

ВІДГУК

опонента на дисертацію ПОЛУПАНА Івана Миколайовича на тему: «ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ ТВАРИН», подану на здобуття наукового ступеня доктора ветеринарних наук за науковою спеціальністю 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія»

Актуальність теми. Сказ – це гостре інфекційне захворювання, за якого вражається центральна нервова система з ознаками поліенцефаломієліту, супроводжується паралічами та завжди закінчується смертю. Розвиток сказу у людини можна попередити введенням вакцини людям та вакцинацією тварин. Вірус нейротропний, тому локалізується тільки в нервових тканинах. Після початку прояву клінічних ознак виділяється зі слиною. Переважно розповсюджувачами сказу є дикі звірі. Зазвичай інфікування у тварин відбувається через укуси або взаємне облизування. Сказ серед тварин перебігає в двох формах: буйній (агресивній) і тихій (паралітичній). Буйна форма найбільш характерна для хижих диких тварин. Вони втрачають відчуття страху перед людьми, з'являються вдень в населених пунктах, в місцях випасу і утримання худоби, нападають на свійських тварин і людей. Так, лисиці при захворюванні серед білого дня заходять до населених місць, ганяються за домашньою птицею та без остраху гризуться з собаками, нападають і на людей. Серед домашніх тварин буйна форма найчастіше характерна для котів. Хворі кішки відрізняються агресивністю відносно людей, собак та інших тварин чи птахів.

При тихій формі сказу, яка найчастіше відзначається при зараженні собак, порушення виражені зовні слабко. У деяких випадках собака залишається ласкавою до господаря і знайомих, намагається облизувати руки й обличчя. Потім занепокоєння і збудливість поступово наростають. Характерно, що собака мовчки підбігає до тварин чи людей і кусає їх. Скажений собака часто лягає і схоплюється, гавкає без причини. В подальшому

розвивається парез мускулатури глотки, що проявляється сильною слинотечею, хрипким уривчастим гавкотом, утрудненим ковтанням.

Сказ – це вірусне захворювання, яке має найвищий рівень смертності серед усіх інфекційних хвороб для людини. Вірус сказу вражає центральну нервову систему і після появи симптомів без вчасно розпочатого лікування стає невиліковним – 100 % хворих людей помирають.

Тому дисертація Полупана Івана Миколайовича є актуальною і присвячена вивченню епізоотології та лабораторної діагностики сказу тварин.

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

Мета 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 сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та запропонувати шляхи її удосконалення;

– розробити спосіб гіперімунізації тварин для отримання гіперімуної 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 методику виділення вірусу сказу в культурі клітин;

– апробувати міжнародні протоколи постановки ПЛР в режимі реального часу, ПЛР в агарозному гелі та гніздового варіанту ПЛР для детекції РНК вірусу сказу;

– провести секвенування та філогенетичний аналіз ізолятів вірусу сказу, виділених від диких і свійських тварин, людей та кажанів на території України;

– теоретично обґрунтувати та розробити схему лабораторної діагностики сказу;

– розробити Галузевий стандарт антирабічного імуноглобуліну, здійснити його калібрування та порівняльну виробничу характеристику;

– здійснити серологічний моніторинг антирабічного імунітету серед вакцинованих свійських м'ясоїдних тварин.

Об'єкт дослідження – сказ.

Предмет дослідження – епізоотична ситуація, лабораторна діагностика сказу, вуличні ізоляти та референс-штам вірус сказу, антирабічні імуноглобуліни, реакція прямої імунофлуоресценції, полімеразно-ланцюгова

реакція, філогенетичний аналіз, культура клітин, сироватки крові, антирабічна активність сироваток крові.

Методи дослідження: епізоотологічні, вірусологічні, серологічні, біохімічні, молекулярно-генетичні, статистичні та біостатистичні методи досліджень.

Наукова новизна. 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, що 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 штаму CVS-11.

Вперше в Україні, в результаті філогенетичного аналізу секвенованих зразків, 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. 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 що підтверджено патентом України на корисну модель «Спосіб одержання Галузевого стандартного зразку антирабічного імуноглобуліну» (№ 118385 від 10.08.2017 р.).

Практичне значення. 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.

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.

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.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися, обговорювалися та отримали схвалення 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. та на ряді конференцій різного рівня протягом 2012–2023 року.

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

Структура та обсяг дисертації. Основний зміст дисертації викладено на 538 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.

Огляд літератури. У цьому підрозділі наведено інформацію, яка в цілому відображає і обґрунтовує дослідження викладені в роботі. Інформацію подано у 4 підрозділах: сучасні методи дослідження прояву сказу серед тварин, протиепізоотичні антирабічні заходи, лабораторна діагностика сказу, антирабічний імунітет. Здобувач в стислій формі, спираючись на останні дослідження в галузі досліджень, детально описав стан проблеми. Зазначений розділ представлено на 55 сторінках.

Матеріали і методи досліджень. Дисертацію виконано протягом 2013–2023 рр. в українських наукових установах на базі Науково-дослідного центру з питань вивчення та профілактики сказу в Україні» Інституту ветеринарної медицини НААН і науково-дослідного вірусологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Окремі дослідження виконано в National Veterinary Research Institute (м. Пулави, Польща) та в Nancy Laboratory for Rabies and Wildlife (ANSES, Франція).

Цей розділ викладено на 50 сторінках та має підпункт матеріал та методи. У розділі наведено інформацію про біоетичні принципи, з урахування яких проводили дослідження.

У підрозділі «Матеріали» наведено інформацію щодо вірусу сказу, культури клітин, поживних середовищ та реактивів, лабораторних тварин, імуностимулюючих препаратів, міжнародні стандартні зразки антирабічного імуноглобуліну, антирабічні вакцини, антигени та імуноглобуліни, діагностичні набори, специфічні олігонуклеотидні праймери.

У підрозділі «Методи» представлено інформацію про методи епізоотологічних досліджень, методику якісної оцінки ризику, методи характеристики прояву сказу на території Чернігівської області, Волинської, Львівської та Закарпатської областей та інших територій. Представлено методику дослідження ефективності різних антирабічних вакцин, дослідження сироваток крові лисиць на наявність антитіл до вірусу сказу після проведення кампанії з пероральної вакцинації.

Завершується розділ методиками статистичної обробки даних.

У подальшому йдуть «**Результати експериментальних досліджень**», що, у свою чергу, складаються з 5 розділів. Розділ присвячено характеристиці прояву сказу в Україні.

У першому підрозділу автор описує сказ в Україні протягом ХХІ століття, де автор наводить інформацію щодо епізоотичних особливостей прояву сказу в різних областях України, враховуючи сезонні, кліматичні та інші фактори, що впливають на розповсюдження сказу. Наводиться також інформація про випадки сказу у людини. Наводиться інформація щодо дослідження поширення сказу в Україні з використання інструментів ГІС. Проведено обробка інформації щодо сказу, яка отримана з Чернігівської, Волинської, Львівської та Закарпатської областей, встановлено закономірності розповсюдження сказу, що в майбутньому стануть ефективним інформаційним ресурсом.

Далі дисертант зупиняється на просторово-часовій характеристиці прояву сказу в Україні протягом 2018–2022 рр. Аналізуючи дані, дисертант приходять до висновку, що визначення просторових тенденцій та ідентифікація кластерів сказу може бути корисним для прийняття рішень щодо ефективного розподілу зусиль для контролю захворювання.

Четвертий розділ здобувач присвятив теоретично-експериментальному обґрунтуванню системи контролю сказу в Україні. Було проведено оцінку ризику поширення сказу серед диких, свійських і сільськогосподарських тварин за діючої системи контролю сказу тварин в Україні та запропоновано заходи,

направлені на її удосконалення. Проведені дослідження направлені на визначення стану з імунізації диких тварин проти сказу та встановлено позитивний ефект для епізоотичного благополуччя територій щодо сказу.

П'ятий розділ присвячено імунофлуоресцентній діагностиці сказу. Дисертант провів отримання антигену вірусу сказу, розробку методики гіперімунізації тварин для отримання антирабічних сироваток, отримання флуоресцентних антирабічних глобулінів на основі Ig Y з перепелиних яєць.

У подальшому наведено інформацію щодо розроблення стандартизованих методичних підходів до організації та проведення міжлабораторних порівняльних випробувань зі сказу в Україні

Шостий розділ здобувач присвятив виділенню вірусу сказу в культурі клітин. Проведено оцінку придатності різних перещеплюваних культур клітин для виділення вірусу сказу. Здобувачем встановлено, що оптимальною культурою клітин для виділення вірусу сказу з патологічного матеріалу є нейробластома миші N2a (ATCC CCL-131).

Сьомий розділ здобувач присвятив детекції вірусу сказу молекулярно-генетичними методами. Увага була приділена лабораторній діагностиці сказу методом ЗТ-ПЛР, молекулярно-генетичній характеристиці вірусу сказу. Була проведена кластеризація та картографування секвенованих зразків та порівняння амінокислотних послідовностей секвенованих зразків з території України із послідовностями виділеними на території сусідніх країн. Запропоновано удосконалення схеми лабораторної діагностики сказу. Здобувач пропонує удосконалення сучасної системи лабораторної діагностики сказу, що повинна передбачати постановку ЗТ-ПЛР, здійснення секвенування та аналіз результатів секвенування зразків, які були виділені від диких тварин (як основного резервуару вірусу сказу в природі), від тварин, які були в безпосередньому контакті з людьми, із застосуванням різноманітних методів біостатистичного аналізу.

Восьмий розділ присвячено оцінці антирабічного імунітету. Здобувач займався створенням 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.

У дев'ятому розділі здобувач проводить **аналіз та узагальнення результатів досліджень**, де порівнює результати своїх досліджень з результатами отриманими іншими дослідниками. Розділ займає 20 сторінок.

Отримані дані оброблено статистично і їх достовірність доведено. Результати досліджень узагальнено у 14 обґрунтованих висновках. Представлено пропозиції виробництву, що заслуговують на впровадження.

Також дисертація містить **додатки**, де представлено публікації автора та результати досліджень.

Зміст реферату відповідає змісту дисертації, висновки ідентичні та відповідають отриманим даним.

Узагальнення, зауваження і побажання. Оцінюючи позитивно дисертацію І. М. Полупана, вважаю за необхідне відмітити наступне:

1. Рис. 3.2 «Видова структура захворюваності тварин на сказ в Україні за 1999–2018 рр.» представлено в чорно-білій гамі, що ускладнює сприйняття наведеної інформації.

2. В тексті зустрічаються друкарські помилки: с. 90 «...вірулецидну активність...», вірно «...віруліцидну активність...»; с. 91 «...виявлені...», вірно «...виявлені...»; с. 113 «...Європейському Союзі...», вірно «...Європейському Союзі...»; «Додатоку», вірно «Додатку»; с. 131 «...культуральнийматрас...», вірно «...культуральний матрас...»; с. 137 «...проведенням...», вірно «проведенням»; с. 207 «...кампаній кампаній...», вірно «...кампаній...»; с. 216 «...с війських...», вірно «...свійських...»; с. 339 «...аанлізуючи...», вірно «...анлізуючи...»; с. 401 «...очищення...», вірно «...очищення...»; «...скаазу...», вірно «...сказу...».

Про те ці недоречності не носять системного характеру і не зменшують цінності представленої роботи.

Питання, що виникли при ознайомленні з дисертацією:

1. Чому для отримання антирабічних ФІТЦ-глобулінів на основі Ig Y автор саме зупинився на перепелиних яйцях. Чим обумовлений цей вибір?

2. У своїй роботі Ви використовуєте препарат «Фоспреніл». Що це за препарат? З якою метою Ви його застосували? Хто виробник?

3. Які переваги має запропонована Вами модифікація стандартного методу фіксації мазків-відбитків мозкової тканини для імунофлуоресцентної діагностики сказу, порівняно зі стандартною?

4. Як, на Вашу думку, впливають воєнні дії на розповсюдження сказу домашніх та диких тварин?

5. Чи відмічали Ви сезонність прояву сказу? Чим вона обумовлена?

6. Згідно отриманих Вами даних «у Волинській, Львівській та Закарпатській області з 2012 по 2016 рр. на території, де діяла програма пероральної вакцинації диких м'ясоїдних проти сказу, показало недостатню ефективність проведених кампаній». Які причини були її неефективності? Які заходи були Вами запропоновані для покращення ситуації?

7. Чим керувався шановний дисертант при виборі в якості антигену вірусу сказу для культивування вакцинний штам вірусу сказу Щолково-51 К.

8. Чи існує сьогодні ефективна система боротьби зі сказом у безпритульних тварин? Які заходи Ви вважаєте необхідно запровадити для підвищення її ефективності?

9. Чим обумовлений висновок здобувача «...було виявлено дуже високу ймовірність неефективності проведення парентеральної вакцинації свійських тварин...» в 3 пункті висновків?

10. Які переваги має використання культури клітин N2a (ATCC CCL-131) до ізолятив вірусу сказу порівняно з результатами біологічної проби?

Відмічені вище зауваження не знижують позитивної оцінки дисертації, а поставлені запитання носять уточнюючий та дискусійний характер.

ВИСНОВОК

Дисертація Полупана Івана Миколайовича на тему: «ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА СКАЗУ ТВАРИН» оформлена відповідно до вимог наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження вимог про оформлення дисертації», відповідає вимогам Порядку присудження та позбавлення наукового ступеня доктора наук, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 17 листопада 2021 року № 1197, є завершеною науково-дослідною роботою, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня доктора ветеринарних наук за науковою спеціальністю 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія».

Опонент
завідувач кафедри
ветеринарно-санітарного інспектування,
мікробіології, гігієни та патологічної анатомії
Сумського національного аграрного університету,
доктор ветеринарних наук,
професор

Роман ПЕТРОВ

ПІДПИС
ЗАСВІДЧУЮ
ПРОВІДНИЙ ФАХІВЕць



Петров Р.В.