої імунофлуоресценції в лабораторній діагностиці сказу тварин в Україні. Ветеринарна медицина. 2021. № 107. С. 15–18.

26. Рудой О. В., Дрожже Ж. М., Кардаш О. В., Дедок Л. А., **Полупан І. М.** Розробка стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні. Ветеринарна біотехнологія. 2022. № 40. С. 110–120. *(Здобувачем визначено методичні основи проведення міжлабораторних порівняльних досліджень, проведено отримання і характеризацію контрольних зразків, аналіз отриманих результатів і підготовлено статтю до друку).*

Патенти України на корисні моделі

27. Недосєков В. В., **Полупан І. М.**, Мазур Н. В., Ничик С. А. Спосіб одержання антирабічної гіперімунної сироватки крові: патент України № 110313. 2016. Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-110313-sposib-oderzhannya-antirabichno-giperimunno-sirovatki-krovi.html> *(Здобувачем взято участь у розробленні 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. Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну: патент України № 118385. 2017. Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://uapatents.com/6-118385-sposib-otrimannya-galuzevogo-standartnogo-zrazka-antirabichnogo-immunoglobulinu.html> *(Здобувачем взято участь у розробленні 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. 2023. Міністерство економічного розвитку і торгівлі України. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1743463> *(Здобувачем взято участь у розробленні формули корисної моделі, культуральних дослідженнях та підготовці матеріалів до патентування).*

Методичні рекомендації

30. Дрожже Ж. М., Недосєков В. В., **Полупан І. М.** Методичні рекомендації «Система оцінки антирабічного імунітету у домашніх і диких м'ясоїдних тварин». Київ, 2016. *(Здобувачем підготовлено протоколи методів дослідження антирабічного імунітету).*

31. Мазур М. В., **Полупан І. М.**, Мазур Н. В., Нікітова А. П., Недосєков В. В. Методичні рекомендації «Виявлення РНК вірусу сказу методом ЗТ-ПЛР». Київ, 2017. *(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. Методичні рекомендації «Застосування біостатистичних методів аналізу результатів секвенування за молекулярно-генетичних досліджень сказу тварин». Київ, 2017. *(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. Методичні рекомендації «Планування, організація та проведення пероральної імунізації м'ясоїдних тварин проти сказу». Київ, 2019. *(Здобувачем проведено аналіз літератури, визначено основні етапи проведення пероральної вакцинації диких тварин проти сказу та методи оцінки ефективності цього заходу).*

34. Полупан І. М. Методичні рекомендації «Виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу». Київ, 2023.

Тези наукових доповідей

35. **Polupan I. M.**, Mazur M., Mazur N., Nikitova A., Nychyk S. A. Studies of bat lyssaviruses by RT-PCR. СВЕР Ukraine research forum and peer review session. Київ, 4–8 квітня 2016 року. Р. 69. *(Здобувачем здійснено дослідження ізоляту вірусу сказу від кажана методом ЗТ-ПЛР).*

36. Мазур Н. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. Вибір тварин-продуцентів гіперімунної антирабічної сироватки. Чотирнадцятий міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини. Київ, 6–7 жовтня 2016 року. С. 22–23. *(Здобувачем здійснено аналіз літератури та вибір тварин для гіперімунізації).*

37. Мазур Н. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. Розробка способу отримання антирабічної гіперімунної сироватки крові від кролів. Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин». Київ, 16 червня 2016 року. С. 44–46). *(Здобувачем здійснено гіперімунізацію кролів та серологічні дослідження).*

38. Мазур Н. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. 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». Київ, 19–20 квітня 2017 року. С. 103–104. *(Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).*

39. Mazur N., **Polupan I.**, Drozhzhe Zh., Nedosekov V., Nikitova A. 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 peer review session. Київ, 24–28 квітня 2017 року. Р. 146. *(Здобувачем здійснено підбір патологічного матеріалу і його дослідження в РППФ).*

40. Мазур Н. В., **Полупан І. М.**, Недосєков В. В. Підбір оптимальних умов кон'югації антирабічного імуноглобуліну з ФІТЦ. Щорічна науково-практична конференція молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин». Київ, 22 червня 2017 року. С. 50–51. *(Здобувачем здійснено дослідження патологічного матеріалу в РППФ).*

41. **Полупан І.**, Дрожже Ж., Гібалюк Ю., Мазур М., Нікітова А., Ничик С. Епізоотологічна характеристика захворюваності тварин на сказ в Україні та прогноз епізоотичної ситуації. Third Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium. Київ, 16–20 квітня 2018 року. Р. 76. *(Здобувачем здійснено аналіз епізоотичної ситуації зі сказу).*

42. **Polupan I.**, Hibaliuk Yu., Rudoi O., Dzyuba Ya. Antigenic Activity of Oral Rabies Vaccines for Rabies Vaccination of Wild Carnivorous Animals. Fourth Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium. Київ, 20–24 травня 2019 року. Р. 212. *(Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).*

43. Гібалюк Ю. О., **Полупан І. М.**, Шарай Я. М. Удосконалення системи заходів профілактики сказу в Україні. Щорічна науково-практична конференція молодих вчених

«Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин». Київ, 19 липня 2018 року. С. 28–30. (Здобувачем визначено 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. 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». Київ, 27 червня 2019 року. С. 19–20. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).

45. Rudoi O., Dziuba Ya., **Polupan I.** Impact of temperature of storage of blood sera on titers of antibodies to rabies virus. International Biothreat Reduction Symposium. Київ, 29 червня – 2 липня 2021 року. Р. 77. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом FAVN).

46. Rudoi O., Hibaliuk Yu., **Polupan I.** 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. Київ, 24–27 жовтня 2022 року. Р. 122. (Здобувачем здійснено дослідження сироваток крові лисиць методом ІФА).

47. **Полупан І. М.**, Радзиховський М. Л., Дишкант О. В. Особливості діагностики сказу. Патоморфологія сьогодення. Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 125-річчю заснування Національного університету біоресурсів і природокористування України. Київ, 28–29 вересня 2023 року. С. 44–45. (Здобувачем здійснено моніторингові дослідження та їх аналіз).

АНОТАЦІЯ

Полупан І. М. Епізоотологія та лабораторна діагностика сказу тварин. Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук з наукової спеціальності 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2024.

У дисертації охарактеризовано особливості прояву сказу серед тварин з використанням інструментів геоінформаційних систем, здійснено оцінку проти-епізоотичних антирабічних заходів і ризиків поширення сказу, сформовано рекомендації щодо методів управління виявленими ризиками.

Здійснено розроблення дослідного зразка флуоресціюючого антирабічного імуноглобуліну в РПФ та встановлено принципову можливість отримання антирабічних Ig Y з перепелиних яєць, використання яких є перспективним при конструюванні засобів лабораторної діагностики сказу на основі ФІТЦ.

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.

Апробовано міжнародні протоколи виявлення геному вірусу сказу методом ПЛР в режимі реального часу, ПЛР в агарозному гелі, гніздового варіанту ПЛР та запропоновано схему лабораторної діагностики сказу тварин із використанням удосконалених методів детекції антигену вірусу сказу, виявлення геному із подальшим філогенетичним аналізом послідовностей.

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*.

Проведено серологічні дослідження напруженості антирабічного імунітету серед тварин, що свідчать про захищеність популяцій тварин-компаньйонів від зараження вірусом

сказу, хоча й демонструють значну неоднорідність популяційного імунітету у вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

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.

ANNOTATION

Polupan I. M. Epizootology and laboratory diagnosis of animal rabies. Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Veterinary Sciences on the specialty 16.00.03 "Veterinary Microbiology, Epizootology, Infectious Diseases and Immunology». National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine. Kyiv, 2024.

In the dissertation, the features of rabies manifestation among animals are characterized using the tools of geo-information systems, the assessment of antiepidemiologic rabies measures and risks of rabies spread is made, and recommendations for methods of managing the identified risks are offered.

The development of a prototype of fluorescent rabies immunoglobulin in FAT was carried out and the fundamental possibility of obtaining anti-rabies Ig Y from quail eggs was established, the use of which is promising in the design of means of laboratory diagnostics of rabies based on FITC.

The research proposes the method for isolation of rabies virus in N2a cell culture, 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.

International protocols for the detection of the rabies virus genome by real-time PCR, PCR in agarose gel, hemi-nested PCR have been tested, and a scheme for the laboratory diagnosis of rabies in animals using advanced methods of rabies virus antigen detection, genome detection with subsequent phylogenetic sequence analysis has been tested.

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.

Serological studies of the intensity of rabies immunity among animals have been carried out, indicating the protection of populations of companion animals from infection with the rabies virus, although they demonstrate significant heterogeneity of population immunity in vaccinated domestic carnivores.

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, antibody titer.