

УДК 578.834.1

КПП _____

№ Держреєстрації : 0120U104791

Інв. № _____

Національна академія аграрних наук
Інститут ветеринарної медицини

01151, м. Київ, вул. Донецька 30,
тел/факс (044) 245-78-05

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Інституту
ветеринарної медицини НААН
доктор ветеринарних наук



2021. 12. 14

ЗАКЛЮЧНИЙ ЗВІТ

ПРО РЕАЛІЗАЦІЮ ПРОЕКТУ

за договорами від від «21» жовтня 2020 № 14/01.2020
та «06» травня 2021 № 141/01/0121

ВИВЧЕННЯ МОЖЛИВОЇ РОЛІ ДОМАШНІХ ТВАРИН ЯК РЕЗЕРВУАРУ SARS-COV-2

Реєстраційний № Проекту: 2020.01/0121

Назва конкурсу: «Наука для безпеки людини та суспільства»

Науковий керівник НДР
доктор ветеринарних наук

С.А. Ничик

2021

Рукопис закінчено 10 грудня 2021 р.

Результати цієї роботи розглянуті Вченою радою ІВМ НААН
протокол від „14., грудня № 13

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник проекту,
д-р вет. наук, професор, член-
кор. НААН, директор Інституту
ветеринарної медицини НААН

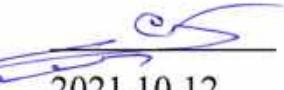
2021.10.12


Сергей НИЧІК
(реферат, вступ, розділи 1,
2, висновки)

Виконавці проекту:

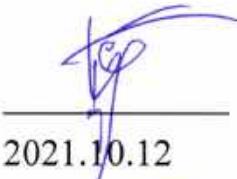
Д-р біол. наук, академік НААН,
професор кафедри технології
молока і м'яса, Сумський
національний аграрний
університет

2021.10.12


Сергій МЕЛЬНИЧУК
(вступ, розділи 1, 2,
висновки)

Д-р біол. наук, ст. наук. сп.
(0,5 ставки), Український
інститут експертизи сортів
рослин

2021.10.12


Борис СОРОЧИНСЬКИЙ
(вступ, розділи 1, 2,
висновки)

Канд. вет. наук, ст. наук. співр.,
зав. Лаб лабораторії зоонозних
інфекцій та оцінки ризиків IBM
НААН

2021.10.12


Олександр ТАРАСОВ
(розділи 1 та 2, висновки)

Канд. вет. наук, ст. наук. співр.,
зав. сектору міжнародної
діяльності та ГІС, IBM НААН

2021.10.12


Наталія ГУДЗЬ
(вступ, розділ 2,
висновки)

Канд. вет. наук, зав. лабораторії
НДНЦДХТ IBM НААН

2021.10.12


Лариса МУЗИКІНА
(вступ, розділ 2,
висновки)

Головний фахівець лабораторії
НДНЦДХТ IBM НААН

2021.10.12


Альона МОЛОЖАНОВА
(розділ 2)

Головний фахівець лабораторії
НДНЦДХТ IBM НААН

2021.10.12


Тетяна СИДОРЕНКО
(розділ 2)

Головний фахівець лабораторії
НДНЦДХТ IBM НААН

Звільнена за
власним бажанням
3 25.08.2021

Олеся ФЕДЬКО

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 124 с., 25 таблиць, 66 рисунків, 63 джерел літератури та 5 додатків на 130 стор.

**COVID-19, SARS-COV-2, ДІАГНОСТИКА, ПОЛІМЕРАЗНА
ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ, ПЛР, LAMP, ВІДБІР ЗРАЗКІВ**

Назва етапу:

Епідеміологічний аналіз поширення збудника COVID-19 Україні та відбір зразків від домашніх тварин в різних за рівнем захворюваності регіонах. Лабораторний аналіз зразків на виявлення специфічних фрагментів геному SARS-CoV-2 з використанням різних технологій ампліфікації. Сіквенс геному штамів коронавірусу, що циркулює в Україні, та їх біоінформаційний аналіз. Просвітницька робота.

Об'єкт дослідження – діагностика, профілактика та елімінація коронавірусу SARS-CoV-2.

Метою виконання проекту в 2021 році було:

- Провести епідеміологічний аналіз поширення захворювання COVID-19 в Україні та визначити населені пункти і окремі господарства для подальшого відбору проб (згідно відкритих даних);
- Здійснити відбір зразків від різних видів домашніх та продуктивних тварин та дослідити їх на присутність фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 методом RT-PCR;
- Оптимізувати умови проведення петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP, loop-mediated amplification) для швидкого і ефективного діагностування вірусу SARS-CoV-2 та встановити чутливість та відтворюваність LAMP методу;
- Здійснити сіквенс геному штамів вірусу SARS-CoV-2 та встановити його можливе походження і здатність до мутацій.

Метою етапу виконання проекту в 2020 році було розроблення та впорядкування нормативно-правих актів з біобезпеки та біозахисту, що стосуються правил поводження з інфікованими SARS-CoV-2 тваринами, їх ізоляції (або утилізації), вимог до відбору і зберігання зразків, протоколів для лабораторної діагностики та прогнозування розвитку епізоотичної ситуації в Україні.

Методи дослідження – аналіз статистичних та експериментальних даних, молекулярно-генетичні методи дослідження (ПЛР, LAMP), біоінформатичні методи, аналіз літературних даних.

Основні результати досліджень:

Протягом звітного періоду 2020 року проведено наступне:

- розроблено нормативні документи, а саме методичні рекомендації з порядку дезінфекції присадибних територій та будівель в господарствах, де виявлені інфіковані тварини, проект інструкції з профілактики та елімінації поширення коронавірусу серед домашніх тварин та інструкції щодо проведення дезінфекції для ліквідації та профілактики захворювань, що викликаються коронавірусом, при виявленні тварин, інфікованих вірусом SARS-CoV-2.

- розроблені практичні рекомендації і стандартні операційні процедури щодо методів відбору проб у тварин, обробки проб (мазків), виділення РНК із зразків в лабораторних умовах та діагностики SARS-CoV-2 за допомогою петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP).

Протягом звітного періоду 2021 року здійснено наступні види робіт:

- проведено епідеміологічний аналіз поширення захворювання COVID-19 в Україні та визначено населені пункти в 6 областях для відбору проб (згідно відкритих даних);
- здійснено виїзди та відібрано 1214 проб у 6 областях України: Львівський, Тернопільський, Хмельницький, Полтавський, Чернігівський та Житомирський від цільових видів тварин;

- методом RT-qPCR з застосуванням комерційної тест-системи Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene) досліджено 1214 проб від тварин та не виявлено специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2.

- оптимізовано умови проведення петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP, loop-mediated amplification) для швидкого і ефективного діагностування вірусу SARS-CoV-2 з урахуванням останніх даних літератури методом RT-LAMP в реальному часі та RT-LAMP з колориметричною оцінкою результату реакції за кінцевою точкою (zmіна кольору реакційної суміші). Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4%, а чутливість для зразків з КТ < 30 на RT-qPCR була 98,5%. Для гену S загальна специфічність склала 92,8%, чутливість для зразків з КТ < 30 – 96,8%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7% , чутливість – 98,5%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75%, а чутливість – 98,5%.

- проведено повногеномне секвенування 8 ізолятів вірусу SARS-CoV-2 та серед секвенованих ізолятів виявлено п'ять субліній варіанту Delta: два AY.33 (B.1.617.2.33), один AY.36 (B.1.617.2.36), один AY.122 (B.1.617.2.122), один B.1.617.2 та два AY.4.2 (B.1.617.2.4.2). Один із восьми ізолятів віднесено до варіанту Alpha, який є представником лінії B.1.1.7;

- актуалізовані СОПи щодо відбору і зберігання зразків, лабораторної діагностики, поводження з інфікованими тваринами, дезінфекції забруднених приватних господарств і приміщень;

- проведено просвітницьку роботу з місцевим населенням у Львівській, Тернопільській, Хмельницькій, Полтавській, Чернігівській та Житомирській областях (в 120 населених пунктах);

- проведено тендер, закуплено та отримано необхідні матеріали для проведення секвенування, систему для секвенування (секвенатор) Ion torrent S5 (ThermoFisher Scientific) та ампліфікатор BioRad1000 із модулем SFX96.

Матеріали та обладнання були використані для виконання завдань проекту, передбачених календарним планом.

Отримані в результаті виконання проекту дані будуть використовуватись в лабораторіях, які проводять детекцію вірусу SARS-CoV-2, а також господарствами різних форм власності та домогосподарствами, які утримують домашніх і продуктивних тварин, для запобігання поширення коронавірусу SARS-CoV-2.

Представлені результати засвідчують, що дослідження, заплановані на 2020–2021 роки, виконані в повному обсязі.

SUMMARY

Research report: 124 p., 25 tables, 66 figures, 63 references, and 5 Appendices on 130 pages.

COVID-19, SARS-COV-2, DIAGNOSTICS, POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR, LAMP, SAMPLING

Stage title:

Epidemiological analysis of COVID-19 spread in Ukraine, and samples collection from selected animals in oblasts with different levels of morbidity. Laboratory analysis of samples for coronavirus SARS-CoV-2 RNA detection using various amplification technologies. The genome sequence of coronavirus strains circulating in Ukraine and their bioinformatics analysis. Outreach efforts.

Object of study – diagnosis, prevention and elimination of coronavirus SARS-CoV-2.

The goals of the project in 2020-2021 were:

- To conduct the epidemiological analysis on the COVID-19 spread in Ukraine and to identify settlements and individual backyard farms for the sampling (according to open source);
- To collect samples from different species of pets and productive animals and test them for the presence of SARS-CoV-2 virus genome fragments by RT-PCR;
- To optimize the loop-mediated amplification (LAMP) assay conditions for rapid and effective detection of the SARS-CoV-2 virus and to validate the sensitivity and reproducibility of the LAMP method;
- To sequence the SARS-CoV-2 virus strains genome and to analyze its possible origin and ability to mutate.

The goal of the project implementation phase in 2020 was the development and adjustment of biosafety and biosecurity regulations regarding the rules for

handling SARS-CoV-2 infected animals, their isolation, requirements for the collection and storage of samples, protocols for laboratory diagnostics and forecasting the development of the epizootic situation in Ukraine.

Methods – analysis of statistical and experimental data, molecular genetic research methods (PCR, LAMP), bioinformatics, analysis of literature data.

The main research results:

During the reporting period in 2020, the following tasks were performed:

- regulatory documents have been developed, namely, guidelines for the procedure for disinfection of backyards and farms buildings, where infected animals are found, draft instructions for the prevention and elimination of the spread of coronavirus among domestic animals and instructions on disinfection to eliminate and prevent the diseases caused by coronavirus in case of detection of animals infected with the SARS-CoV-2 virus.

- practical guidelines and standard operating procedures on the methods of sampling from animals, samples (smears) processing, RNA isolation from samples under laboratory conditions and diagnostics of SARS-CoV-2 using loop isothermal amplification (LAMP) have been developed.

During the reporting period in 2021, the following work was performed:

- the epidemiological analysis on the COVID-19 spread in Ukraine was conducted and settlements in 6 oblasts were identified for the sampling (according to official statistic data);

- field effort trips were completed and 1214 samples from target species of animals were collected in 6 regions of Ukraine: Lviv, Ternopil, Khmelnytsky, Poltava, Chernihiv and Zhytomyr;

- 1214 animal's samples were tested by RT-qPCR using the commercial Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene) and no specific fragments of the SARS-CoV-2 virus genome were detected;

- the loop-mediated amplification (LAMP) technique for rapid and effective detection of the SARS-CoV-2 virus was optimized considering the up-to-date literature sources by the real time RT-LAMP and RT-LAMP with colorimetric

evaluation of the endpoint reaction result (color change of the reaction mix). The overall specificity of the RT-LAMP test for N-gene was 99.4%, and the sensitivity for samples with CT <30 on RT-qPCR was 98.5%. For S-gene, the overall specificity was 92.8%, the sensitivity for samples with CT <30 – 96.8%, the overall specificity of RT-LAMP with colorimetric evaluation of test results for N-gene was 85.7%, sensitivity – 98.5% The overall specificity of RT-LAMP with colorimetric evaluation of test results for S-gene was 75% and sensitivity was 98.5%;

- whole genome sequencing of the 8 SARS-CoV-2 virus isolates was carried out, and among the sequenced isolates five sublines of the Delta variant were found: two AY.33 (B.1.617.2.33), one AY.36 (B.1.617.2.36), one AY. 122 (B.1.617.2.122), one B.1.617.2 and two AY.4.2 (B.1.617.2.4.2). One of the eight isolates was assigned to variant Alpha, which is a representative of lineage B.1.1.7;

- SOPs on sampling and samples' storage, laboratory diagnostics, infected animals handling, disinfection of contaminated private households and premises were updated;

- the outreach efforts were carried out with local people in Lviv, Ternopil, Khmelnytsky, Poltava, Chernihiv and Zhytomyr oblasts (in 120 settlements);

- the tender was held. The necessary materials for sequencing and a system for sequencing (sequencer) Ion torrent S5 (ThermoFisher Scientific) and BioRad1000 thermocycler with SFX96 module were purchased and installed. The materials and equipment were used to perform project tasks scheduled in the calendar plan.

The data obtained as a result of the project will be used in laboratories detecting the SARS-CoV-2 virus, as well as farms of various forms of ownership and households, where pets and productive animals are kept, to prevent the spread of the SARS-CoV-2 coronavirus.

The presented results indicate that the studies planned in 2020-2021 have been fully completed.

ЗМІСТ

Реферат	3
Перелік умовних скорочень	12
Передмова.....	13
Вступ	14
Суть звіту	21
1. Матеріали та методи досліджень.....	21
2. Результати досліджень	30
2.1 Епідеміологічний аналіз поширення збудника COVID-19 Україні та відбір зразків від домашніх тварин в різних за рівнем захворюваності регіонах.....	30
2.2 Відбір біологічних зразків від домашніх тварин у визначених пунктах відбору та їх первинна підготовка для лабораторного аналізу.....	37
2.3 Застосування реакції RT-qPCR для діагностики вірусу SARS- CoV-2.....	64
2.4 Застосування реакції LAMP для діагностики вірусу SARS-CoV-2.....	65
2.5 Секвенування геному штамів коронавірусу, що циркулює в Україні, та їх біоінформаційний аналіз.....	83
2.6 Розробка протоколу відбору проб від домашніх тварин для виявлення специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2.....	103
2.7 Розробка СОПів для лабораторної діагностики коронавірусу методом LAMP.....	104
2.8 Розроблення методичних рекомендацій з порядку дезінфекції присадибних територій та будівель в господарствах, де виявлені інфіковані тварини.....	107

2.9 Розробка інструкції з дезінфекції приміщень при виявленні тварин, інфікованих вірусом SARS-CoV-2.....	108
2.10 Розробка проекту Інструкції з профілактики та елімінації поширення коронавірусу серед домашніх тварин.....	110
2.11 Організація проведення інформаційно-роз'яснюальної роботи з населенням щодо санітарно-гігієнічних заходів для недопущення поширення коронавірусної інфекції серед тварин.....	115
2.12 Придбання необхідних матеріалів та обладнання для виконання проекту.....	116
Висновки	117
Перелік джерел посилання	119
Додатки.....	125

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

SARS-CoV-2	– Severe Acute Respiratory Syndrome-related Coronavirus 2, коронавірус, збудник COVID-19
COVID-19	– гостра респіраторна інфекція, що викликається коронавірусом SARS-CoV-2
ВООЗ	– Всесвітня організація охорони здоров'я
ФАО	– Всесвітня організація продовольства
МЕБ	– Міжнародне епізоотичне бюро
MERS-CoV	– Респіраторний синдром Середнього Сходу
RT-qPCR	– Зворотньо-транскриптазна ПЛР в реальному часі
LAMP	– Петлева ізотермічна ампліфікація
RT-LAMP	– Зворотньо-транскриптазна петлевая ізотермічна реакція
ДНК	– Дезоксірибонуклеїнова кислота
RBD	– Рецептор-зв'язуючий домен
ACE2	– Ангіотензівний фермент
РНК	– Рибонуклеїнова кислота
ПЛР	– Полімеразно-ланцюгова реакція
СОП	– Стандартна операційна процедура

ПЕРЕДМОВА

Відомо, що бактеріальні і вірусні інфекції тваринного походження викликають цілий ряд найбільш поширених і смертельних хвороб людини. Тому, сьогодні вже чітко визначено, що тварини, згідно з зазначеними оцінками, є джерелом приблизно 70% нових або реемерджентних збудників інфекційних захворювань, в тому числі особливо небезпечних.

До них відносяться такі хвороби як: пташиний грип, хвороба, викликана вірусом Ебола, грип (викликаний вірусами А і В), сказ, натуральна віспа, туберкульоз, лихоманка Зіка і інші відомі захворювання.

Тому розуміння того, як починаються і розвиваються нові епідемії, має вирішальне значення для запобігання подальших випадків передачі інфекції людині.

З моменту виявлення першої групи випадків захворювання на атипову пневмонію в китайському Ухані, світові організації (ВООЗ, ФАО, МЕБ) ведуть пошук фактичних даних про те, яким чином вірусу, вдалося перейти від тварин до людини.

Хоча сьогодні першочерговим завданням подолання пандемії залишається розробка і впровадження комплексних і ефективних заходів щодо стримування передачі вірусу від людини до людини і порятунку життя людей, здатність попереджати і припиняти майбутні пандемії залежить від спроможності виявляти природні резервуари і проміжних господарів SARS-CoV-2, а також інші епідемічні виклики, в результаті яких світ зіткнувся з новим вірусом.

ВСТУП

Коронавіруси – представники РНК-вмісних вірусів, що належать до підродини *Coronavirinae*, родини *Coronaviridae* з порядку *Nidovirales*. Більшість коронавірусів людини є бета-коронавірусами [1], до грудня 2019 р. було відомо лише 6 коронавірусів, що інфікують людей (HCoV). Чотири з них, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43 та HKU1, зазвичай, викликають легкі симптоми застуди, а два інших були причиною пандемій в останні десятиліття. Так, у 2002–2003 рр. коронавірус SARS-CoV (збудник атипової пневмонії) спричинив епідемію, в результаті якої рівень смертності склав 10%, а вірус MERS-CoV (коронавірус близько-східного респіраторного синдрому) викликав у 2015 р. пандемію зі смертністю 37% [2]. В кінці 2019 року в м. Ухань, провінція Хубей, Китай, був ідентифікований новий бета-коронавірус, що викликав руйнівні наслідки для здоров'я людей у всьому світі і який спочатку був названий новим коронавірусом 2019-nCov. Секвенування геному вірусу 2019-nCov показало, що його нуклеотидна послідовність на 79,5% відповідає послідовності геному вірусу SARS-CoV, тому Міжнародний Комітет з таксономії вірусів перейменував 2019-nCov в SARS-CoV-2.

Вірус SARS-CoV-2 являє собою одноланцюговий оболонковий РНК-вірус, що відноситься до підроду *Sarbecovirus* роду *Betacoronavirus* [3].

Під час епідемій, обумовлених SARS-CoV та MERS-CoV, був отриманий великий досвід з їх детектування, що є важливим для розробки засобів діагностики вірусу SARS-CoV-2 [4–6].

Пандемічний спалах коронавірусу, який триває досі, був спричинений новим вірусом SARS-CoV-2, який вперше був діагностований у людей в грудні 2019 р. в Китаї (провінція Ухань). Вже 30 січня 2020 року ВООЗ оголосила спалах захворювання, викликаного коронавірусом SARS-CoV-2 надзвичайною ситуацією в галузі громадського здоров'я.

У зв'язку із швидким поширенням майже в усіх країнах світу, Covid-19 був перекваліфікований до категорії пандемії 11 березня 2020 року (ВООЗ, 2020).

Через рік, станом на 10 грудня 2021 року, 265 827 403 підтверджені випадки Covid-19 були зареєстровані в усьому світі, з них понад 5 266 635 (2%) летальних.

В Україні Covid-19 (пневмонія нового типу) вперше був діагностований у березні 2020 року в Чернівцях, а вже 13 березня був зафіксований перший летальний випадок, спричинений вірусом SARS-CoV-2. На початок грудня 2021 в Україні нарахувалось 3 497 477 підтверджених випадків, з них летальних – 88 280.

Пандемічний характер розповсюдження коронавірусу викликає питання чи не може еволюція вірусу бути обумовлена мутаціями в його геномі [7], або наявністю ознак рекомбінантного вірусу штучного або природного походження [8].

Молекулярний аналіз показав, що кажани та гризуни можуть бути джерелом альфа-CoV типу, в той час як птахи є основним резервуаром для гама-CoV та delta-CoV типів вірусу [9]. Не дивлячись на те, що SARS-CoV-2 дуже ретельно досліджується, досі немає однозначної відповіді на питання про те, чи можуть тварини, насамперед, домашні, бути джерелом або проміжним господарем для цього коронавірусу. Вважається, що джерелом SARS-CoV-2 можуть бути кажани [10], а роль проміжного господаря, що забезпечив перенесення вірусу від кажанів до людини, відводиться малазійському панголіну, який нелегально продавався на ринках південного Китаю [11]. Філогенетичний аналіз показав, що коронавірус панголіну (pangolin-CoV-2020), як і група коронавірусів, що циркулює в популяції кажанів різних видів, дійсно генетично пов'язані з SARS-CoV-2, але не було підтверджено припущення, що SARS-CoV-2 утворився безпосередньо з pangolin-CoV-2020 [12] (doi.org/10.1371/journal.ppat.1008421). З метою встановлення потенційного проміжного господаря вірусу, методом ELISA були

проаналізовано 1914 зразків, отриманих від штучно інфікованих тварин, що належать до 35 різних диких та домашніх видів, у т. ч. собак та котів, і всі зразки були негативними [13–15]. Водночас, була показана можливість спонтанного інфікування домашніх собак коронавірусом SARS-CoV-2 від людини [16]. Секвенування геному показало, що так званий «котячий» SARS-CoV-2 належить до філогенетичного кластеру A2a, так само, як і більшість зразків людського SARS-CoV-2, що виділені останнім часом.

Для встановлення ймовірних проміжних господарів SARS-CoV-2 або визначення біотичних факторів поширення збудника на інші види, що є домашніми тваринами та тваринами-компаньйонами, або є синантропними у зоолого-географічному середовищі, важливо визначити, які види тварин можуть бути сприйнятливими до SARS-CoV-2. Як і у всіх представників роду, білок поверхневого шипа (S-білок) опосередковує розпізнавання рецепторів клітин-мішеней та потрапляння у клітини через receptor-зв'язуючий домен (RBD). RBD зв'язується з особливим білком на поверхні таргетних клітин за допомогою ACE2 ферменту (Damas et al., 2020, Yuan et al., 2020) [17, 18]. Спорідненість вірусного S-білка, особливо RBD, до рецептора ACE2 визначає чутливість господаря до зараження коронавірусом (MacLean et al., 2021) [19].

На відміну від SARS-CoV, SARS-CoV-2 також містить багатоосновний локус розщеплення, що дозволяє ферментам господаря розщеплювати S-білок на субодиниці S1 і S2 для більш ефективного інокулювання вірусу в клітину (Hoffmann та ін., 2020) [20]. Нещодавно Лан та ін. (Lan et al., 2020) [21] припустив, що структура S-білка, який зв'язується з рецептором ACE2 людини, має 20 ключових амінокислот для взаємодії з receptor-зв'язуючим сайтом. Дослідження вже показали, що деякі тварини також потенційно чутливі до SARS-CoV-2, оскільки мають той самий receptor ACE2, широко представлений у різних видів ссавців (Abdel-Moneim and Abdelwhab, 2020; Li, 2013) [22, 23]. Генетичні зміни в локусі ACE2 впливають на ефективність, з якою RBD зв'язується з ним, а отже, на сприйнятливість до SARS-CoV-2 (Wan та ін., 2020) [24].

Ряд останніх опублікованих досліджень, що порівнюють послідовності білка ACE2 серед різних видів або моделювання структури S-білка для прогнозування діапазону потенційних чутливих видів ссавців припустили, що через високу консервативність ACE2 рецепторів багато видів домашніх тварин, таких як коти, корови, вівці та кози віднесені до групи з середнім рівнем ризику. Водночас, собаки, коні та свині мають низьку ймовірність зв'язування коронавірусу з ACE2 через природну варіабельність та низьку афінність у них вказаних рецепторних ділянок (Ahmed et al., 2021; Fischhoff et al., 2021; Kumar et al., 2021; Liu et al., 2021) [25–28].

Види тварин, які мають послідовності K31, Y41, N90 і K353, ймовірно, будуть сприйнятливими до інфікування SARS-CoV-2, в той час як інші види, що не мають вказаних фрагментів, очевидно будуть менш сприйнятливими або стійкими до інфекції. Особливе занепокоєння викликають вівці, які можуть виступати в якості носіїв вірусу (Fischhoff et al., 2021) [26].

Крім невідомих на даний час носіїв SARS-CoV-2 і сприйнятливих видів тварин, нові мутаційні варіації SARS-CoV-2 можуть закріпити компенсаторні мутації, які роблять низькочутливі до SARS-CoV-2 види більш сприйнятливими до інфікування (Gu et al., 2020) [29]. Підтверджують здатність SARS-CoV-2 інфікувати лабораторних мишей після кількох послідовних пасажів на відповідних культурах клітин та лабораторних тваринах. Після шести пасажів, була виявлена одна точкова мутація в послідовності, що кодує S-білок, яка дозволила вірусу інфікувати білих мишей.

Швидка поява ще однієї мутації N501T в RBD S-білка неодноразово спостерігалася у норок в умовах норкових ферм (Elaswad et al., 2020) [30] та експериментально інфікованих тхорів (Richard et al., 2020) [31]. Цікаво, що мутація N501T була виявлена майже у всіх послідовностях SARS-CoV-2, отриманих від біологічного матеріалу від норок в США (99%). Дослідження Cai із співавторами (Cai et al., 2021) [32] продемонстрували, що мутація N501T була виявлена спочатку у людей, і лише через два місяці – у норок. Автори

припускають, що нові варіанти вірусу можуть спочатку виникнути у людини, пізніше потрапляючи та закріплюючись в популяції чутливих тварин.

Нові варіанти вірусу, такі як Delta та Epsilon, демонструють значно вищу заразність, пов'язану з мутаціями в домені зв'язування рецептора білка шипа оболонки [33]. Це вимагає тестування якомога більшої кількості людей для своєчасного виявлення нових типів збудника та виявлення безсимптомних носіїв, які можуть несвідомо інфікувати велику популяцію.

SARS-CoV-2 – це одноланцюговий РНК-вірус з розміром геному приблизно 29,9 кб [34]. Капсид утворений з нуклеокапсидного білка (N), який також характеризується додатковою оболонкою. З оболонкою пов'язані три типи структурних білків: білок шипа (S), мембраний білок (M) і білок оболонки (E). Крім цих чотирьох структурних білків (N, S, M і E), геном SARS-CoV-2 також кодує шістнадцять неструктурних білків (NSP1-16).

РНК-залежна РНК-полімераза (RdRp), також відома як NSP 12, відіграє важливу роль у розмноженні коронавірусу [35]. Наприкінці 2020 року було повідомлено про штам B.1.1.7, що стримко поширювався та характеризувався мутацією в білку шипа і мав значно більшу заразність, ніж первинний Уханський штам SARS-CoV2 [36].

З Південної Африки повідомили про ще один швидкопоширюваний варіант SARS-CoV-2 – B.1.351. Про варіанти P.1, P.2 і P3 повідомлялося з Бразилії. Варіант B.1.427/B.1.429 вперше був ідентифікований у Каліфорнії. Перший випадок B.1.525 був зареєстрований у Великобританії. Варіант B.1.526 виник у Нью-Йорку. Нещодавно в Індії повідомили про варіанти SARS-CoV-2, які належать до ліній B.1.617: B.1.617.1 і B.1.617.2 (<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>). ВООЗ уважно стежить за передачею та поширенням нових варіантів SARS-CoV-2. Наприкінці 2020 року ВООЗ віднесла нові варіанти SARS-CoV-2 на категорії, що представляють інтерес (VOI) і Варіанти, що викликають занепокоєння (VOCs). Варіанти з підвищеною трансмісивністю, які можуть змінити епідеміологію COVID-19 та мають підвищену вірулентність, що може знизити

ефективність вакцин, діагностики, терапевтичних засобів тощо, називаються варіантами, що представляють інтерес (VOI), тоді як варіанти, які підвищують тяжкість захворювання, призводить до погіршення епідемічної ситуації та поширюються в кількох країнах, називаються варіантами, що викликають занепокоєння (ЛОС).

Сьогодні варіанти вірусу B.1.1.7 (альфа), B.1.351 (бета), P.1 (гама), B.1.617.2 (дельта) наразі згруповані в ЛОС, тоді як B.1.427/B.1.429 (епсилон), P.2 (Zeta), B.1.525 (Eta), P.3 (Theta), B.1.526 (Iota), B.1.617.1 (Карпа) згадуються як VOI (<https://www.who.int/en/activity/tracking-SARS-CoV-2-variants/>).

Ці дані підтверджують можливість динамічних змін щодо сприйнятливості різних видів тварин, оскільки нові штами SARS-CoV-2 характеризуються новими мутаціями, які можуть сприяти збільшенню спектру чутливих видів тварин, сприяючи утворенню зворотної міжвидової передачі.

Зворотна міжвидова передача вірусу являє собою потенційну проблему для прискорення вірусної еволюції.

У зв'язку із можливістю створення нових резервуарів SARS-CoV-2, швидке виявлення таких мутаційних змін та зниження ризиків передачі від людини до тварини (зворотний зооноз) повинно бути першочерговим завданням на національному та глобальному рівнях.

Проведені зарубіжними авторами (Китай, США, Нідерланди, Данія, Іспанія, Німеччина та ін.) дослідження підтвердили можливість зворотної передачі вірусу від людини до тварин та передачу між достатньо далекими в генетичному відношенню видами. Це підтверджують також повідомлення про інфікування котів, які характеризувалися як безсимптомним перебігом так і вираженими ознаками респіраторного захворювання (Garigliany et al., 2020; Michelitsch et al., 2020; Ruiz-Arrondo et al., 2021; Zhao et al., 2020) [40–43].

Скринінгові дослідження в Італії щодо серопревалентності серед котів та собак, які мешкали в місцях проживання хворих на COVID-19 людей встановили, що 3,3% собак та 5,8% котів були серопозитивними із достовірно високими титрами специфічних антитіл (Patterson et al., 2020) [44].

Підтверджено випадки інфікування кошачих інших видів (леви, тигри, пуми) в умовах зоопарків в США (McAloose et al., 2020) [45].

Про можливість ураження норок свідчать повідомлення інфікування значної кількості ферм по вирощуванню цих видів тварин в Данії, Нідерландах, Греції, Франції та Іспанії (Doma'nska-Blicharz et al., 2021; Fenollar et al., 2021; Schlottau et al., 2020; Rabalski et al., 2020) [46–51].

Однак, об'єму вибірки тварин в опублікованих матеріалах на даний момент недостатньо для того щоб зробити остаточне заключення про можливість певних видів тварин виступати проміжними господарями або природнім резервуаром вірусу.

Моніторингові дослідження в популяції диких, домашніх, зоопаркових та інших тварин є важливим заходом для визначення можливих проміжних господарів для досліджуваного вірусу, що дозволить попередити ймовірні реверсивні зоонози за участю збудника.

Таким чином, поєднання високої трансмісивності та присутності у значної частини людей, які можуть бути носіями вірусу SARS-CoV-2, створює небезпеку передачі вірусу в популяції тварин, де він може циркулювати тривалий час, провокуючи зворотні спалахи серед людей. Отже, моніторингові дослідження на наявність збудника в популяціях тварин різних видів має важливе значення для проведення профілактичних заходів на певних територіях. Активний моніторинг допоможе точно встановити циркуляцію вірусу в популяції таргетних тварин та сприятиме здійсненню оцінки ризиків та впровадженню заходів на локальному та глобальному рівнях.

СУТЬ ЗВІТУ

1. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для виконання поставлених завдань був виконаний аналіз наявних статистичних даних щодо поширення коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні, наявних у відкритому доступі просторових та експериментальних даних, аналіз літературних даних, використано відповідні методи для відбору та обробки зразків та безпосередньо діагностичних досліджень із застосуванням молекулярно-генетичних методів.

1.1 Епідеміологічний аналіз поширення збудника COVID-19 Україні.

Епідеміологічний аналіз поширення збудника Covid-19 Україні був проведений на основі офіційних статистичних даних щодо виявленіх випадків захворювання.

Для вирішення завдань проекту були використані для аналізу наступні джерела даних:

- дані щоденних звітів Міністерства охорони здоров'я (МОЗ) України. Дані про кількість нових виявлень, одужань, летальних випадків і підозр для кожної області України, що оприлюднюються на брифінгах МОЗ України, а також на сайті Ради національної безпеки і оборони (РНБО) України;
- офіційні дані сайту Центру громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я (ЦГЗ МОЗ) України;
- дані щодо обсягів ПЛР- та ІФА-тестування по Україні;
- дані Національної служби здоров'я України (НСЗУ) оновлюються щодня та містять дані про госпіталізації по кожній лікарні України;
- офіційні дані про загальну смертність з усіх причин.

1.2 Відбір проб для оцінки превалентності вірусу SARS-CoV-2 в популяції домашніх тварин.

Відбір зразків (мазки з ротової порожнини, носа, ректальні мазки) від різних домашніх (собаки, коти) і продуктивних тварин (кролі, свині, вівці, кози, ВРХ, коні) в регіонах з високою кількістю зареєстрованих випадків

Covid-19 серед населення і в регіонах з меншою кількістю таких випадків був здійснений у відповідності із дизайном експерименту, який передбачав проведення кластерної вибірки локацій відбору: в кожній області було обрано 5 районів, в межах яких у п'яти населених пунктах було відібрано по 40 зразків від тварин, всього 200 зразків з області.

Протягом звітного періоду було здійснено шість запланованих експедицій: у 4 області України з відносно високим рівнем захворюваності – Львівська, Тернопільська, Хмельницька та Житомирська і в регіони з відносно низьким рівнем поширення вірусу SARS-CoV-2 – Полтавська і Чернігівська області, де разом було відібрано 1214 зразків. Після чого зразки доставлено в лабораторію ІВМ НААН, де було здійснено їх первинну підготовку та проведено дослідження на наявність специфічних фрагментів збудника методом RT-qPCR.

Створення ГІС бази щодо відбору проб від домашніх тварин в Україні було проведено із використанням безкоштовного пакету R studio.

1.3 Лабораторний аналіз зразків на виявлення специфічних фрагментів геному SARS-CoV-2 з використанням РТ-ПЛР.

Виділення РНК із зразків біологічного матеріалу проведено із використанням набору «IndiSpin Pathogen kit» (Indical Bioscience) згідно інструкції виробника.

Детектування специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 проведено з використанням RT-PCR за допомогою комерційної тест-системи Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene, Південна Корея), Ref RV10248X, LOT RV9120H23 згідно рекомендацій виробника на ампліфікаторі планшетного типу BioRad 1000 з модулем SFX96 із застосуванням вбудованого програмного забезпечення.

Оцінку результатів RT-PCR тесту проводили із застосуванням програми SARS-CoV-2 Viewer V1 (Seegene).

1.4 Лабораторний аналіз зразків на виявлення специфічних фрагментів геному SARS-CoV-2 з використанням RT-LAMP та RT-LAMP з колориметричною оцінкою результату реакції за кінцевою точкою (zmіною кольору).

Детектування специфічних фрагментів вірусної РНК також було проведено за допомогою LAMP-технології, яка вбачається альтернативою до ПЛР зі зворотною транскрипцією.

Авторами проекту на основі літературних даних підібрано оптимальний дизайн та комбінації праймерів, що в попередніх експериментах показали свою придатність для діагностики вірусу SARS-CoV-2.

Для проведення досліджень використовували набори праймерів для проведення LAMP, розраховані на ділянки генів: нуклеокапсидний ген N-ген та оболонковий ген S-ген SARS-CoV-2. Послідовності представлено в таблиці 1. Також був застосований набір праймерів для оцінки стану зразків та контролю якості проведення реакції RNase P POP7.

Оптимальні умови проведення ампліфікації були підібрані експериментально, що описано в результатах досліджень (розділ 2).

Перелік використаних праймерів представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

**Перелік праймерів для виявлення специфічних ділянок геному збудника методом LAMP (Wei E. Huang et al., 2020
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>)**

Мішень	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів, 5'-3'
N-ген SARS-CoV-2 (нуклеокапсид)	F3	AGATCACATTGGCACCCG
	B3	CCATTGCCAGCCATTCTAGC
	FIP	TGCTCCCTCTGCGTAGAAGCCAATGCTGCAATCGTGCTAC
	BIP	GGCGGCAGTCAAGCCTTCCCTACTGCTGCCTGGAGTT
	LF	GCAATGTTGTTCCCTTGAGGAAGTT
	LB	GTTCCCTCATCACGTAGTCGCAACAN
S-ген SARS-CoV-2 (оболонка)	F3	TCTTCACACGTGGTGT
	B3	GTACCAAAAATCCAGCCTC
	FIP	CATGGAACCAAGTAACATTG-GAAAACCTGACAAAGTTTCAGATCC
	BIP	CTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGACTTCTCAGTGGAAAGCA
	LF	GAAAGGTAAGAACAAAGTCCTGAGT
	LB	CTGTCCTACCATTAAATGATGGTGT
RNase P POP7 (внутрішній контроль наявності та стану дослідного матеріалу у зразків)	RNaseP- POP7-F3	TTG ATG AGC TGG AGCCA
	RNaseP- POP7-B3	CACCCCTCAATGCAGAGTC
	RNaseP- POP7-FIP	GTGTGACCTGAAGACTCGGTTTAGCCACTGACTC GGATC
	RNaseP- POP7- BIP	CCTCCGTGATATGGCTCTCGTTTTCTTACATGGCT CTGGTC
	RNaseP- POP7-LF	ATGTGGATGGCTGAGTTGTT
	RNaseP- POP7-LB	CATGCTGAGTACTGGACCTC

Результат ампліфікації РНК вірусу SARS CoV-2 реєстрували на каналі флуоресценції FAM/SYBR. Облік результатів ПЛР аналізу проводиться за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу Ct. Результати аналізу вважаються достовірними, якщо значення Ct по каналам FAM /SYBR позитивних контрольних зразків менше або дорівнює 35 ($Ct \leq 35$).

The RT-LAMP була проведена із використанням інтеркалуючого барвника SYTO 16 (Life technologies, Carlsbad, CA, United States) як маркеру

для моніторингу реакції в реальному часі на приладі Rotor-Gene Q 6000 (QIAGEN, Germany).

Постановку реакції проводили за протоколом, розробленим учасниками проекту (СОП Виявлення вірусу SARS-CoV-2 методом ізотермічної ампліфікації (LAMP) (Додаток А).

Для проведення робіт щодо оптимізації умов проведення RT-LAMP для швидкого і ефективного діагностування вірусу SARS-CoV-2 було використано генетичний матеріал вірусу, виділений із зразків від людей, хворих на Covid-19, наданих Центром громадського здоров'я МОЗ України.

1.4 Секвенування вірусу SARS-CoV-2 на основі NGS технології на приладі Ion Torrent S5 (Thermo Fisher Scientific, USA).

Оскільки на сьогодні було опубліковано обмежену кількість досліджень, що стосуються комерційних панелей для секвенування вірусу SARS-CoV-2, тому для забезпечення достатньої ефективності досліджень з секвенування вірусних геномів для цього використовували панель Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 (Thermo Fisher Scientific), яка складається з двох пулів праймерів.

Першим етапом проведення секвенування є кількісне визначення вірусу SARS-CoV-2 в зразках методом ПЛР у реальному часі та збагачення кількості кДНК для наступних етапів проведення секвенування.

Для цього виділену із зразка РНК зворотньо транскрибували в кДНК із застосуванням комерційного набору Invitrogen™ SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) за протоколом, наданого виробником. Для ефективної роботи необхідно отримати високу концентрацію вірусної РНК ($C_t = 20$ та вище).

Синтез ДНКази, обробленої та комплементарної ДНК (кДНК)

Вірусна РНК із ізолятів може бути зворотно транскрибована за допомогою набору Ion Torrent™ Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific), протокол (Thermo Fisher Scientific, MAN0006735 rev. F.0): 2 мкл 5X реакційної суміші, 1 мкл 10X суміші ферментів SuperScript™, вірусна РНК (10 нг) та вода, до кінцевого об'єму 10 мкл. Реакцію RT рекомендується

проводити в 96-лунковому термоциклері при 42°C протягом 30 хв з наступною витримкою 5 хв при 85°C.

Підготовка бібліотек для секвенування

Бібліотеки для секвенування готували за допомогою набору Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 (Thermo Fisher Scientific) для повного секвенування вірусного геному згідно інструкції, наданої виробником. Ця панель базується на 247 ампліконах, з яких 237 є специфічними для послідовності геному SARS-CoV-2, розміри секвенованих областей геному коливаються від 54 до 232 п.н., а інші амплікони використовуються в якості контрольних. Панель складається з двох пулів праймерів: пул праймерів 1, що містить 125 пар праймерів (120 специфічних для SARS-CoV-2 та 5 контрольних) та пул праймерів 2, що містить 122 пари праймерів (117 специфічних для SARS-CoV-2 та 5 контрольних). Довжини ампліконів, що варіюються від 125 до 275 п.н., дозволяють проводити секвенування SARS-CoV-2 на платформі Ion Torrent за технологією NGS.

Панель дозволяє проводити секвенування 99% геному SARS-CoV-2, охоплюючи геном від положення 43 до положення 29 842 (положення, пов'язані з контрольною послідовністю вірусу). Панель пропускає лише перші 42 і останні 61 нуклеотиди послідовності SARS-CoV-2, щоб врахувати точки контакту праймерів. Панель розроблена з використанням стратегії перекриття ампліконів, яка дозволяє двічі секвенувати вірусний геном із перекриттям, використовуючи різні пари праймерів. Ця стратегія забезпечує більшу точність при визначенні варіанту послідовності, оскільки наявність варіанту лише в одному з двох ампліконів, що охоплює певну область, є попередженням про потенційні похибки секвенування та підкреслює необхідність подальших перевірок отриманої послідовності.

Бібліотеки готували відповідно до рекомендацій наданих виробником.

Для зразків процес ампліфікації кДНК виконували з використанням 5 мкл кДНК, 4,5 мкл 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix та 8,5 мкл води без нуклеаз. Потім цю суміш розділили на дві різні пробірки і 2 мкл кожної з 5X Ion

AmpliSeq™ пулів 1 та 2 додавали до відповідних пробірок. Температурний цикл проводили з використанням таких умов: активація ферменту протягом 2 хв при 98°C, а потім 12 циклів при 98°C протягом 15 с і 60°C протягом 4 хв. Зразки можуть також бути збагачені також підсилювались за допомогою 15-20 додаткових циклів ПЛР.

Наступним кроком ампліфікати з кожного зразка об'єднували разом і додавали 2 мкл реагенту для очистки праймерів (Thermo Fisher Scientific), і суміш інкубували протягом 10 хв при 50°C, 10 хв при 55°C та протягом 20 хв при 60°C. Потім додавали 2 мкл розведених адаптерів штрих-коду Ion Xpress™ разом з 4 мкл розчину лігазного адаптеру та 2 мкл ДНК-лігази для лігування адаптерів до ампліфікованих продуктів, і зразки інкубували протягом 30 хв при 22°C, 5 хв при 68°C та 5 хв при 72°C.

Після лігування кожну бібліотеку очищали реагентом Agencourt™ AMPure™ XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), а потім ампліфікували 50 мкл Platinum™ PCR SuperMix HiFi і 2 мкл суміші праймерів для посилення бібліотеки, використовуючи такі умови: 2 хв при 98°C, 5 циклів по 15 с при 98°C і 1 хв при 64°C.

Ампліфіковані бібліотеки очищали за допомогою відповідних наборів та встановлювали остаточну концентрацію кожної бібліотеки кДНК із кодованим тагом, дотримуючись рекомендацій виробника.

Бібліотеки Ion Ampliseq мають додаткові ~ 80 п.н. за рахунок адаптерів штрих-коду (MAN0015830, редакція B.0), отже, для кращого опису представлення очікуваного розміру амплікону панелі, 80 п.н., що представляє штрих-коди та адаптери, під час підготовки бібліотек додаються до кожного продукту ампліфікації, при цьому більшість цільових областей становлять розмір 200–300 п.н. Цей розподіл використовувався для оцінки точності підготовлених бібліотек: чим більше отриманий розподіл відповідає очікуваному, тим точнішою є бібліотека. Концентрацію бібліотеки визначали в діапазоні розмірів 200–370 п.н. і виражали в пмолях. Для проведення

досліджень використовували 100 пмоль розчини бібліотек, з яких готували 20 пмоль розчин перед внесенням реагентів для наступного збагачення бібліотек.

Бібліотеки зі штрих-кодом розбавляли до 20 pM, об'єднували в однакові об'ємні аліквоти, а потім завантажували на прилад Ion One Touch (Thermo Fisher Scientific) для проведення емульсійної ПЛР наступного збагачення та завантаження на чіп для безпосереднього секвенування на приладі Ion Torrent S5.

Аналіз даних секвенування. Результати, отримані після секвенування були узгоджені із послідовністю референсного уханського генома NCBI Ухань-1 (номер в генбанку: MN908947.3) у Torrent Suite v. 5.10.1 або іншому програмному забезпеченні із використанням відповідних плагінів: Аналіз покриття (v5.10.0.3), Caller variant (v.5.10.1.19), обидва з “Generic - S5 / S5XL (510/520/530) - Somatic - Low Stringency” та “Generic- Параметри за замовчуванням S5 / S5XL (510/520/530)-Germ Line-Low Stringency і COVID19AnnotateSnpEff (v.1.0.0), плагін, спеціально розроблений для SARS-CoV-2, який може передбачити ефект точкових мутаційних замін. Програмне забезпечення Integrative Genomic Viewer_2.8.0 (IGV) використано для візуалізації файлів-TVC кожного зразка з метою перевірки узгодженості послідовності нуклеотидів.

Загалом, за застосування рекомендованих наборів та обладнання можливо отримати оптимальну якість бібліотек та відповідно найвищу якість результатів секвенування.

Для NGS рекомендований протокол забезпечує отримання результатів з високою конкретною цільовою специфікою та рівномірністю охоплення зчитування. При цьому за літературними даними 99,9% згенерованих зчитувань було порівняно з геномом SARS-CoV-2 з рівномірністю охоплення понад 96%. При цьому застосований метод дозволяє встановити мутації в геномі SARS-CoV-2, в тому числі ще невідомі.

Важливим фактором є об'єм зчитування послідовностей, який для геному SARS-CoV-2 повинен складати не менше 1 мільйону зчитувань, що є

мінімально достатнім для отримання повної послідовності геному цього вірусу. Ми отримали більше 1 млн зчитувань на зразок.

Для первинної обробки і аналізу даних використано програмне забезпечення TorrentSuite 5.16.1 із додатковими плагінами: SARS_CoV_2_variantCaller 5.16.0.5, COVID19AnnotateSnpEff 5.16.0.5, IRMAreport 1.3.0.2, SARS_CoV_2_coverageAnalysis 5.16.0.4, generateConsensus 5.16.0.10. TorrentSuite постачається виробником обладнання і встановлене на вбудованому у секвенатор IonTorrent™ сервері. На сервер завантажено референсну послідовність вірусу SARS-CoV-2 ізоляту Wuhan-Hu-1, на яку проводилось вирівнювання наших послідовностей, номер в GenBank: NC_045512.2 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512).

Для оцінки якості ізолятів, визначення мутацій, визначення філогенетичної приналежності використали веб інструменти Nextclade 1.10 (<https://clades.nextstrain.org/>) [52], UShER (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPhyloPlace>) [53], Coronavirus Antiviral & Resistance Database: SARS-CoV-2 Mutations Analysis tool (<https://covdb.stanford.edu/sierra/sars2/by-patterns/>) [54]. Візуалізацію філогенетичного дерева отримали за допомогою веб реалізації інструменту Auspice (<https://auspice.us/>) (Hadfield et al.) [55]

1.5 Статистичний аналіз

Всі дані були проаналізовані за допомогою програмного пакету R [56] включаючи модулі tidyverse [56] і ggplot2 [57].

Розрахована специфічність аналізу RT-LAMP та його чутливість для даного інтервалу СТ була відображена як частка всіх зразків із значенням RT-qPCR СТ у тому інтервалі, який був позитивним у аналізі RT-LAMP.

Довірчий інтервал (95%) був розрахований шляхом інтерпретації отриманих значень як біноміальних показників за допомогою критерія Вільсона для біноміальних довірчих інтервалів, який реалізовано в пакеті R – модуль binom [58].

2. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Епідеміологічний аналіз поширення збудника COVID-19 Україні та відбір зразків від домашніх тварин в різних за рівнем захворюваності регіонах.

З метою епідеміологічного аналізу поширення коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні для визначення пунктів відбору проб та статистичних даних щодо розвитку епідемії Covid-19 в Україні, було проаналізовано дані у відкритому доступі, а саме: дані про надлишкову смертність в Україні протягом року, кількість випадків захворювання в розрізі регіонів, динаміку основних епідеміологічних показників та прогностичні моделі.

У таблиці 2 викладені дані про надлишкову смертність разом з даними про смертність від нового коронавіруса та їх співвідношення. Відношення числа підтверджених померлих через коронавірус SARS-CoV-2 та надлишкової смертності можна умовно оцінювати як частку виявленої надлишкової смертності, що виступало одним із факторів вибору областей для відбору проб. Згідно із дизайном експерименту, ми відбрали 6 областей з метою подальшої екстраполяції отриманих результатів на інші регіони України. Фактично відібрани області розташувались в регіонах – «Центр та Північ», «Захід 1» та «Захід 2», які на момент визначення місць відбору проб мали високий рівень захворюваності серед населення.

Таблиця 2

Оцінка надлишкової смертності у регіонах за місяцями 2021 року, порівняно з середнім показником за 2015–2019 роки (дані ДССУ)

Місяці	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Україна	-6,2%	-2,5%	-7,2%	-5,9%	-12,6%	4,6%	3,0%	-0,5%	14,0%
Вінницька	-8,2%	-4,1%	-9,3%	-5,9%	-13,6%	4,8%	5,7%	-2,3%	12,7%
Волинська	-7,8%	-3,7%	-5,1%	-9,5%	-11,5%	13,3%	6,1%	2,8%	17,3%
Дніпропетровська	-3,6%	-2,4%	-7,3%	-5,3%	-12,5%	2,2%	-0,9%	-3,4%	10,4%
Донецька	3,0%	6,7%	-10,0%	-25,9%	-28,6%	-16,5%	-16,2%	-15,1%	-2,7%
Житомирська	-5,5%	-5,4%	-9,8%	-3,8%	-13,6%	10,6%	-0,6%	-3,4%	10,4%
Закарпатська	-7,0%	-4,2%	-3,5%	-3,9%	-6,2%	17,7%	28,5%	11,8%	19,4%
Запорізька	-2,2%	-4,8%	-6,1%	-4,5%	-13,8%	0,7%	1,4%	-7,3%	7,0%
Івано-Франківська	-10,2%	-4,9%	-5,6%	3,0%	-7,1%	11,3%	16,4%	18,3%	27,6%
Київська	-2,4%	3,6%	-4,2%	-1,3%	-5,7%	13,8%	5,6%	1,7%	20,4%
Кіровоградська	-12,8%	-5,0%	-4,0%	2,3%	-5,6%	4,6%	8,9%	-2,2%	6,1%
Луганська	3,6%	9,5%	1,1%	-20,1%	32,2%	-17,5%	-11,5%	-3,0%	20,5%
Львівська	-7,5%	-7,9%	-7,4%	3,0%	-10,5%	12,5%	20,5%	26,0%	29,7%
Миколаївська	-14,1%	-6,5%	-11,4%	-1,1%	-13,2%	0,8%	3,1%	-9,5%	12,6%
Одеська	-6,5%	-3,9%	-10,5%	-6,4%	-12,9%	-0,9%	4,0%	-1,0%	15,3%
Полтавська	-10,7%	-4,8%	-7,1%	-8,3%	-13,8%	5,3%	-0,2%	-4,2%	0,8%
Рівненська	-9,6%	-4,7%	0,0%	0,7%	-4,3%	7,8%	4,7%	15,0%	8,3%
Сумська	-2,0%	-6,1%	-7,1%	-4,2%	-18,4%	7,2%	6,7%	-6,6%	10,7%
Тернопільська	-5,4%	-6,3%	-9,6%	-7,6%	-10,9%	6,9%	0,1%	1,5%	33,9%
Харківська	-6,9%	-1,8%	-10,2%	-8,0%	-14,7%	4,8%	3,9%	-0,7%	19,3%
Херсонська	-7,1%	-2,9%	-4,3%	-4,1%	-14,9%	3,8%	5,2%	-6,6%	7,5%
Хмельницька	-7,2%	-4,3%	-11,7%	-3,9%	-7,9%	5,5%	-7,2%	1,9%	14,7%
Черкаська	-12,4%	-2,3%	-9,6%	-7,0%	-8,4%	5,1%	0,4%	-11,1%	5,3%
Чернівецька	-4,0%	-5,8%	-3,7%	2,1%	10,2%	12,1%	9,9%	11,2%	26,2%
Чернігівська	-15,5%	-9,8%	-9,2%	-10,7%	-17,3%	1,9%	3,4%	-10,3%	11,3%
М.Київ	-4,4%	7,8%	-2,5%	-0,1%	-4,5%	17,7%	2,3%	3,2%	20,5%

Для кращого представлення регіональних кліматичних, географічних та соціальних особливостей, а також для кращого розуміння поширення епідемії на різних етапах її розвитку, робочою групою з математичного моделювання проблем, пов’язаних з епідемією коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні, запропоноване об’єднання областей в групи регіонів, виходячи з певних параметрів, що можуть відігравати значну роль для епідемічного процесу (рис. 1):

«Захід I» – Волинська, Закарпатська, Івано-Франківська, Львівська, Тернопільська, Чернівецька області (21,2% населення України; тут і далі мова про підконтрольні території України);

«Захід II» – Вінницька, Житомирська, Рівненська, Хмельницька області (13,5% населення України);

«Південь» – Запорізька, Миколаївська, Одеська, Херсонська області (16,2% населення України);

«Схід» – Дніпропетровська, Донецька, Луганська, Харківська області (22,1% населення України);

«Центр і Північ» – Кіровоградська, Полтавська, Сумська, Черкаська, Чернігівська області (14,6% населення України);

«Столичний регіон» – м. Київ та область (12,4% населення України).

Особливістю областей із груп «Захід І» та «Захід ІІ» є висока інтеграція з зовнішніми ринками праці. Крім того, вона частіше виявляється у групі «Захід І». У групі «Південь» можна очікувати підвищеної контактності під час літніх курортів. Група «Схід» має високу урбанізацію, група «Центр і Північ» – регіони з відносно низькою урбанізацією та щільністю населення, група «Столичний регіон» має таку особливість, як значне внутрішнє переміщення у межах Києва та між Києвом і областю.



Рис. 1. Регіональні групи, представлені у відповідності до класифікації, запропонованої робочою групою з математичного моделювання проблем, пов'язаних з епідемією коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні (<https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8014>).

Західні області протягом останніх 12 місяців характеризувались складною епідемічною обстановкою і, за нашою оцінкою, можуть бути

придатними для відбору зразків. Значне зростання рівня захворюваності реєструвалось з листопада по лютий 2020 року і, після короткого місячного періоду зниження захворювання, був зареєстрований різкий ріст виявлення нових випадків в усіх регіонах України. Пік захворюваності прийшовся на початок-середину квітня. Після 20 травня 2021 року намітилась тенденція до зниження кількості нових випадків, яка зберігається до моменту написання цього звіту. Київ, як мегаполіс із високою концентрацією населення, традиційно демонстрував найвищі показники захворювання в абсолютних числах (рис. 2).



Рис. 2. Кількість випадків захворювання COVID-19 па у групах регіонів
[\(<https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8446>\).](https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8446)

У деяких регіонах на заході країни високі темпи зростання епідемічних показників спостерігаються на тлі їх низьких абсолютних значень і значною мірою зумовлені їх випадковими коливаннями.

На діаграмі викладена зведена інформація про динаміку та поточний стан ключових епідемічних показників в Україні в цілому (рис. 3, 4).



Рис. 3. Динаміка ключових епідемічних показників щодо коронавірусу SARS-CoV-2 в Україні (<https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8446>).

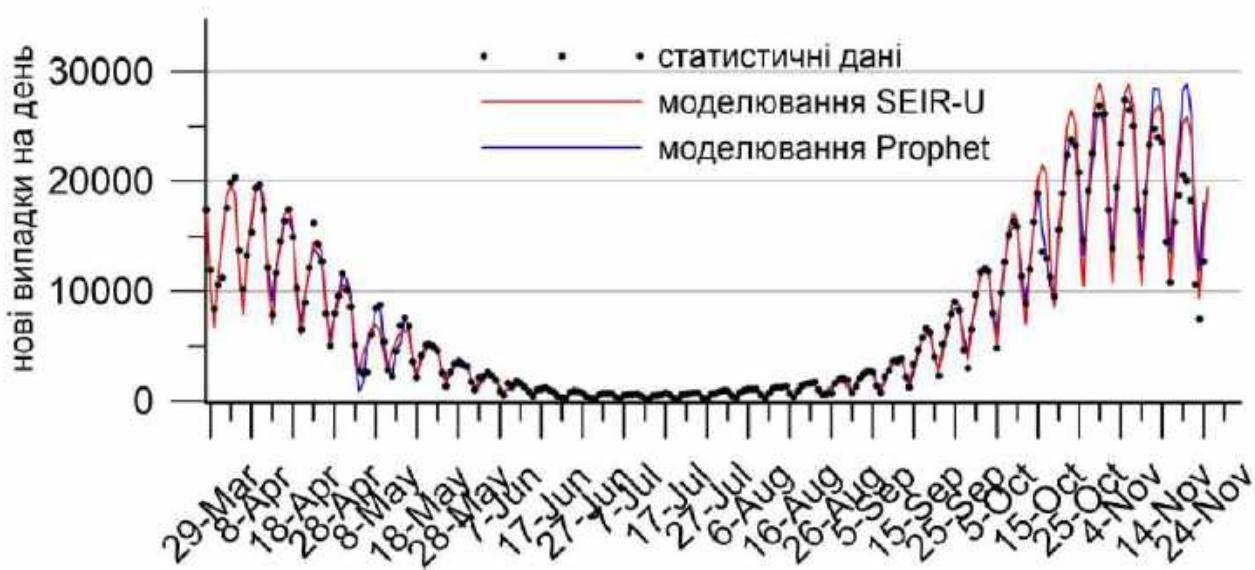


Рис. 4. Порівняння офіційного прогнозу зі статистичними даними (<https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8446>).

Дані, представлені на рисунках 3 та 4, демонструють, що динаміка кількості нових випадків в цілому відповідає очікуваним хвильоподібним

коливанням захворюваності, які можуть бути пов'язані із виникненням нових мутованих типів збудника.

Для врахування можливої зміни кількості контактів у часі було додатково розглянуто динаміку середньотижневого репродуктивного числа, яке характеризує заразність вірусу. Дані представлені в таблиці 3.

Таблиця 3

Динаміка зміни середньотижневого репродуктивного числа в регіонах України (дані ЛССУ)

Для України одним із головних орієнтовно-прогнозованих показників епідемічного процесу є репродуктивне число, тобто заразність вірусу.

Репродуктивне число на момент проведення польових виїздів з метою відбору проб складало в середньому 1,07–0,95, але спостерігалась тенденція до збільшення при погіршенні епідемічної ситуації.

На рис. 5 показано зміну в часі репродуктивного числа для України загалом, отриману в результаті калібрування математичної моделі на статистичних даних. Відтінками позначено оцінки репродуктивного числа для різних областей. На момент складання звіту середньотижневе значення склало 0.85, і прослідковується тренд на подальше зниження.

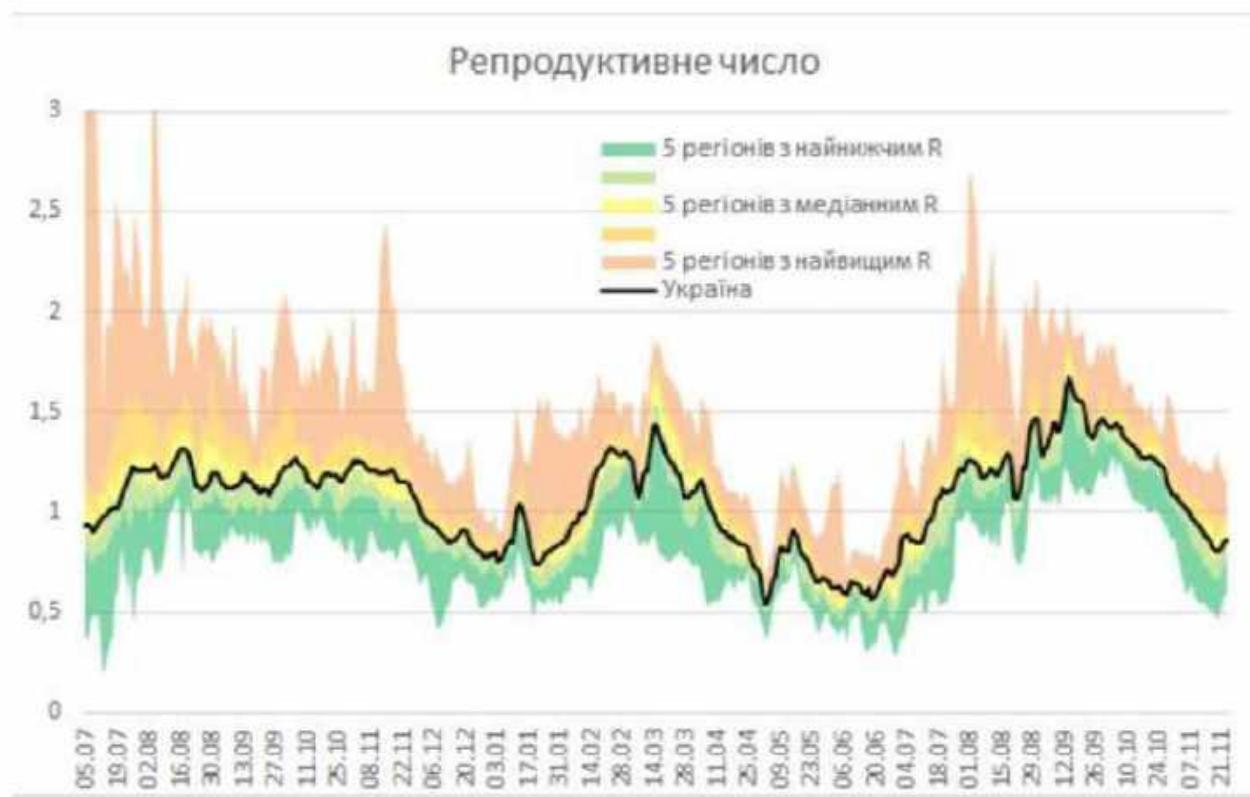


Рис. 5. Динаміка репродуктивного числа SARS-CoV-2 для України, отримана в результаті калібрування математичної моделі, основаної на статистичних даних (<https://www.nas.gov.ua/UA/Messages/Pages/View.aspx?MessageID=8446>).

Таким чином на основі комплексного аналізу епідемічної ситуації було обрано 6 областей України для відбору зразків – Львівська, Хмельницька, Тернопільська, Полтавська, Житомирська та Чернігівська, які за експертною оцінкою виконавців проекту забезпечать отримання репрезентативної вибірки по Україні та дозволять оцінити превалентність збудника в популяціях домашніх тварин різних видів.

Загальна характеристика обраних для відбору зразків областей представлена в таблиці 4. З даних таблиці зясовано, що захворюваність серед населення складало близько 10%, тому очікувана превалентність вірусу серед домашніх тварин ймовірно визначалась до 5%.

Загальна характеристика областей, де проводився відбір проб від домашніх тварин з метою виявлення вірусу SARS-CoV-2 (дані ДССУ)

№	Область	Площа, км ²	Наявне населення на 01.01.21	Кількість виявлених випадків серед людей на 07.12.2021	Поголів'я ВРХ	Поголів'я свиней	Поголів'я ДРХ
1	Львівська	21 830	2 497 750	215204	173 200	139 400	34 000
2	Полтавська	28 750	1 365 518	133347	93 600	71 300	58 600
3	Хмельницька	20 650	1 243 787	142513	169 600	134 700	33 600
4	Тернопільська	13 820	1 030 600	104918	125 900	155 600	17 800
5	Житомирська	29 830	1 195 495	137871	134 600	81 000	26 400
6	Чернігівська	31 870	976 700	92155	59 000	59 100	31 900

2.2 Відбір біологічних зразків від домашніх тварин у визначених пунктах відбору та їх первинна підготовка для лабораторного аналізу.

У більшості випадків дослідникам-епізоотологам необхідний відбір проб з метою виявлення превалентності хвороби в певній популяції або стадах тварин. Одним з найкращих способів є поголівне дослідження всіх тварин, однак такі дослідження є тривалими, трудомісткими та надто витратними. У таких випадках більш раціональним буде виявлення необхідних показників в популяції шляхом обстеження лише її частини шляхом проведення науково обґрунтованої вибірки з неї. Правильно організований відбір проб у досліджуваній популяції може дати об'єктивне уявлення про її статус. Досить рідкісними є випадки, коли в межах популяції тільки одна тварина є інфікованою. Однак для інфекційних захворювань, навіть не контагіозних, характерна тенденція до розповсюдження. Саме тому за наявності хвороби в популяції слід очікувати, що ураженою буде не одна особина, а група тварин. Стратегія відбору проб з метою виявлення хвороби в популяції базується на тому, що хворобу можна виявити лише тоді, коли певний відсоток (число) тварин є інфікованими. Наближено-реальне число (відсоток) хворих визначається при дослідженні. Визначення обсягу вибірки базується на попередніх інформативних та встановлених даних про природу захворювання.

Обґрунтування достовірності при відборі проб для досліджень.

При обґрунтуванні необхідної достовірності досліджень за відбору проб, ми спирались на прогнозований рівень превалентності хвороби, намагаючись відібрати таку кількість проб, яка дозволить достовірно виявити інфікованих тварин. Тобто якщо при встановленому розмірі популяції і очікуваному рівні превалентності всі відіbrane проби будуть негативними, дуже мала вірогідність того, що якась тварина в стаді виявиться інфікованою і вона не була виявленою під час дослідження.

Розробляючи методологію відбору проб, ми спирались на статистичну концепцію про те, що, відбираючи проби не у всіх тварин, ми не можемо робити абсолютно впевнений висновок з наших досліджень. Цей висновок матиме більш чи менш вірогідний характер. Чим більше проб (більша частина популяції), досліджена, тим вища достовірність отриманих результатів. Оптимальним вважають таку кількість зразків, яка забезпечує бажаний (необхідний) рівень достовірності. Зазвичай у біологічних науках вважають достатнім рівень достовірності у 95%.

Слід розглянути такий приклад, коли всі досліджені проби виявилися негативними. У такому випадку необхідно з'ясувати, чи досить цієї кількості проб для ствердження, що дана популяція (стадо) благополучні щодо захворювання.

Будь-яке дослідження, направлене на уточнення питання щодо наявності захворювання в популяції, є окремим випадком визначення превалентності захворювання (тобто випадком, коли превалентність прямує до нуля).

Обсяг вибірки (число проб) залежатиме від рівня захворюваності в популяції, необхідного рівня достовірності отриманих результатів та розмірів самої популяції. При оцінці превалентності захворювання завжди виникає питання – про який рівень захворюваності свідчить виявлення даного числа позитивних результатів у випадково відібраних пробах з популяції відомої величини. Саме у табл. 4 представленає число тварин, яких необхідно дослідити

(проби від яких треба взяти) для того, щоб із бажаною достовірністю розрахувати, яка частина популяції уражена хворобою.

Ймовірність виявлення позитивно реагуючих тварин при різній інтенсивності проведення моніторингу.

Дані таблиці 5 демонструють вплив різного рівня інтенсивності проведення моніторингу на шанси виявити захворювання, яке присутнє в популяції на незначному рівні (превалентність хвороби від 1% до 8%).

Дані таблиці слугують для того, щоб визначити вірогідність виявлення хоча б однієї позитивно реагуючої тварини при різному охопленні поголів'я дослідженнями та різному числі уражених тварин у популяції.

Таблиця 5

Вплив різного рівня інтенсивності проведення моніторингу на шанси виявити захворювання

Розмір популяції	Число проб	Число уражених тварин у популяції							
		1	2	3	4	5	6	7	8
10	2	0,200	0,378	0,533	0,667	0,778	0,867	0,913	0,978
20	4	0,200	0,368	0,509	0,624	0,718	0,793	0,852	0,898
30	6	0,200	0,366	0,501	0,612	0,702	0,773	0,830	0,874
40	8	0,200	0,364	0,498	0,607	0,694	0,764	0,819	0,863
50	10	0,200	0,363	0,498	0,603	0,689	0,758	0,813	0,857
60	12	0,200	0,363	0,495	0,601	0,686	0,755	0,809	0,853
70	14	0,200	0,362	0,494	0,559	0,684	0,752	0,807	0,850
80	16	0,200	0,362	0,493	0,598	0,683	0,751	0,804	0,847
90	18	0,200	0,362	0,492	0,597	0,682	0,749	0,803	0,846
100	20	0,200	0,362	0,492	0,597	0,681	0,748	0,802	0,844
∞	41	0,200	0,360	0,486	0,590	0,672	0,748	0,790	0,832

Вірогідність невдачі у виявленні хворих тварин.

Таблиця 6 представляє дані про вірогідність невдачі при виявленні хворих тварин у популяції «безкінечного розміру» з відомою (чи вірогідною) превалентністю захворювання (тобто ми впевнені, що деяка частина популяції уражена хворобою).

Таблиця побудована на припущення, що певне число тварин (d) хворе і позитивно реагує при дослідженні. Відповідно в таблиці наведені результати

розв'язання рівняння $p=(1-d)^n$, яке відображає вірогідність того, що ми не виявили жодного позитивного зразка в даній вибірці проб.

Так, дослідження рандомізованих проб від 25 тварин, вибраних з великої популяції, в якій хворі мають превалентність у 10%, не виявить жодного позитивно реагуючого зразка лише в 7% випадків.

Таблиця 6

Вірогідність невдачі у виявленні хворих тварин

Превалентність (%)	Число тварин, зразки від яких досліджено									
	5	10	25	50	75	100	20	250	500	1000
1	0,951	0,904	0,778	0,605	0,471	0,366	0,134	0,081	0,007	0,000
2	0,904	0,817	0,603	0,364	0,220	0,133	0,018	0,006	0,000	
3	0,859	0,737	0,467	0,218	0,102	0,048	0,002	0,000		
4	0,815	0,665	0,360	0,130	0,047	0,017	0,000			
5	0,774	0,599	0,277	0,077	0,021	0,006				
6	0,734	0,539	0,213	0,045	0,010	0,002				
7	0,696	0,484	0,163	0,027	0,004	0,001				
8	0,659	0,434	0,124	0,015	0,002	0,000				
9	0,624	0,389	0,095	0,009	0,001					
10	0,590	0,349	0,072	0,005	0,000					
12	0,528	0,279	0,041	0,002						
14	0,470	0,221	0,023	0,001						
16	0,418	0,175	0,013	0,000						
18	0,371	0,137	0,007							
20	0,338	0,107	0,004							
24	0,254	0,064	0,001							
28	0,193	0,037	0,000							
32	0,145	0,021								
36	0,107	0,012								
40	0,078	0,006								
50	0,031	0,001								
60	0,010	0,000								

Обсяг вибірки (число проб), мінімально необхідний для встановлення (уточнення) превалентності хвороби в популяції.

Таблиця 7 відображає приблизний обсяг вибірки, потрібний для встановлення превалентності захворювання у великій популяції тварин для забезпечення достовірності в межах бажаної точності. При складанні таблиці малося на увазі, що приблизне число захворюваності відоме чи щонайменше передбачуване. Якщо є великі сумніви і достовірність передбачень сумнівна,

треба провести попереднє дослідження в обсязі 0,2 або 0,5 від запланованого, щоб уточнити ситуацію. При цьому ми враховували припущення, що можуть виявитись негативні результати у випадку, якщо фактична превалентність значно нижча від очікуваної.

Очікувана превалентність збудника за даними літератури не перевищує 5–10% в ризиковій популяції тварин.

Таблиця 7

Обсяг вибірки (число проб), необхідний для встановлення (уточнення) превалентності хвороби у популяції

Очікувана превалентність (%)	Рівень достовірності 95 %	
	бажана точність 10%	бажана точність 5%
До 10	12	36
10	35	138
20	61	246
30	81	323
40	92	369
50	96	384
60	92	369
70	81	323
80	61	246
90	35	138

Відбір проб від домашніх тварин для виявлення специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2.

Відбір проб проводили за розробленим учасниками проекту СОПом (СОП Збір, транспортування, зберігання, знищення зразків біологічного матеріалу від тварин з метою дослідження на наявність специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2), створеним на основі методик рекомендованих для відбору вірусного матеріалу з використанням стерильних аплікаторів (FLOQSwabs, Copan Flocked Swabs та EUROTUBO Collection swab) та поміщали безпосередньо до кріопробірок зі стерильним буферним розчином pH 7,4±0,2.

Проби (змиви та мазки) протягом всього періоду відбору зберігали за температури мінус 70(±5)°C із використанням кріокамери із сухим льодом.

В умовах лабораторії зразки та виділена РНК зберігались у низькотемпературній морозильній камері за температури мінус 70(±5)°С для забезпечення тривалого зберігання зразків та виділеної вірусної РНК.

З метою забезпечення біобезпеки за проведення відбору проб, транспортування та зберігання, а також з метою забезпечення стабільності зразків при зберіганні протягом звітного періоду виконавцями проекту було проведено відбір у відповідності до діючих нормативних документів та рекомендацій щодо біобезпеки та біозахисту.

СОП відбору проб був створений із урахуванням діючих вимог та правил щодо методу випробувань ПЛР, валідації методів, відбору зразків, транспортування та інших операцій, пов'язаних із переміщенням та зберіганням потенційно небезпечних біологічних зразків. При створенні СОПу враховані вимоги до однозначної ідентифікації та маркування відібраних зразків (Додаток Б).

Під час відбору зразків були враховані фактори, які можуть впливати на достовірність результатів випробувань.

Прозорі процедури відбору, а також оцінки отриманих результатів дозволили оперувати в умовах відкритості так, що кожна сторона була поінформована про дії, що вживаються учасниками проекту. Маючи повне уявлення про процедури, всі зацікавлені сторони можуть приймати обґрунтовані рішення, що, в свою чергу, знижує потенційний ризик виникнення суперечок щодо результатів відбору і аналізу проб.

На мапі виділено області, в яких був запланований відбір проб (рис. 6).



Рис. 6. Цільові області, де здійснено відбір зразків від тварин.

У Львівській області проби було відібрано в Буському, Городоцькому, Жовківському, Миколаївському та Пустомитівському районах (рис. 7).

Загальна кількість проб склала 200. Співвідношення зразків за видами тварин показана в таблиці (табл. 8).

Таблиця 8

Загальна кількість зразків, відібраних від тварин у Львівській області

Район	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака
Буський	3	0	8	8	7	3	9
Городоцький	1	0	8	0	7	0	19
Жовківський	1	3	9	0	16	0	9
Миколаївський	3	1	11	0	3	5	15
Пустомитівський	8	0	19	4	0	3	17
Всього	16	4	55	12	33	11	69

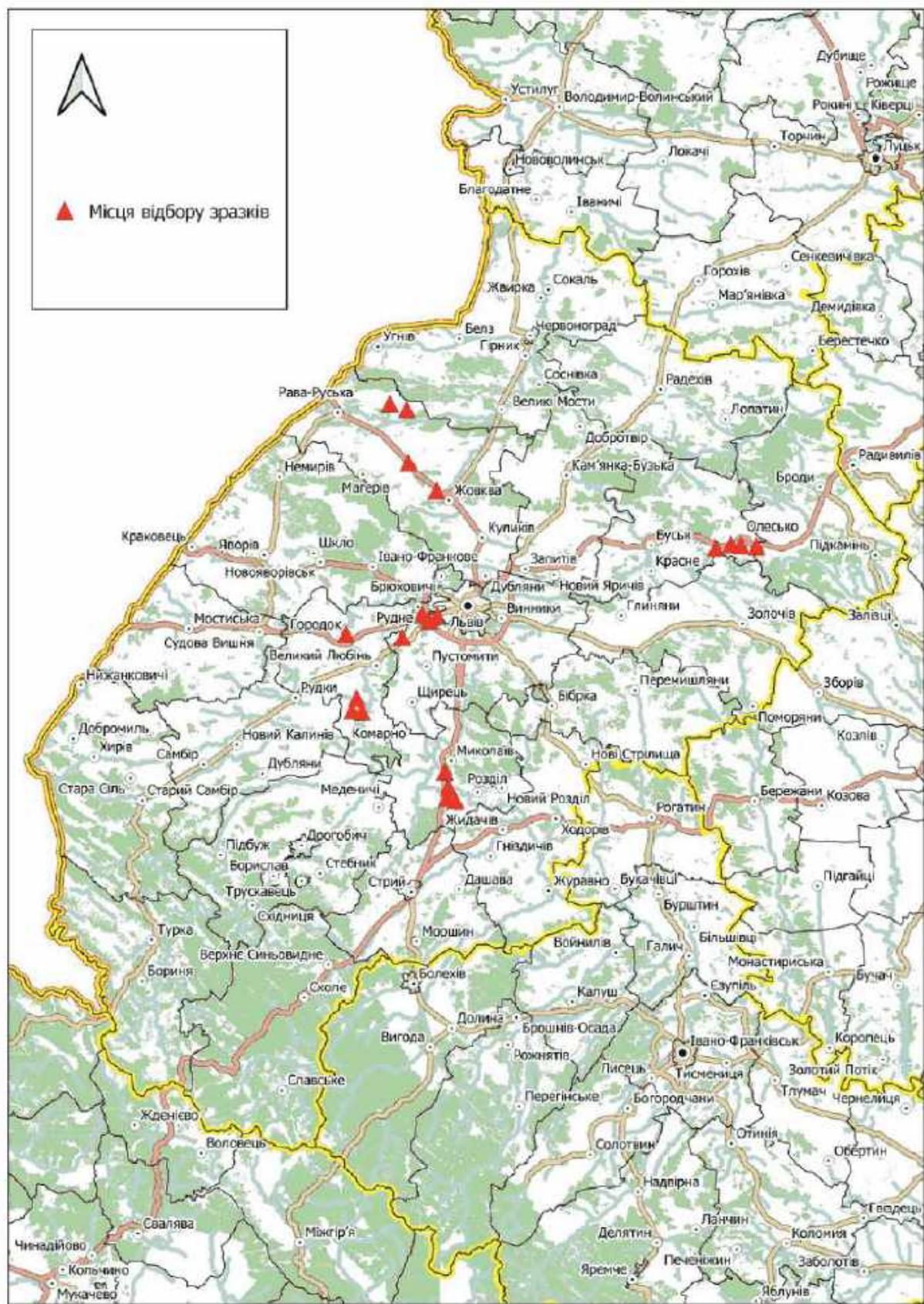


Рис. 7. Місця відбору зразків в Львівській області.

На рисунку 8 представлено співвідношення видів тварин, від яких було відібрано мазки протягом польового виїзду 07–11 червня 2021 року у Львівську область за районами. Найбільша кількість зразків припадає на кішок (від 21,1% до 37,3% проб) та собак (від 23,7% до 54,3%). Кількість проб від кролів також переважала у даній області, хоча коливалась від 0% до 42,1%.

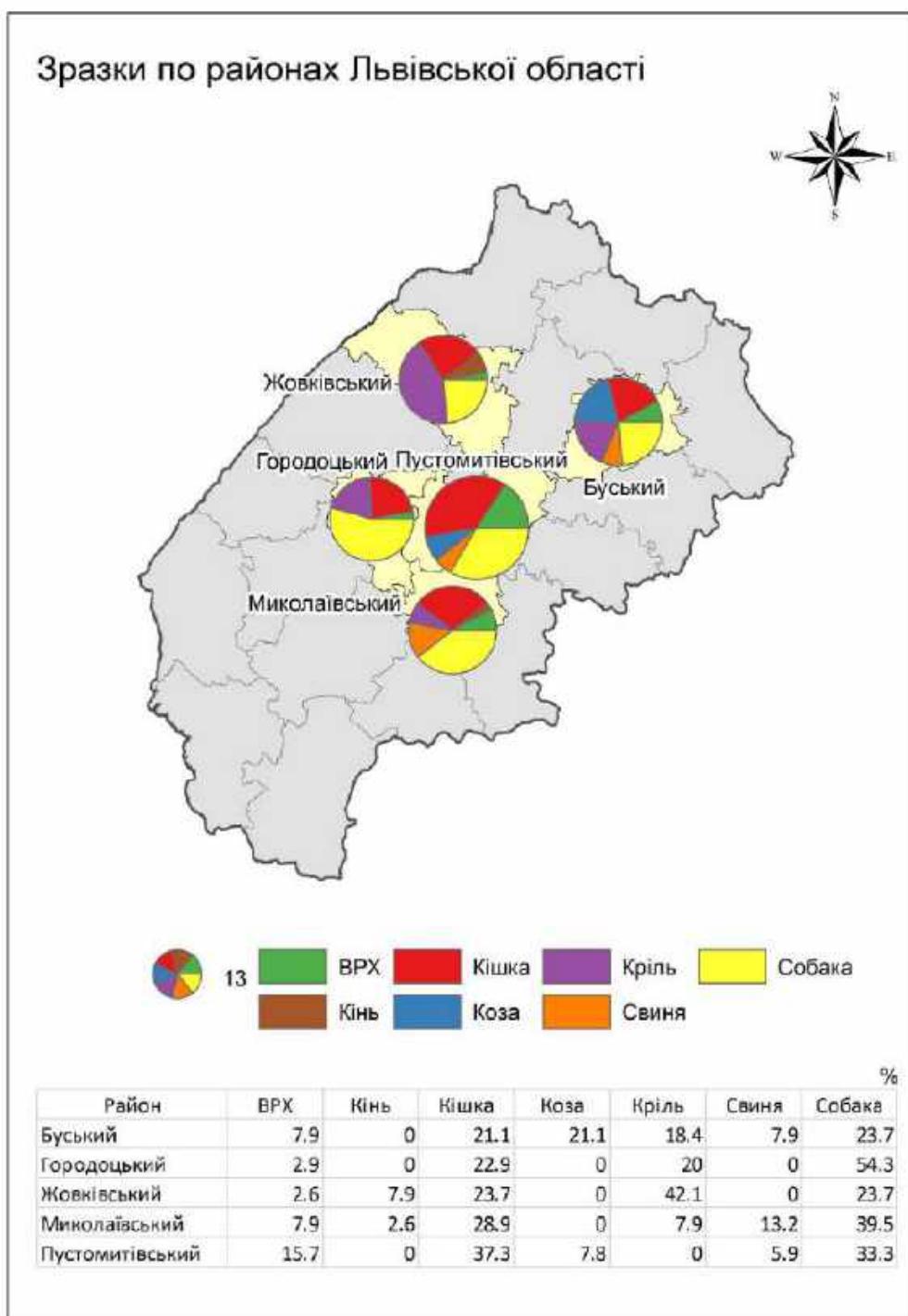


Рис. 8. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районах Львівської області.

На рисунку 9 відмічені місця відбору проб в Хмельницькій області. Польові виїзди були здійснені також у 5 районів, а саме Дунаєвецький, Красилівський, Старокостянтинівський, Хмельницький та Ярмолинецький.

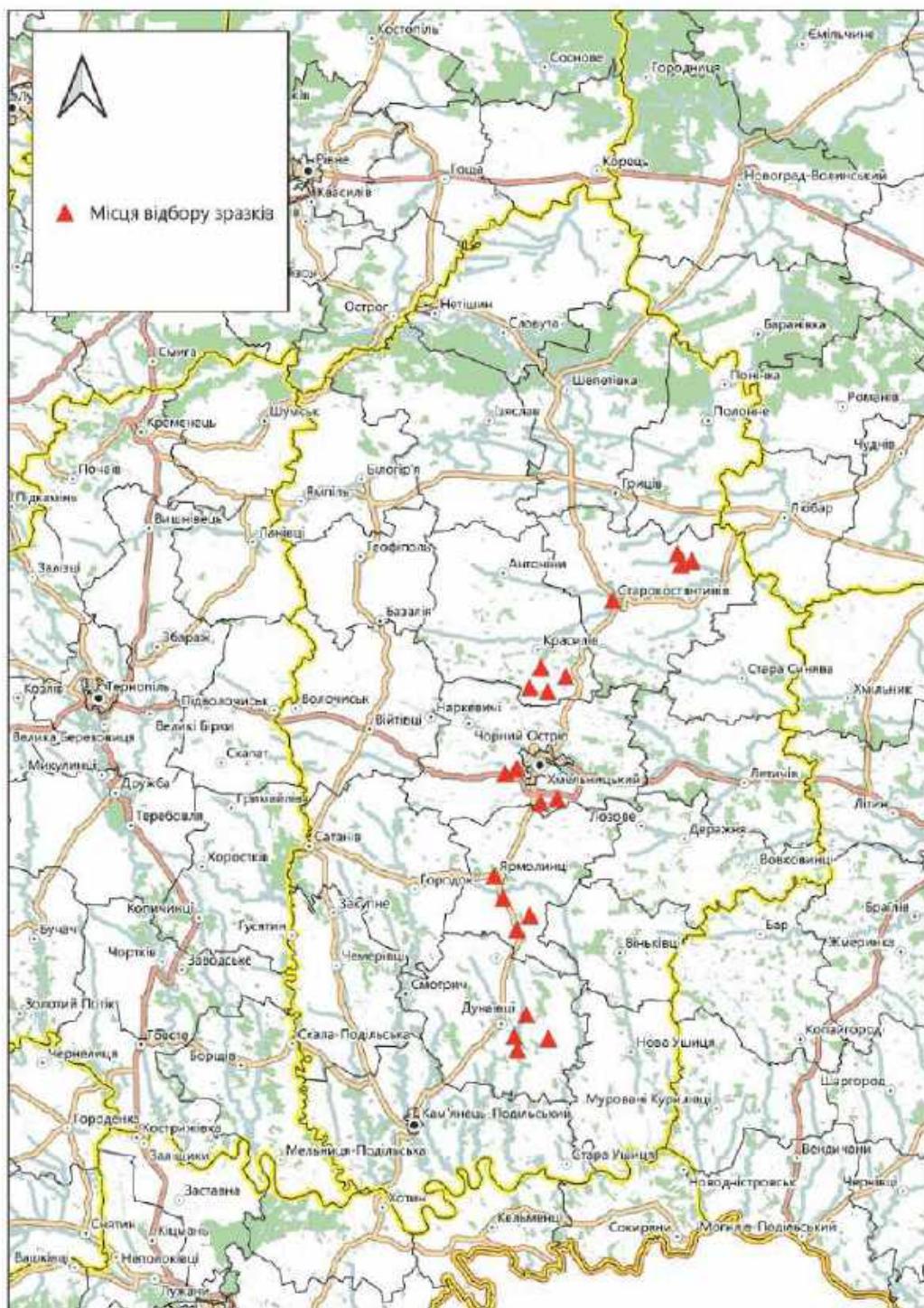


Рис. 9. Місця відбору зразків в Хмельницькій області.

Загалом з області вдалось відібрати 196 зразків (рис. 10). Кількість проб за видами тварин показана в таблиці 9.

Таблиця 9

Загальна кількість зразків, відібраних від тварин у Хмельницькій області

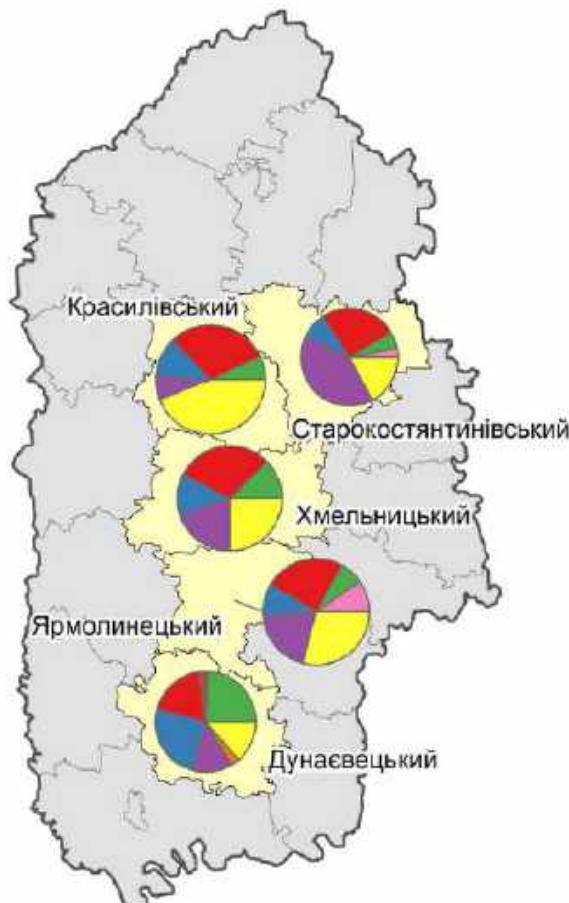
Район	Вівця	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свіння	Собака
Дунаєвецький	0	9	1	7	9	5	1	5
Красилівський	0	3	0	13	5	3	0	19
Старокостянтинівський	1	2	0	9	3	14	0	6
Хмельницький	0	5	0	12	5	8	0	10
Ярмолинецький	4	3	0	10	4	8	0	12
Всього	5	22	1	51	26	38	1	52

На рисунку 11 представлено відсоткове співвідношення видів тварин, від яких було відібрано зразки протягом польового виїзду 26–30 липня 2021 року у Хмельницьку область. Найбільша кількість зразків припадає на кішок (від 18,9% до 30,2% проб), собак (від 13,5% до 44,2%) та кролів (13,5–40,0%), що пов’язано із переважанням утримання даних видів тварин в приватних домогосподарствах.



Рис. 10. Відбір проби у кроля.

Зразки по районах Хмельницької області



Район	Вівця	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака	%
Дунаєвецький	0	24.3	2.7	18.9	24.3	13.5	2.7	13.5	
Красилівський	0	7	0	30.2	11.6	7	0	44.2	
Старокостянтинівський	2.9	5.7	0	25.7	8.6	40	0	17.1	
Хмельницький	0	12.5	0	30	12.5	20	0	25	
Ярмолинецький	9.8	7.3	0	24.4	9.8	19.5	0	29.3	

Рис. 11. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районах Хмельницької області.

У Полтавській області було здійснено відбір проб у 20 населених пунктах Гребінківського, Козельщинського, Пирятинського, Полтавського та Решетилівського районів (рис. 12).



Рис. 12. Місця відбору зразків в Полтавській області.

Загальна кількість проб, відібрана у цій області становить 200 (рис. 13). Їх розподіл за видами тварин показаний в таблиці 10.

Таблиця 10

Загальна кількість зразків, відібраних в Полтавській області

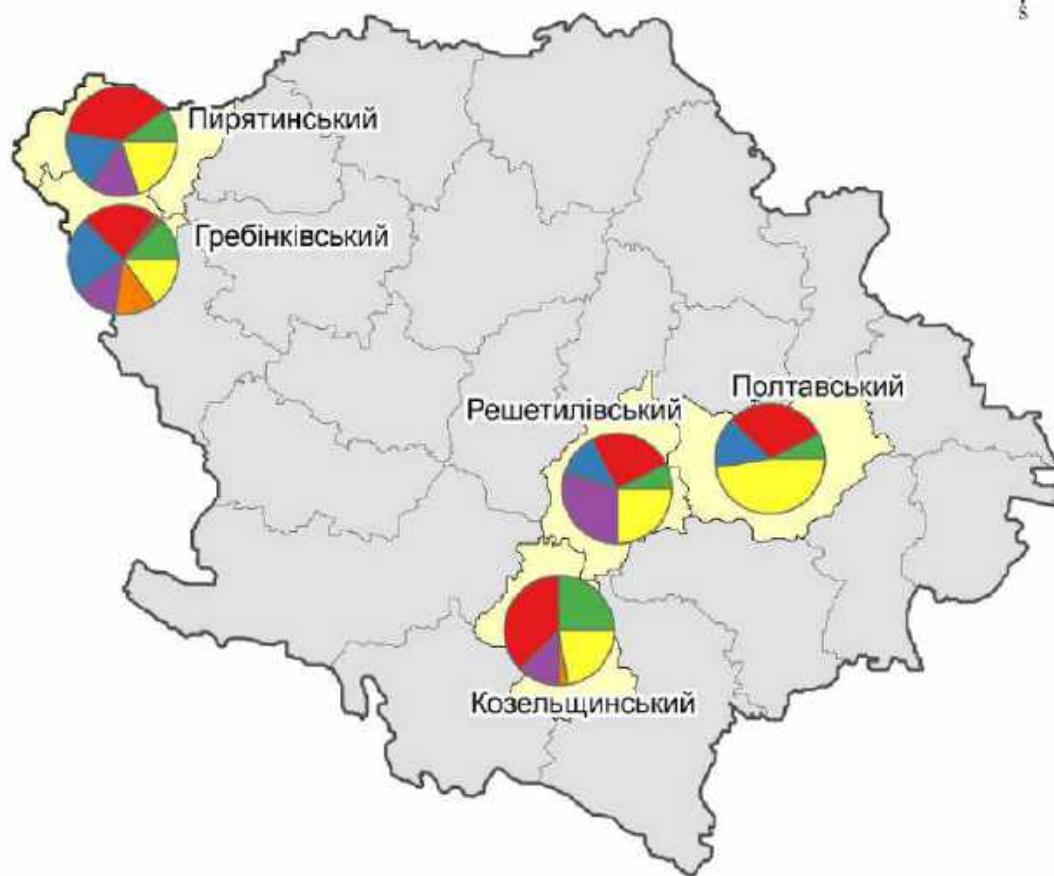
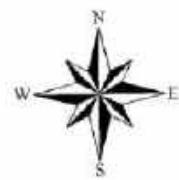
Район	ВРХ	Кінь	Кіт	Коза	Кріль	Свиня	Собака
Гребінківський	5	1	9	9	5	5	6
Козельщинський	10	0	15	0	5	1	9
Пирятинський	4	0	15	7	6	0	8
Полтавський	3	0	12	6	0	0	19
Решетилівський	3	0	10	5	12	0	10
Всього	25	1	61	27	28	6	52



Рис. 13. Відбір зразка від кози.

На рисунку 14 представлено відсоткове співвідношення видів тварин, від яких було відібрано мазки протягом виїзду, та по районах Полтавської області. Найбільша кількість зразків припадає на кішок (від 22,5% до 37,5% проб), собак (від 15,0% до 47,5%), кролів (12,5–30,0%) та кіз (від 12,5% до 22,5%), що пов’язано із переважним утриманням даних видів тварин в приватних домогосподарствах дослідженого регіону.

Зразки по районах Полтавської області



Район	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака	%
Гребінківський	12.5	2.5	22.5	22.5	12.5	12.5	15	
Козельщинський	25	0	37.5	0	12.5	2.5	22.5	
Пирятинський	10	0	37.5	17.5	15	0	20	
Полтавський	7.5	0	30	15	0	0	47.5	
Решетилівський	7.5	0	25	12.5	30	0	25	

Рис. 14. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районах Полтавської області.

Наступний виїзд було здійснено в п'ять районів Тернопільської області, а саме у Підволочиський, Зборівський, Тернопільський, Збаразький і Лановецький (рис. 15).

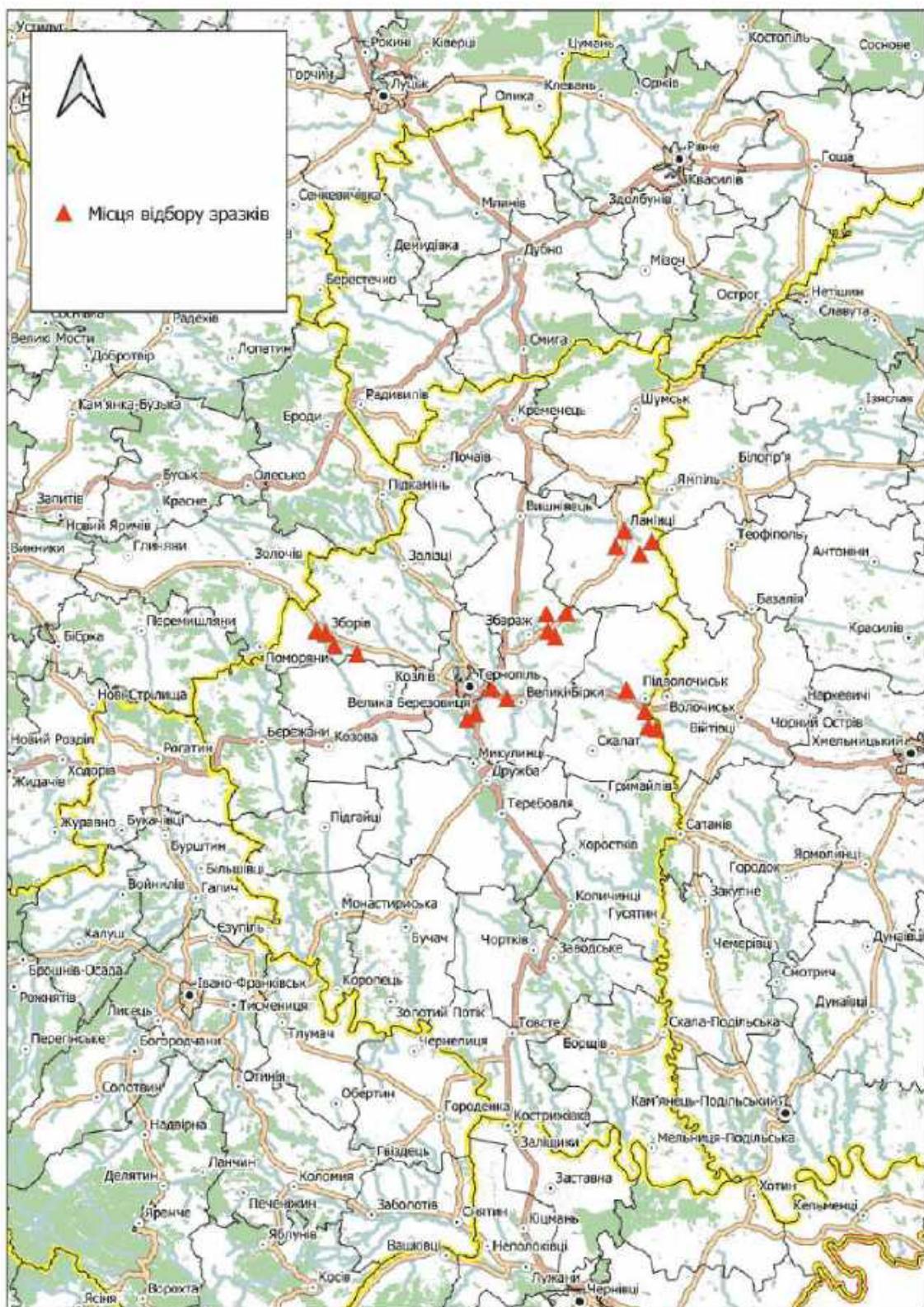


Рис. 15. Місця відбору зразків в Тернопільській області.

В цій області ми також відібрали 200 зразків від тварин (рис. 16). Йх розподіл за видами тварин наведено в таблиці 11.

Таблиця 11

Загальна кількість зразків, відібраних у Тернопільській області

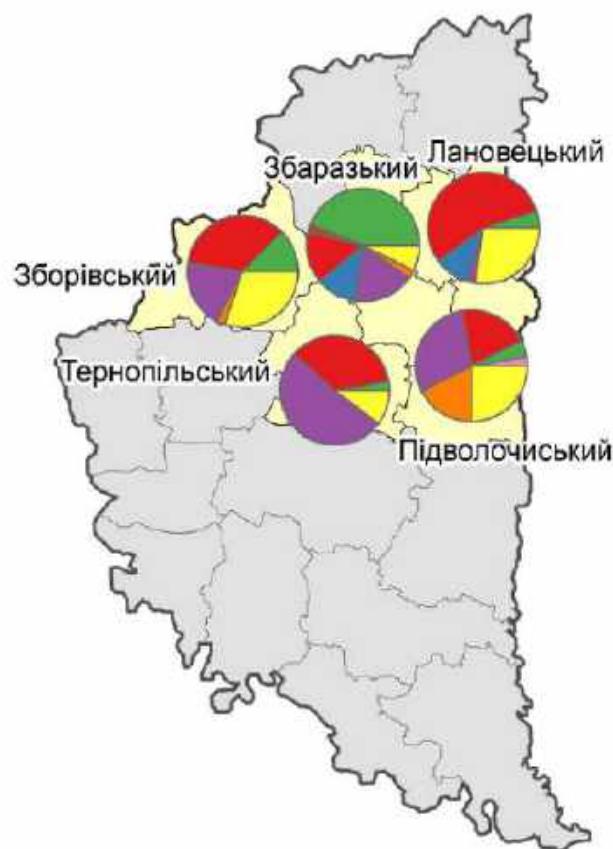
Район	ВРХ	Кінь	Кіт	Вівпя	Коза	Кріль	Свиня	Собака
Підволочиський	2	0	8	1	0	12	7	10
Зборівський	5	0	14	0	0	8	1	12
Тернопільський	1	0	14	0	0	20	0	4
Збаразький	18	1	6	0	5	7	1	3
Лановецький	2	0	22	0	4	1	0	11
Всього	28	1	64	1	9	48	9	40



Рис. 16. Відбір зразка від коня.

На рисунку 17 наведено співвідношення зразків за видами тварин по районах області, від яких було відібрано мазки протягом виїзду (16.08–20.08.2021 року) у Тернопільську область. Найбільша кількість зразків припадає на котів (від 14,7% до 55,0% проб), собак (від 7,3% до 30,0%), кролів (12,5–30,0%) та ВРХ (від 2,6% до 43,9%), що пов’язано із переважним утриманням даних видів тварин в приватних домогосподарствах даного регіону.

Зразки по районах Тернопільської області



Район	Вівця	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака	%
Збаразький	0	43.9	2.4	14.6	12.2	17.1	2.4	7.3	
Зборівський	0	12.5	0	35	0	20	2.5	30	
Лановецький	0	5	0	55	10	2.5	0	27.5	
Підволочиський	2.5	5	0	20	0	30	17.5	25	
Тернопільський	0	2.6	0	35.9	0	51.3	0	10.3	

Рис. 17. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районах Тернопільської області.

У жовтні відбір зразків було проведено у Варвинському, Ічнянському, Прилуцькому, Срібнянському і Талалаївському районах Чернігівської області (рис. 18).

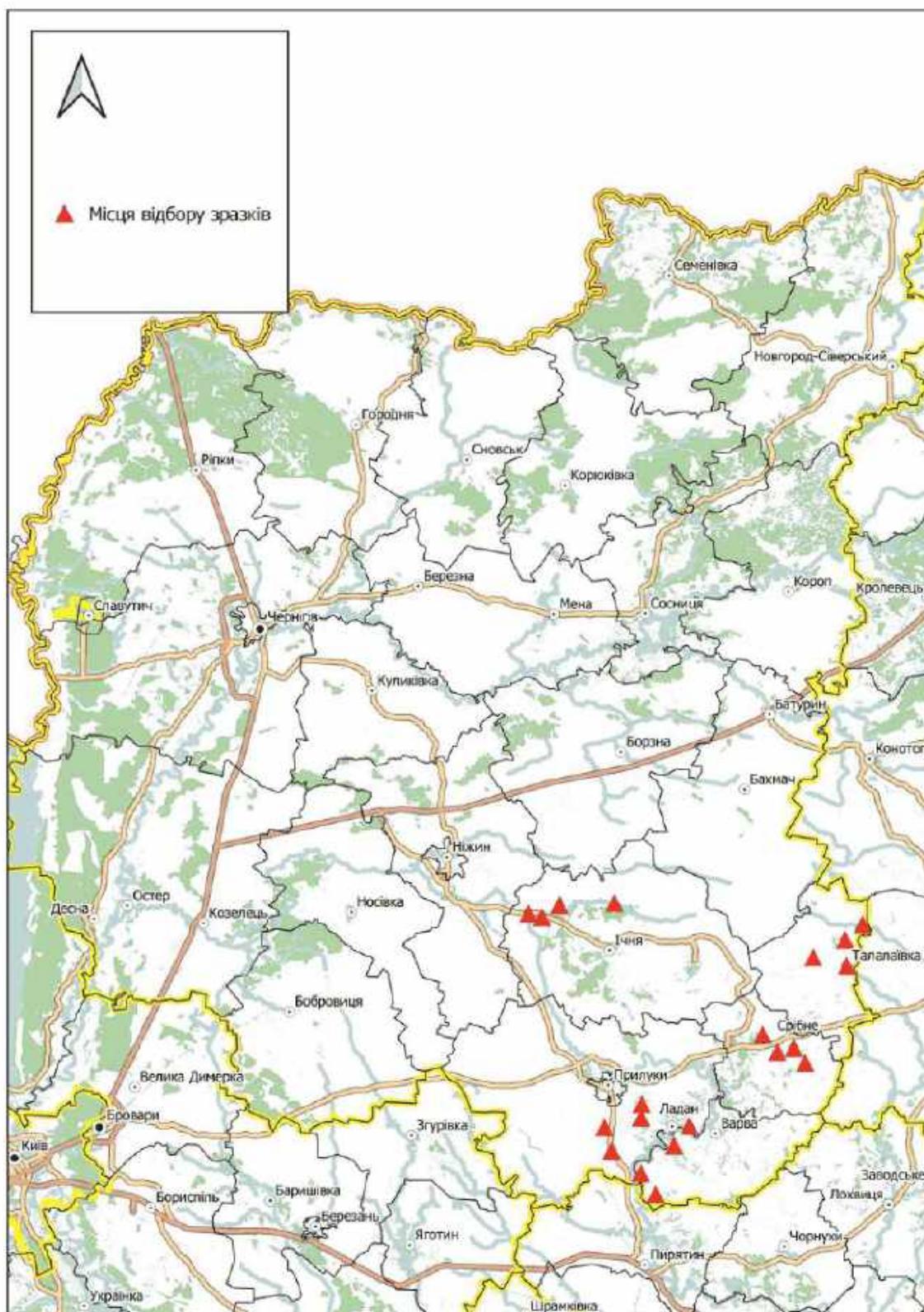


Рис. 18. Місця відбору зразків в Чернігівській області.

Кількість проб, що була відібрана в Чернігівській області, становить 205 (рис. 19). Дані розподілу проб за видами тварин наведені в таблиці 12.

Таблиця 12

Загальна кількість зразків, відібраних у Чернігівській області

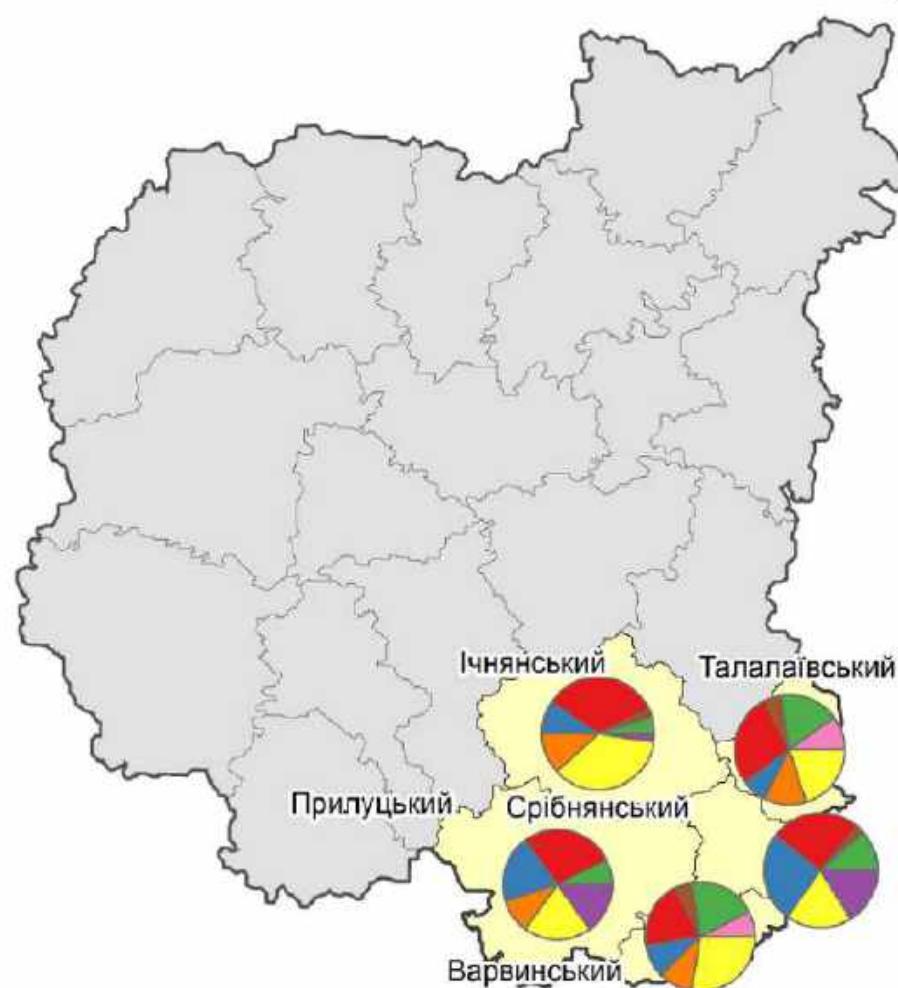
Район	Вівця	ВРХ	Кінь	Кіт	Коза	Свиня	Собака	Кріль
Варвинський	3	8	2	8	4	4	11	0
Ічнянський	0	2	1	14	4	5	15	1
Прилуцький	0	3	0	11	8	4	8	6
Срібнянський	0	5	1	11	11	0	8	7
Талалаївський	4	7	2	11	3	5	8	0
Всього	7	25	6	55	30	18	50	14



Рис. 19. Відбір зразка у собаки.

На рис. 20 представлено співвідношення видів тварин, від яких було відібрано мазки по районах Чернігівської області. Найбільша кількість зразків припадає на котів (від 20,0% до 33,3%), собак (від 18,6% до 35,7%) та кіз (7,5–25,6%), що пов’язано із переважанням утримання даних видів тварин в приватних домогосподарствах.

Зразки по районах Чернігівської області



Район	Вівця	BPХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака
Varvinsky	7.5	20	5	20	10	0	10	27.5
Ivaniichynsky	0	4.8	2.4	33.3	9.5	2.4	11.9	35.7
Prylutsky	0	7.5	0	27.5	20	15	10	20
Sribniansky	0	11.6	2.3	25.6	25.6	16.3	0	18.6
Talaalayevsky	10	17.5	5	27.5	7.5	0	12.5	20

Рис. 20. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районах Чернігівської області.

Останньою областю із запланованих для здійснення відбору зразків була Житомирська (рис. 21).

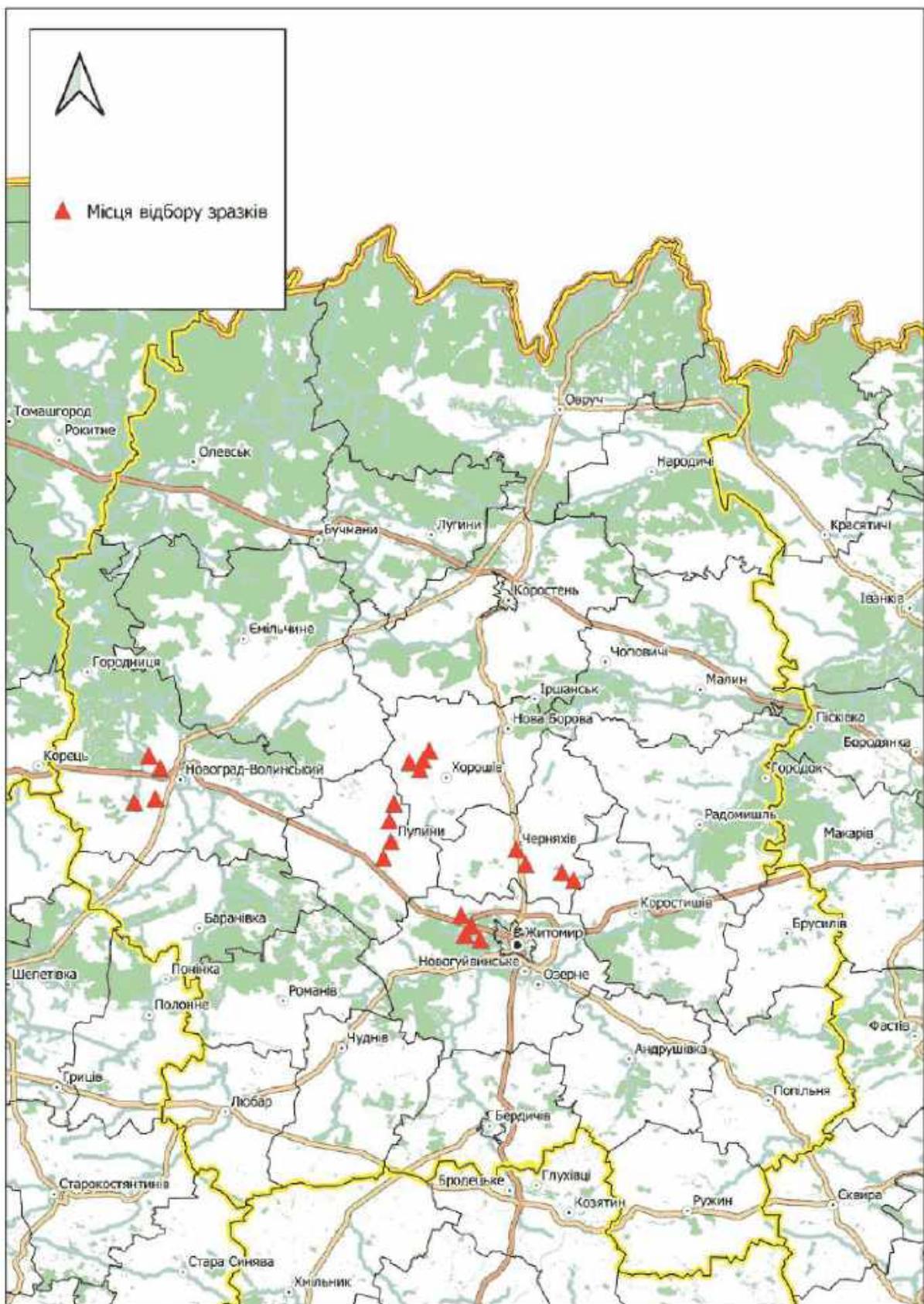


Рис. 21. Місця відбору зразків у Житомирській області.

Проби відібрали у Житомирському, Новоград-Волинському, Пулинському, Хорошівському і Черняхівському районах. Кількість проб, що була відібрана в цій області, становить 200 (рис. 22). Дані розподілу проб за видами тварин наведені в таблиці 13.

Таблиця 13

Загальна кількість зразків, відібраних у Житомирській області

Район	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака
Житомирський	0	1	12	6	0	2	19
Новоград-Волинський	6	0	14	3	0	7	10
Пулинський	3	1	16	7	0	0	13
Хорошівський	1	1	18	2	0	0	18
Черняхівський	5	2	13	2	4	3	11
Всього	15	5	73	20	4	12	71

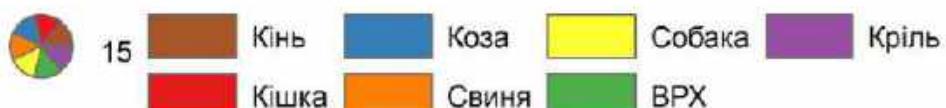
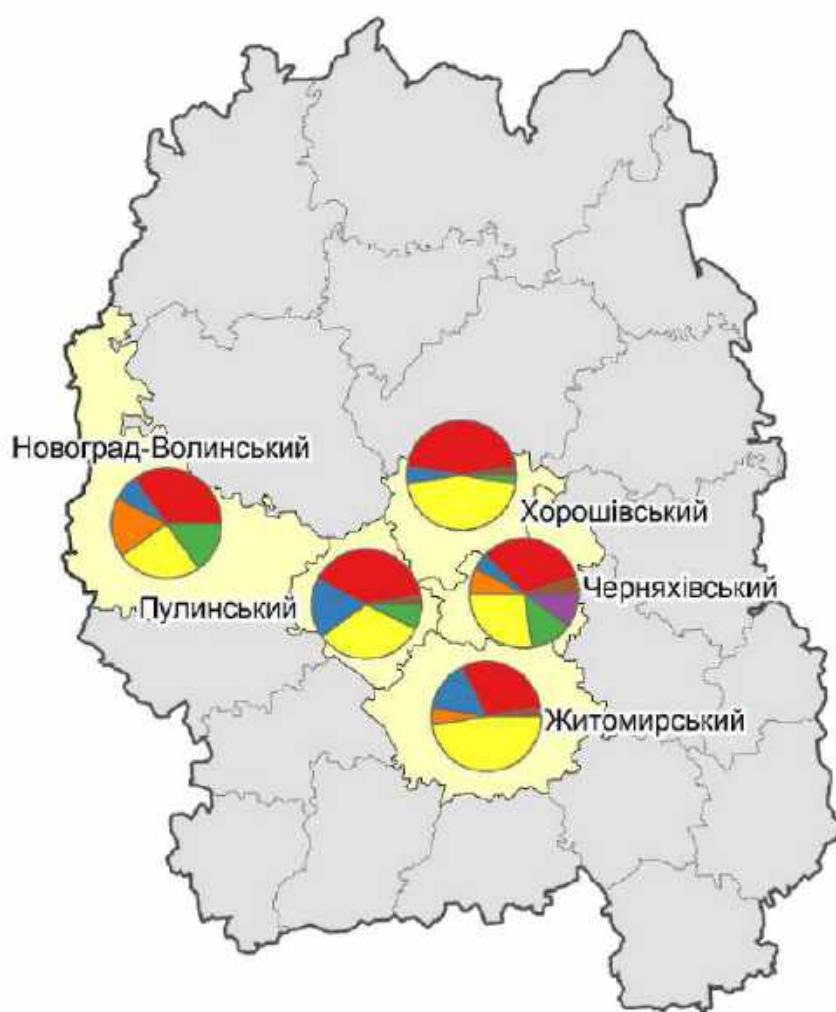
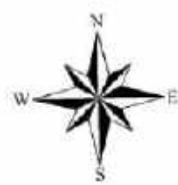


Рис. 22. Відбір назального зразка від козла.

На рисунку 23 представлено співвідношення видів тварин по районах Житомирської області, від яких було відібрано мазки. Найбільша кількість зразків припадає на котів (від 20,0% до 33,3%), собак (від 18,6% до 35,7%) та кіз (7,5–25,6%), що пов’язано із переважанням утримання даних видів тварин в приватних домогосподарствах.

Загалом за час відряджень ми змогли відібрати 1201 пробу, що, навіть, перевищило заплановану на початку проекту кількість. Співвідношення зразків між видами тварин по окремим областям, а також узагальнено по усіх областях зображене на рисунках 24 і 25.

Зразки по районах Житомирської області



Район	ВРХ	Кінь	Кішка	Коза	Кріль	Свиня	Собака	%
Житомирський	0	2.5	30	15	0	5	47.5	
Новоград-Волинський	15	0	35	7.5	0	17.5	25	
Пулинський	7.5	2.5	40	17.5	0	0	32.5	
Хорошівський	2.5	2.5	45	5	0	0	45	
Черняхівський	12.5	5	32.5	5	10	7.5	27.5	

Рис. 23. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по районам Житомирської області.

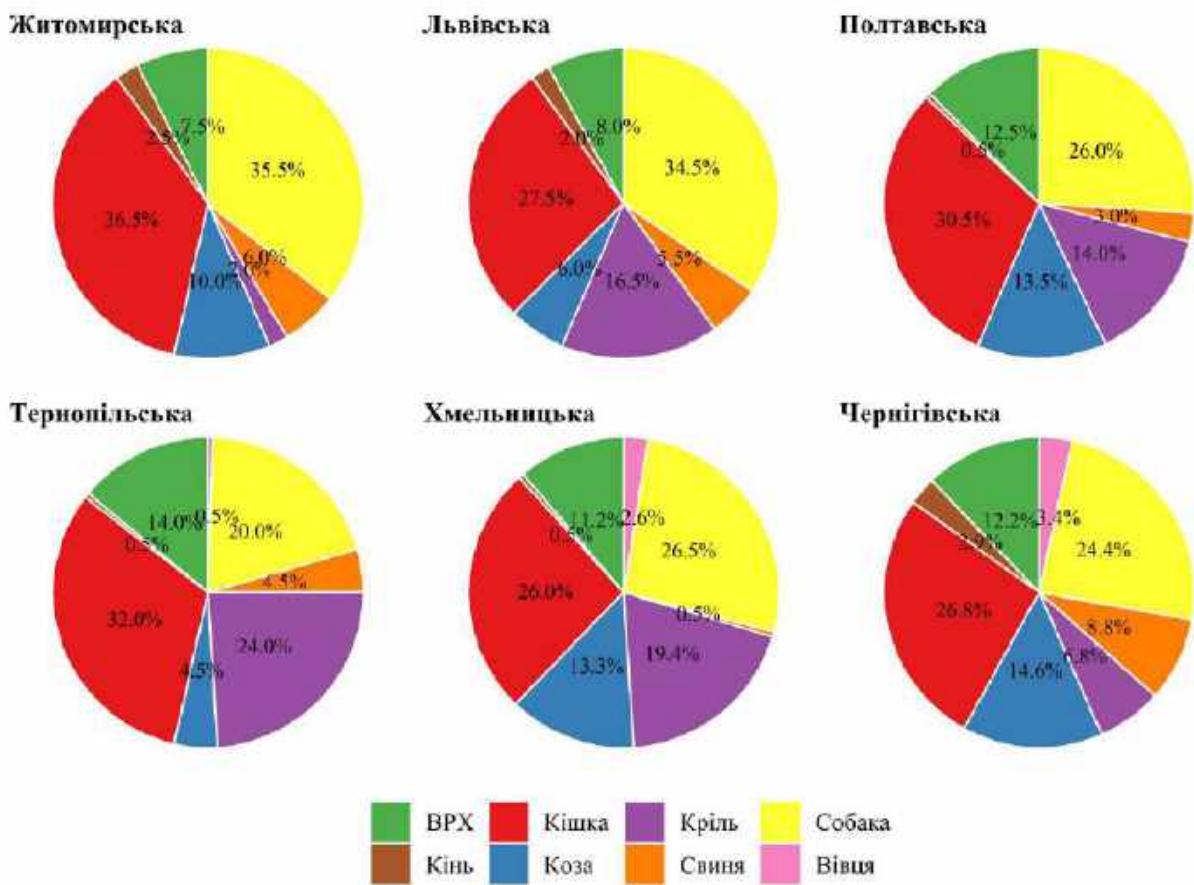


Рис. 24. Співвідношення відібраних зразків за видами тварин по окремим областям України.

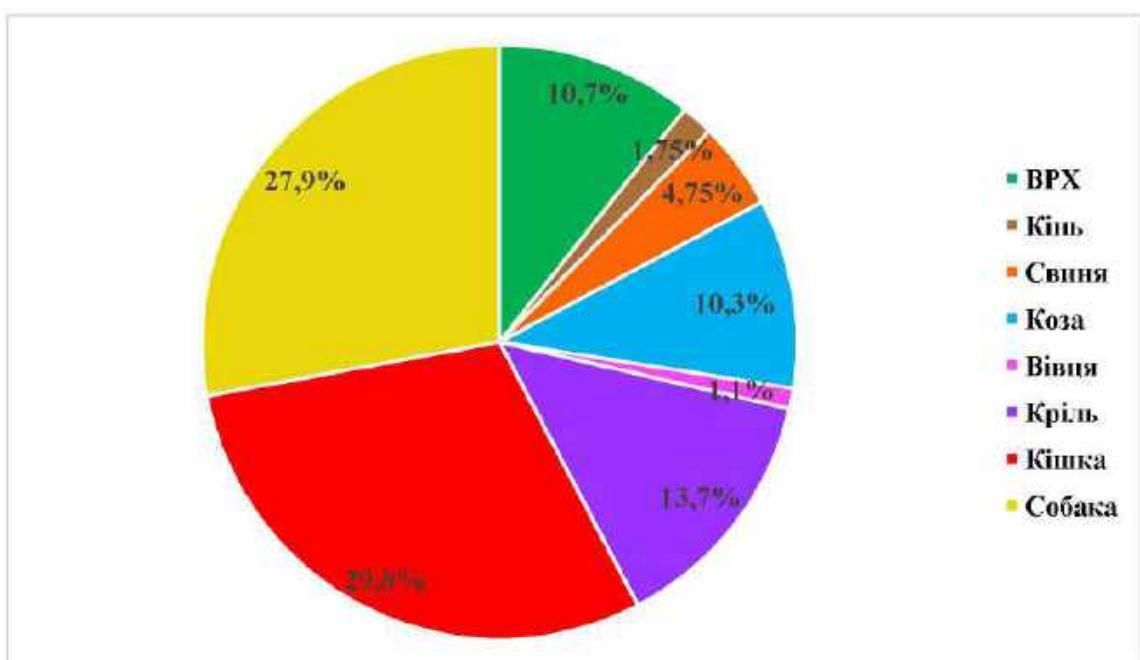


Рис. 25. Розподіл зразків за видами тварин по шести областям України.

Приватний зоопарк у Хмельницькій області

Під час виїзду в Хмельницьку область, на прохання керівника приватного зоопарку, було додатково проведено відбір проб від тварин, які там утримувались. Було взято по одному зразку від альпаки (рис. 26), верблюда (рис. 27), вівці святого якова, віслюка, яка, носухи, чорно-бурої лисиці (рис. 28), левиці, лева (рис. 29), та три зразки від карликових овець. Всього 13 зразків.

Тобто всього за час виїздів було відібрано 1214 зразків від тварин.



Рис. 26. Відбір зразка від альпаки.



Рис. 27. Відбір зразка від верблюда.



Рис. 28. Відбір зразка від чорно-бурої лисиці.



Рис. 29. Відбір зразка від лева.

2.3 Застосування реакції RT-qPCR для діагностики вірусу SARS-CoV-2.

Всі зібрани проби були досліджені на наявність специфічних фрагментів генів S, N та E, та внутрішнього контролю виділення РНК, які дозволяє виявляти тест система Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene).

Клінічні дані підтверджують 100% специфічність (95% CI 99.27%–100%) та чутливість 100% (95% CI 98.99%–100%) не тільки для уханського штаму, але й для нових варіантів вірусу: HV69/70 делеція, чутливість у відношенні якої становить 100% (95% CI 99.55%–100%) та специфічність 100% (95% CI 93.73% – 100%). Також чутливість складає 100% (95% CI 98.94% – 100%) та специфічність 98.10% (95% CI 96.53% – 99.08%) у відношенні до нової E484K мутації (дані виробника тест-набору Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene)).

У зв'язку із тим, що тест система виявляє одночасно три гена збудника, навіть мутації в певних генах дозволяють виявити потенційних мутантів при випадінні певних генів як діагностичних цілей для праймерів, включених в діагностичний набір.

Слід також наголосити, що всі зразки транспортувались в кріобоксі із сухим льодом (-70°C) та після доставки в лабораторію до проведення досліджень також зберігались в морозильних низькотемпературних камерах за температури (-70°C) для максимального збереження вірусу та уникнення температурних коливань, які можуть згубно впливати на збереженість РНК.

Зразки після доставки в лабораторію досліджувались протягом наступних робочих днів для забезпечення якнайшвидшого виявлення збудника.

В результаті досліджень, в усіх перевірених 1214 зразках не виявлено позитивних реакцій на жоден із трьох таргетних генів. При цьому внутрішні контролі виділення й оцінки якості РНК та позитивні контролі, якими комплектується тестовий набір, спрацювали як передбачено інструкцією до набору.

Таким чином, в результаті дослідження вибікових зразків від тварин в 6 областях України, наявності вірусу SARS-CoV-2 не встановлено. За результатами дослідень можна зробити припущення про неможливість досліджених видів домашніх тварин слугувати резервуаром для вірусу та являти небезпеку для зворотніх зоонозів, наражаючи на небезпеку господарів цих тварин.

2.4 Застосування реакції LAMP для діагностики вірусу SARS-CoV-2.

Протягом звітного періоду дослідження проводились згідно завдань, передбачених календарним планом, а саме: оптимізація умов проведення LAMP для діагностики вірусу SARS-CoV-2; використання LAMP для аналізу відібраних зразків; RT-PCR аналіз позитивних зразків та порівняння чутливості методу для діагностування коронавірусу з методом LAMP

Як і інші коронавіруси, SARS-CoV-2 складається з РНК-геному із позитивним ланцюгом, який містить відкриті рамки зчитування (ORF), які відповідають білкам, що обумовлюють патогенність, включаючи полімеразу 1a, 1b (РНК-залежна РНК-полімераза, RdRP), гени поверхневих білків – шипа (S), мембрани (E), внутрішньої мембрани (M), нуклеокапсиду (N) та інших білків, які необхідні вірусу для зараження клітин (рис. 30).

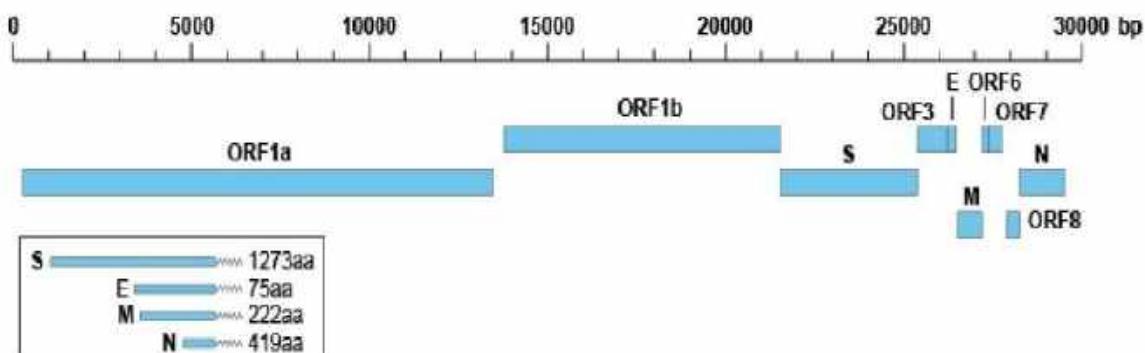


Рис. 30. Схема геному вірусу SARS-COV-2.

В зв'язку із тим, що повні послідовності геному ізолятів вірусу SARS-CoV-2 постійно публікуються у відповідних базах даних (на сьогодні більше 5 млн сіквенсів від людини), легко можна прослідити відмінності від початкового, т.з. Уханського штаму вірусу. Стала передача від людини до людини за пандемічного поширення вірусу сприяє виникненню нових мутацій, обумовлюючи гетерогенність вірусу.

Варіабільність спостерігається головним чином в певних областях генома, особливо в ORF1a, ORF3a та ORF8 регіонах. Це обумовлює

необхідність ураховувати саме консервативні ділянки геному при розробленні діагностичних тест-систем, які спрямовані на детектування найбільш консервативних елементів, які ймовірно найменше підлягають мутаційним змінам.

Для проведення досліджень, науковцям ІВМ НААН Центром громадського здоров'я МОЗ України було надано 20 зразків від людей, відібраних за період з початку жовтня до середини листопаду 2021 року з п'яти регіонів України: Запоріжжя – 3 зразки, Херсон – 2, Київ – 9, Хмельницький – 3, Суми – 3 зразки (лист ДУ ЦГЗ МОЗ України №31/6732/21 від 12.11.2021 року).

Ці зразки використовувались також при дослідженні проб, відібраних від тварин для додаткового контролю якості ПЛР.

За результатами досліджень встановлено, що за N-геном Ct коливалось в межах від 20,55 до 30,09; за S-геном Ct складало від 21,65 до 38,47 та за E-геном – від 21,65 до 37,16. Тобто в зразках спостерігалось значне варіювання вірусних геномів – від 20 до 20000 за S-геном, та від 78 до 640000 – за N геном. Це на нашу думку пов'язано з тим, що N ген є більш стабільним та не так швидко деградує при зберіганні зразків як S- та E-гени (табл. 14).

За проведення досліджень ми орієнтувались на кількість копій гену в реакційній суміші, отриманій на основі RT-qPCR аналізу. В подальшому 8 із 20 зразків були повногеномно просеквеновані з достатньою точністю зчитувань для отримання детальної інформації про мінливість збудника, та для оцінки можливого впливу на результати діагностичних тестів ПЛР.

Слід зазначити, що наявність мутацій, виявленіх за секвенування не мали негативного впливу на чутливість та специфічність RT-qPCR тесту.

Таблиця 14

Результати досліджень позитивних на SARS CoV-2 зразків, наданих для досліджень ЦГЗ МОЗ України методом RT-qPCR

Зразок	Тип	FAM		Cal Red 610		Quasar 670		HEX		Результат тесту
		E ген	C(t)	RdRP/S ген	C(t)	N gene	C(t)	Контроль виділення РНК	C(t)	
	Тип	+	26.31	+	27.23	+	24.01	+	24.46	Позитивний контроль(+)
	NC	-	N/A	-	N/A	-	N/A	-	N/A	Негативний контроль(-)
66288	SAMPLE	+	33.33	+	36.28	+	26.36	+	31.66	SARS-CoV-2
66302	SAMPLE	+	37.16	+	38.47	+	23.48	+	30.80	SARS-CoV-2
66264	SAMPLE	-	N/A	-	N/A	+	29.25	+	31.24	SARS-CoV-2
66254	SAMPLE	+	28.92	+	30.42	+	21.65	+	29.32	SARS-CoV-2
66272	SAMPLE	+	20.19	+	26.36	+	23.70	+	27.97	SARS-CoV-2
65175	SAMPLE	+	18.73	+	33.23	+	30.08	+	30.50	SARS-CoV-2
65177	SAMPLE	+	32.68	+	33.90	+	29.15	+	30.02	SARS-CoV-2
65276	SAMPLE	+	23.64	+	26.34	+	21.14	+	27.89	SARS-CoV-2
65273	SAMPLE	+	28.40	+	30.92	+	24.87	+	29.74	SARS-CoV-2
65183	SAMPLE	+	32.69	+	33.43	+	26.99	+	30.64	SARS-CoV-2
65060	SAMPLE	+	36.29	+	37.53	+	30.09	+	30.10	SARS-CoV-2
65148	SAMPLE	+	28.02	+	28.67	+	26.18	+	28.78	SARS-CoV-2
65143	SAMPLE	+	12.75	+	31.25	+	29.49	+	29.88	SARS-CoV-2
65173	SAMPLE	+	14.84	+	29.08	+	27.99	+	32.19	SARS-CoV-2
65215	SAMPLE	+	28.51	+	29.58	+	22.77	+	26.95	SARS-CoV-2
65271	SAMPLE	+	24.44	+	26.89	+	17.88	+	25.93	SARS-CoV-2
66271	SAMPLE	+	32.90	+	34.16	+	20.14	+	28.17	SARS-CoV-2
66280	SAMPLE	+	23.33	+	23.95	+	20.55	+	25.62	SARS-CoV-2
66281	SAMPLE	+	26.05	+	26.78	+	23.71	+	28.82	SARS-CoV-2
66278	SAMPLE	+	21.65	+	24.87	+	22.38	+	26.78	SARS-CoV-2

Для проведення досліджень використовували набори праймерів для проведення LAMP, розраховані на ділянки генів: нуклеокапсидний ген N-ген та оболонковий ген S-ген SARS-CoV-2. Послідовності представлено в таблиці 15. Також був застосований набір праймерів на фрагмент 18S pРНК для оцінки стану зразків та правильності проведення реакції.

Таблиця 15

Перелік праймерів для виявлення специфічних ділянок геному збудника**методом LAMP (Wei E. Huang et al., 2020)**<https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>

Мішень	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів, 5'-3'
N-ген SARS-CoV-2 (нуклеокапсид)	F3	AGATCACATTGGCACCCG
	B3	CCATTGCCAGCCATTCTAGC
	FIP	TGCTCCCTTCTGCGTAGAAGCCAATGCTGCAATCGTGCTAC
	BIP	GGCGGCAGTCAAGCCTTCCCTACTGCTGCCTGGAGTT
	LF	GCAATGTTGTTCCCTTGAGGAAGTT
	LB	GTTCCCTCATCACGTAGTCGCAACAN
S-ген SARS-CoV-2 (оболонка)	F3	TCTTCACACGTGGTGT
	B3	GTACCAAAAATCCAGCCTC
	FIP	CATGGAACCAAGTAACATTG-GAAAACCTGACAAAGTTTCAGATCC
	BIP	CTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGACTTCTCAGTGGAAAGCA
	LF	GAAAGGTAAGAACAAAGTCCTGAGT
	LB	CTGTCCTACCATTAAATGATGGTGT
RNase P POP7- 18S рРНК (внутрішній контроль наявності та стану дослідного матеріалу у зразків)	RNaseP- POP7-F3	TTG ATG AGC TGG AGCCA
	RNaseP- POP7-B3	CACCCCTCAATGCAGAGTC
	RNaseP- POP7-FIP	GTGTGACCTGAAGACTCGGTTTAGCCACTGACTC GGATC
	RNaseP- POP7- BIP	CCTCCGTGATATGGCTCTCGTTTTCTTACATGGCT CTGGTC
	RNaseP- POP7-LF	ATGTGGATGGCTGAGTTGTT
	RNaseP- POP7-LB	CATGCTGAGTACTGGACCTC

Виконавцями проекту було проведено оптимізацію складу реакційної суміші для проведення тесту на основі літературних даних та власних досліджень. Найоптимальніший склад реакційної суміші для проведення RT-LAMP представлено в таблиці 16.

Таблиця 16

**Склад суміші для проведення реакції LAMP
(на 25 мкл загального об'єму)**

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10X буфер для ізотермальної ампліфікації	2.5 μ L	
100 mM MgSO ₄ (NEB)	1.13 μ L	6.5 mM (4.5 mM та 2 mM в 1X буфері)
10 mM суміш dNTPs	3.5 μ L	1.4 mM
10X суміш праймерів	2.5 μ L	0.2 μ M F3 0.2 μ M B3 1.6 μ M FIP 1.6 μ M BIP 0.8 μ M LF 0.8 μ M LB
Bst LF ДНК полімераза	1 μ L	8 одиниць / реакція
Термостабільна зворотня транскриптаза	0.5 μ L	7.5 одиниць /реакція
Nuclease-free water	7.87 μ L	-
інтеркалуючий барвник SYTO16	1 μ L	-
РНК зразка	5 μ L	-
Загальний об'єм		25 μ L

Оптимальні умови проведення RT-LAMP ампліфікації з колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою були підібрані учасниками проекту експериментально із урахуванням того, що суміш повинна бути мінімально необхідною за складом для проведення реакції, оскільки необхідно було забезпечити, щоб зміна pH розчину, а власне і забарвлення після проходження реакції змінювалась лише під впливом продуктів специфічної ампліфікації, які накопичуються в реакційній суміші.

Оптимальний склад реакційної суміші представлено в таблиці 17

Таблиця 17

Склад реакційної суміші для проведення реакції RT-LAMP з колориметричним детектуванням результату реакції (на 25 мкл загального об'єму)

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10X буфер для ізотермальної ампліфікації	2,5 μ L	3M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -10 μM , 100 μM MgSO_4 -8 μM , 2M KCl -10 μM , Твін 20-0.1 % v/v
25X розчин барвника pH 8.6	1,0 μL	0,1 μM
10 mM суміш dNTPs	3,5 μL	1.4 μM
25X суміш праймерів	2 μL	0.2 μM F3 0.2 μM B3 1.6 μM FIP 1.6 μM BIP 0.8 μM LF 0.8 μM LB
Bst LF ДНК полімераза	1 μL	8 одиниць / реакція
Термостабільна зворотня транскриптаза	0.5 μL	7.5 одиниць /реакція
Nuclease-free water	9,5 μL	-
РНК зразка	5 μL	-
Загальний об'єм		25 μL

Умови LAMP для детектування специфічного фрагменту геному вірусу SARS-CoV-2 складалися із 60–120 циклів за температури 64°C із тривалістю кожного циклу 30 с (всього 30–60 хвилин).

Результат ампліфікації РНК вірусу SARS CoV-2 реєстрували на каналі флуоресценції FAM/SYBR. Облік результатів ПЛР аналізу проводиться за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції з встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу Ct. Результати аналізу вважали достовірними, якщо значення Ct по каналам FAM/SYBR позитивних контрольних зразків менше або дорівнює 35 ($Ct \leq 35$).

Встановлення ліміту визначення цільових фрагментів геному в реакції RT-LAMP у реальному часі показано на рисунках (рис. 31, 32). При цьому експериментально встановлено, що для детектування фрагменту S-гена та фрагмента N-гена – в реакційній суміші (пробі) повинно бути не менше

300 копій геному в пробі, тобто в дослідженому зразку кількість вірусних часток для достовірного виявлення збудника не повинна бути менше, ніж 300 копій. Для колориметричної RT-LAMP гранична детектована кількість повинна складати не менше 2500 копій S- та N-генів в пробі.

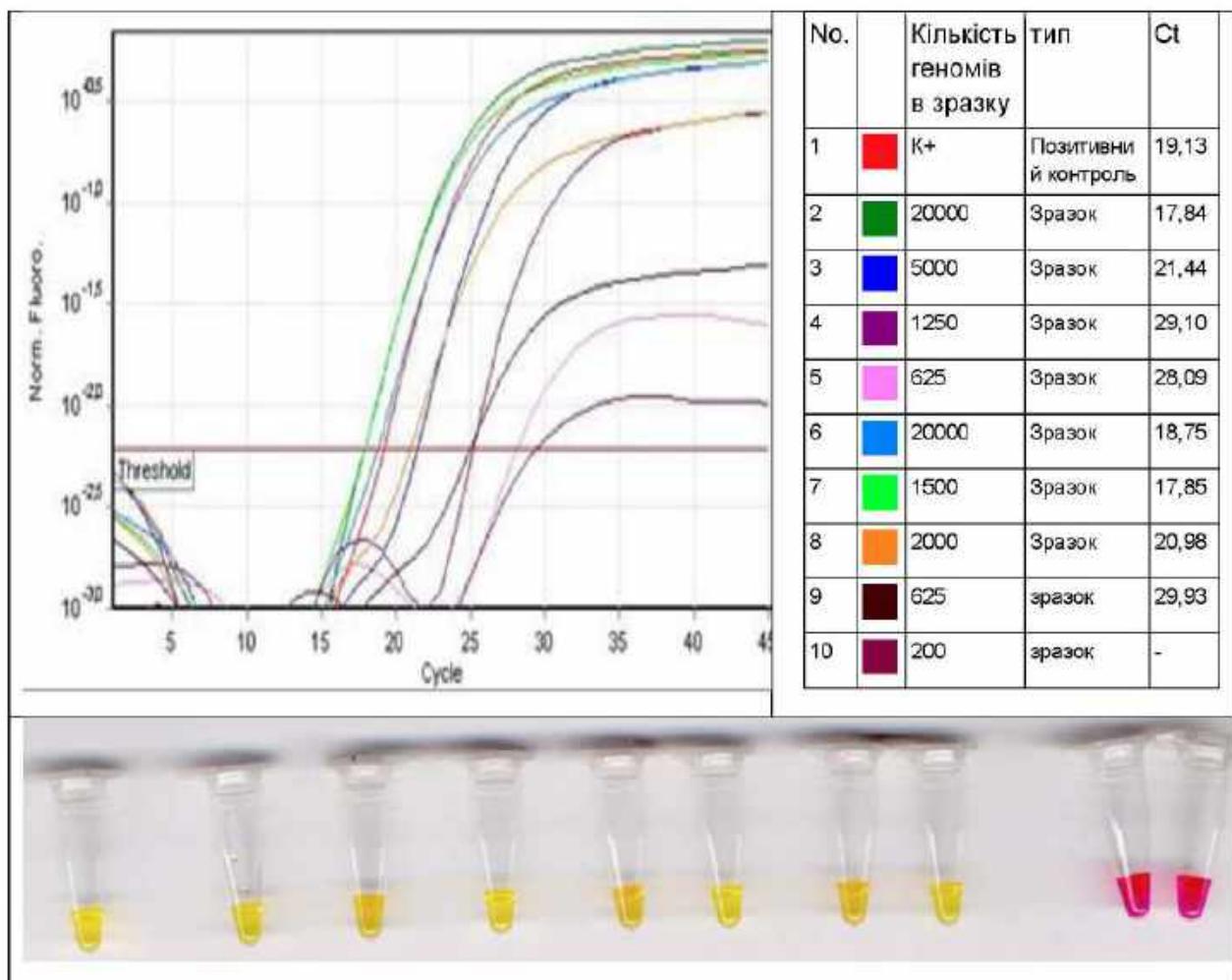


Рис. 31. Ліміт визначення SARS-CoV-2 фрагмента N-гена в RT-LAMP в режимі реального часу з використанням позитивних зразків з відомою кількістю копій генома вірусу та колориметричним визначенням за кінцевою точкою (цикли відповідають хвилинам).

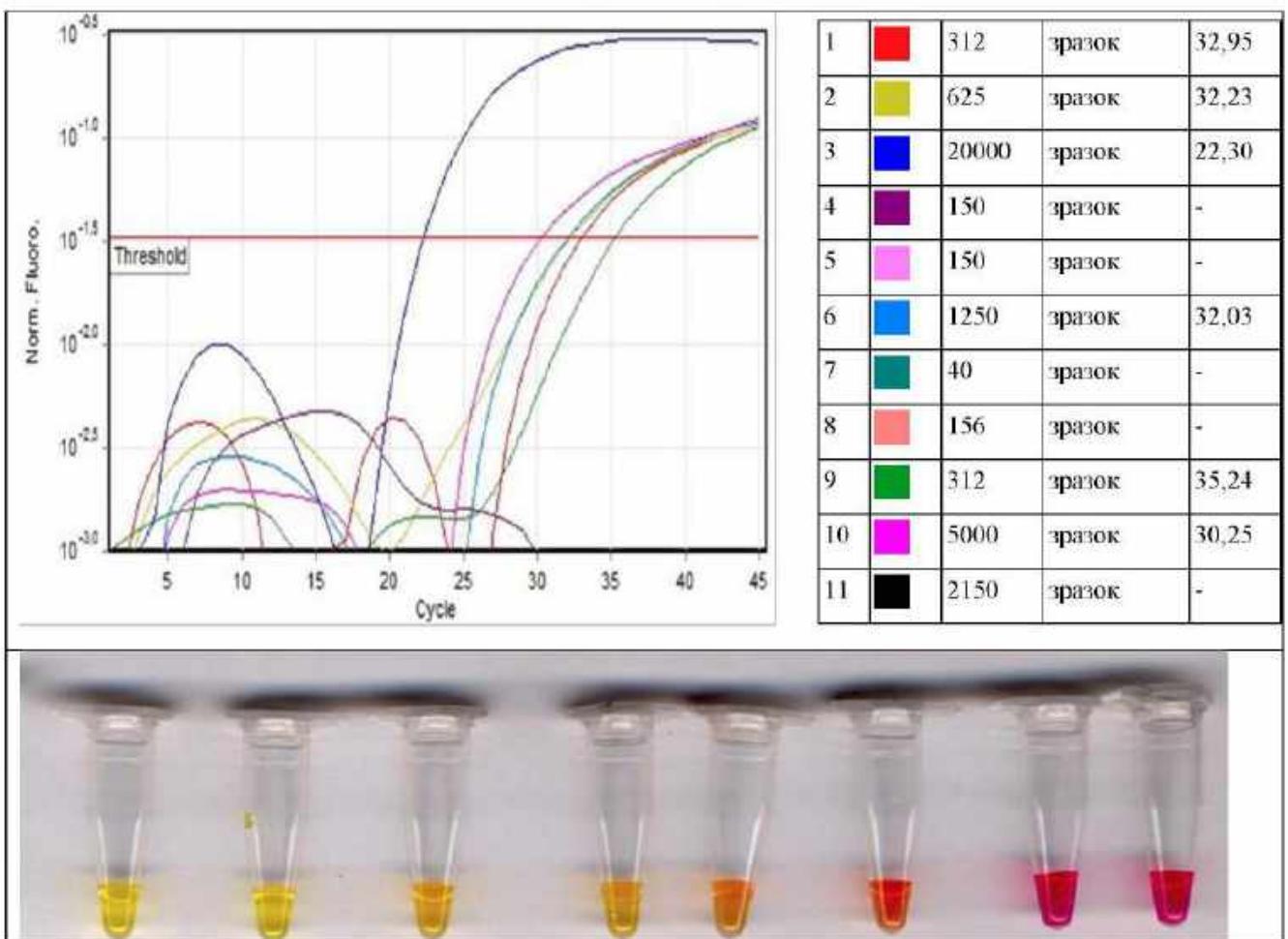


Рис. 32. Ліміт визначення SARS-CoV-2 фрагмента S-гена в режимі реального часу з використанням позитивних зразків з відомою кількістю геномів вірусу в зразку та колориметричним визначенням за кінцевою точкою (цикли відповідають хвилинам).

Реєстрацію продуктів реакції у кінцевій точці проводили візуально за зміною кольору після закінчення реакції (30–45 хв). За отримання позитивного результату колір реакційної суміші змінюється на померанчево-жовтий. Негативні зразки так само, як і негативний контроль, не змінюють забарвлення після закінчення реакції і зберігають червоно-фіолетовий колір.

Приклад візуального детектування продукту реакції RT-LAMP за зміною кольору реакційної суміші наведено на фотографії (рис. 33).

Використання методу петлевої ізотермічної ампліфікації RT-LAMP розглядається нами як перспективний та надійний метод виявлення вірусу SARS-CoV-2 в лабораторних умовах. Критичним моментом виступає вірусне

навантаження в пробі, чим більше вірусних часток в пробі тим точніше результат дослідження.

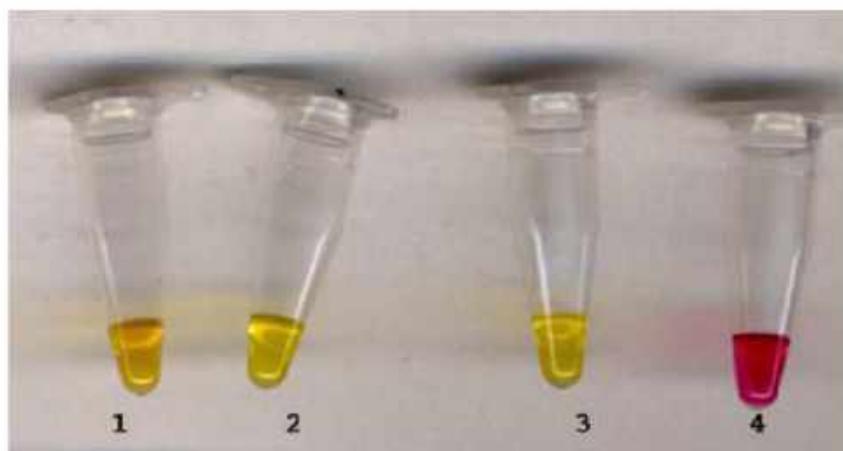


Рис. 33. Зміна кольору реакційної суміші (барвник – феноловий червоний) після закінчення RT-LAMP: 1–2 – позитивні результати, 3 – позитивний контроль, 4 – негативний контроль.

На малюнку 32 показано, що набір олігонуклеотидів для гена N був здатний виявляти 2500 молекул РНК вірусу у тестовій реакції з 2–5 мкл тестової РНК у вигляді розчину, про що свідчить перехід від червоного до жовтого кольору. Спочатку реакцію проводили протягом від 20 хвилин до 1 години за температури 64°C. Експериментальним шляхом було встановлено, що збільшення часу реакції більше 30–35 хв, негативно впливає на достовірність отриманих результатів. Це повязано із початком неспецифічної ампліфікації, що є відомою проблемою RT-LAMP. Тому час проведення реакції 30 хв є оптимальним для отримання достовірних результатів.

У колориметричній реакції RT-LAMP позитивні зразки з $C_t < 30$ змінили колір фенолового червоного барвника з малинового на жовтий протягом перших 30 хв реакції. Зразки з C_t 30–40 або не міняли колір, або міняли в період з 35 до 60 хвилин (період спостереження), одночасно зміна кольору спостерігається у деяких негативних зразків в період після 35 хвилин інкубації.

Нами встановлено, що для кращого обліку реакції, після того як RT-LAMP інкубували при 64°C, перед обліком результатів необхідно охолодити пробірки на льоді протягом 30 с. На рисунках 31–33 пробірки,

забарвлені жовтим кольором вказують на успішну ампліфікацію RT-LAMP фрагмента цільових генів SARS-CoV-2 (з використанням N та S наборів праймерів). Негативні проби зберігають червоне забарвлення до кінця рекомендованого періоду реакції.

Кількісна оцінка зміни кольору від червоного до жовтого у всіх лунках можлива також за допомогою спектрофотометричних вимірювань OD. Значення кольору в задані моменти часу кількісно визначається як різниця між довжинами хвиль двох максимумів поглинання застосованого барвника фенолового червоного: $\Delta OD = OD_{434} \text{ нм} - OD_{560} \text{ нм}$. Жовті (позитивні) зразки характеризуються ΔOD приблизно 0,3 до 0,4 одиниць. Для кожного зразка колір лінії вказує на отримане значення СТ (поріг циклу), з даних RT-qPCR (з використанням комерційної тест-системи Allplex SARS-CoV-2 assay).

На рисунку 34 та в таблиці 18 представлені підходи, які були застосовані для оптимізації складу реакційної суміші та режиму проведення реакції. В результаті було встановлено, що найкращій ефект забезпечує додавання до реакційної суміші 0,5 мкл сульфату магнія (фінальна концентрація в реакційній суміші 6,5 мкмоль).

Таблиця 18

Визначення оптимального складу реакційної суміші для проведення реакції RT-LAMP (на 25 мкл загального об'єму)

Назва ферменту	10X буфер	MgSO4	MgCl2	dNTP's (2 mM)	Кількість ферменту
Bst LF	2,5 μL	0,5 μL	-	1 μL	8,0 Од
Bst 2.0	2,5 μL	1 μL	-	1 μL	8,0 Од
Bst 3.0	2,5 μL	-	-	1 μL	4,0 Од
RTx	2,5 μL	-	-		7,5 Од

Час інкубування	Інтеркалюючий барвник CYTO 16 (1:100)	Lamp Primers Mix(10X)	Concentration of Primers in Lamp Primer Mix (10X)		
			F3/B3	FIP/BIP	LF/LB
55°C for 35	1 μL	1 μL	0.2 μM	1.6 μM	0.8 μM
58°C for 35 min	0,5 μL	1 μL	0.2 μM	1.6 μM	0.8 μM
60°C for 35 min	0,5 μL	1 μL	0.2 μM	1.6 μM	0.4 μM
64°C for 35min	0.5 μL	1 μL	0.2 μM	1.6 μM	0.4 μM
64°C for 45 min	0.5 μL	1 μL	0.2 μM	1.6 μM	0.8 μM

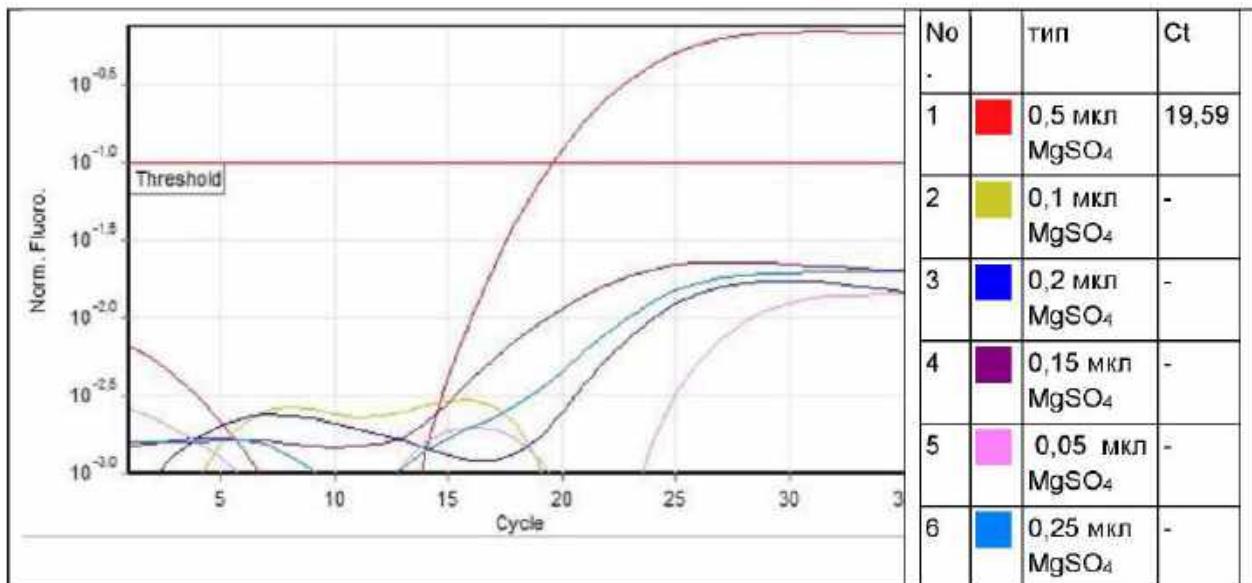


Рис. 34. Визначення оптимальної концентрації йонів Mg для проведення реакції RT-LAMP (Bst LF полімераза).

Не зважаючи на те, що ряд авторів стверджує про виключно високу специфічність та чутливість RT-LAMP, нам вдалося отримати результати, які збігаються із такими, що отримані класичним методом RT-qPCR лише за умов значного вмісту вірусних геномів в реакції (пробі). Значення Ct при цьому повинно знаходитись в межах не більше 25. Для зразків в межах Ct 26–30 чутливість та специфічність RT-LAMP значно зменшується (табл. 19, 20, рис. 35). Для проб з низькою кількістю цільових геномів, що є характерним для Ct 35–45, застосовувати RT-LAMP недоцільно через низьку специфічність та високий ризик отримання хибнопозитивних та хибненегативних результатів.

Таблиця 19

**Визначення чутливості та специфічності LAMP щодо детектування
S гену SARS-CoV-2**

Зразок	РТ-ПЛР		Кількість копій геному В пробі	Результат тесту RT-LAMP	Результат тесту RT-LAMP з візуальною оцінкою результату реакції	Результат тесту RT-qPCR
	S-ген	C(t)в RT-qPCR				
ПК	+	27.23	2500	+	+	Позитивний контроль(+)
НК	-	N/A	-	-	-	Негативний контроль(-)
66288	+	36.28	5	-	-	+
66302	+	38.47	2	-	-	+
66264	-	N/A	-	-	-	-
66254	+	30.42	312	+	-	+
66272	+	26.36	5000	+	+	+
65175	+	33.23	40	-	-	+
65177	+	33.90	42	+	-	+
65276	+	26.34	5000	+	+	+
65273	+	30.92	156	+	-	+
65183	+	33.43	40	-	-	+
65060	+	37.53	5	-	-	+
65148	+	28.67	1250	+	-	+
65143	+	31.25	156	-	-	+
65173	+	29.08	625	+	-	+
65215	+	29.58	625	+	-	+
65271	+	26.89	5000	+	+	+
66271	+	34.16	20	-	-	+
66280	+	23.95	20000	+	+	+
66281	-	26.78	5000	+	+	+
66278	+	24.87	20000	+	+	+
654	-	-	-	-	-	-
656	-	-	-	-	-	-
657	-	-	-	-	+	-
658	-	-	-	-	+	-
659	-	-	-	-	-	-
700	-	-	-	-	-	-

Таблиця 20

**Визначення чутливості та специфічності LAMP щодо детектування
N гену SARS-CoV-2**

Зразок	РТ-ПЛР		Кількість копій геному В пробі	Результат тесту РТ-LAMP	Результат тесту LAMP з візуальною оцінкою результату реакції	Результат тесту RT-qPCR
	N-gene	C(t) в РТ ПЛР				
	+	24.01	5000	+	+	Позитивний контроль(+)
	-	N/A	-	-	-	Негативний контроль(-)
66288	+	26.36	1250	+	+	+
66302	+	23.48	5000	+	+	+
66264	+	29.25	156	-	-	+
66254	+	21.65	20000	+	+	+
66272	+	23.70	5000	+	+	+
65175	+	30.08	78	-	-	+
65177	+	29.15	156	-	-	+
65276	+	21.14	40000	+	+	+
65273	+	24.87	5000	+	+	+
65183	+	26.99	625	+	-	+
65060	+	30.09	78	-	-	+
65148	+	26.18	1250	+	-	+
65143	+	29.49	78	-	-	+
65173	+	27.99	312	-	-	+
65215	+	22.77	20000	+	+	+
65271	+	17.88	640000	+	+	+
66271	+	20.14	80000	+	+	+
66280	+	20.55	80000	+	+	+
66281	+	23.71	5000	+	+	+
66278	+	22.38	10000	+	+	+
654	-	-	-	-	-	-
656	-	-	-	-	+	-
657	-	-	-	-	-	-
658	-	-	-	-	-	-
659	-	-	-	-	-	-
700	-	-	-	-	-	-

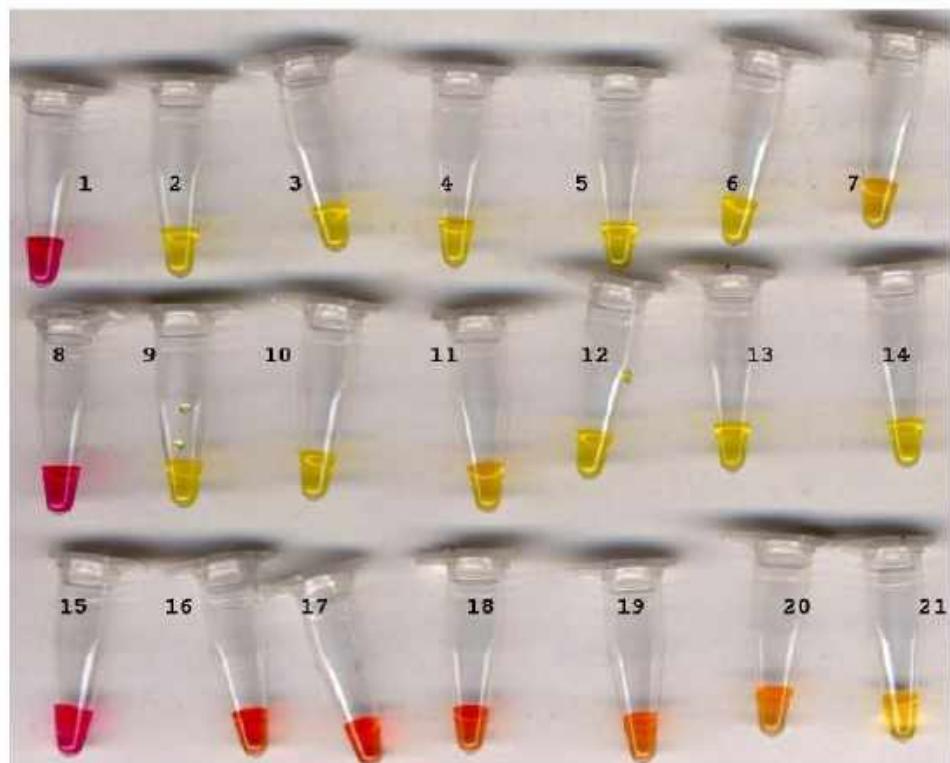
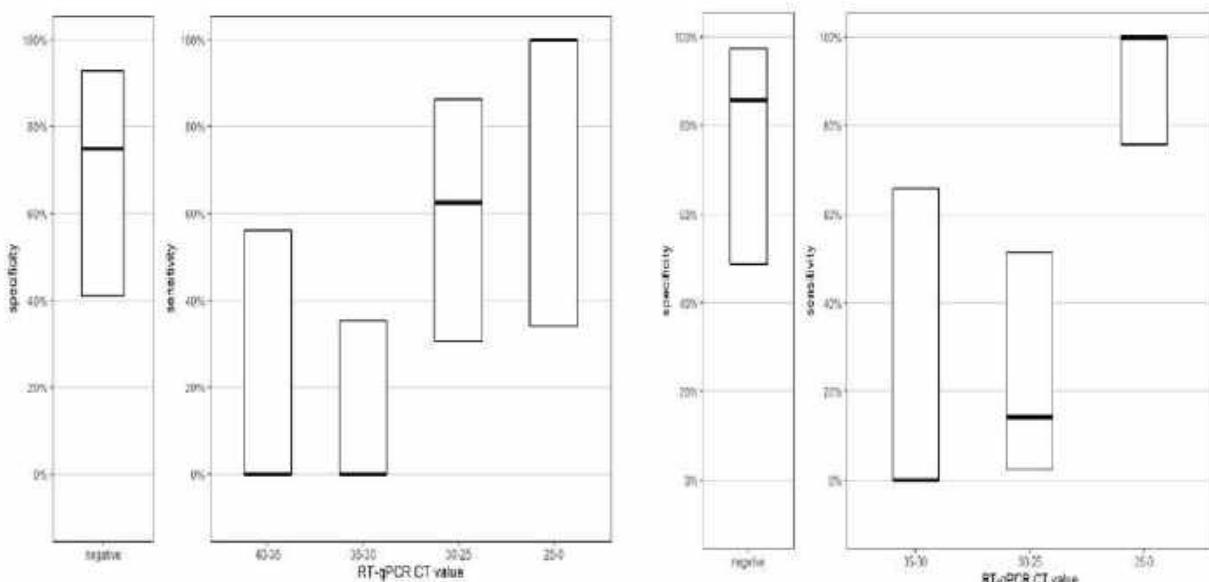


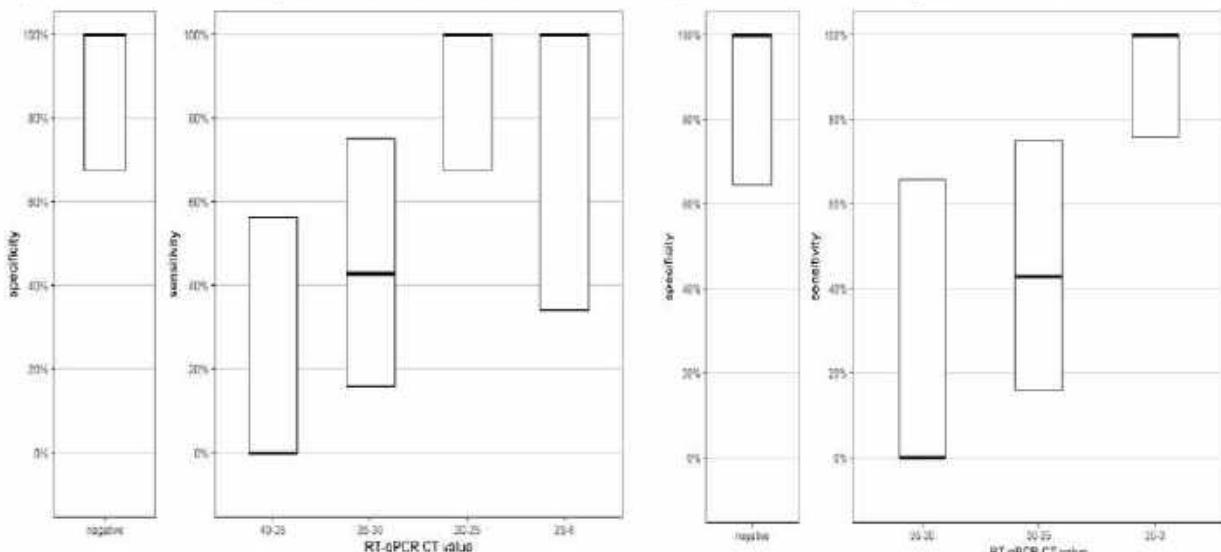
Рис. 35. Визначення чутливості та специфічності RT-LAMP з візуальною оцінкою результату за кінцевою точкою за детекції N гену SARS-CoV-2 (1 – негативний контроль; 2–6, 9–10, 12–14 – позитивні результати зразків з Ct 20–25; 7, 11, 20, 21 – позитивні результати зразків з Ct 26–27; 8, 15, 16–19 – сумнівні та негативні результати для зразків з Ct 28–30).

За результатами досліджень нами встановлено, що кількість N гену в пробах дещо вища за кількість S гену, тому набір праймерів, розрахований на виявлення специфічних фрагментів N гену має вищу специфічність та чутливість у порівнянні із набором праймерів, спрямованих на детекцію специфічних ділянок S гену вірусу SARS-CoV-2 (рис. 36).



А) RT-LAMP візуальна оцінка S-ген

Б) RT-LAMP візуальна оцінка N-ген



В) RT-LAMP в реальному часі S-ген

Д) RT-LAMP в реальному часі N-ген

Рис. 36. Чутливість та специфічність методів RT-LAMP в реальному часі та RT-LAMP з візуальною оцінкою результату за кінцевою точкою (95% довірчий інтервал Вілсона для 25 зразків)

RT-LAMP може бути застосований для детекції вірусу у зразках із значною кількістю геномів збудника – від 600 та більше. За значень в RT-qPCR $Ct < 25$, метод відповідає чутливості та специфічності стандартному тесту RT-qPCR. Для проведення колориметричної оцінки реакції за кінцевою точкою не рекомендується використання часу реакції більше 30 хвилин,

оскільки неспецифічна пізня ампліфікація може викликати хибнопозитивні результати.

На рисунках 37 та 38 показані графіки проведення досліджень зразків із відомою кількістю геномів в пробі та негативних із застосуванням оптимізованих умов та часу реакції. В результаті нам вдалося отримати очікувані результати.

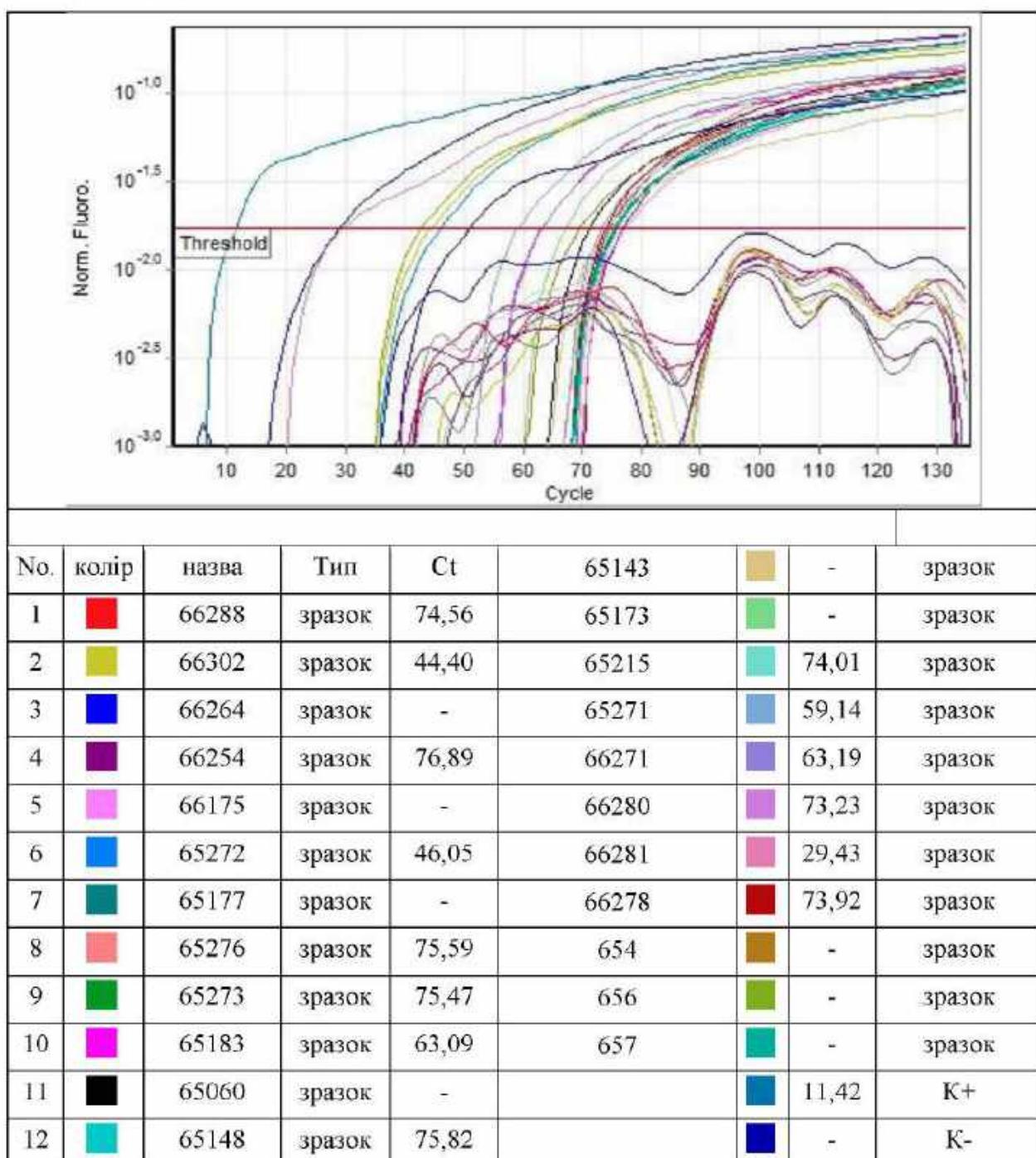
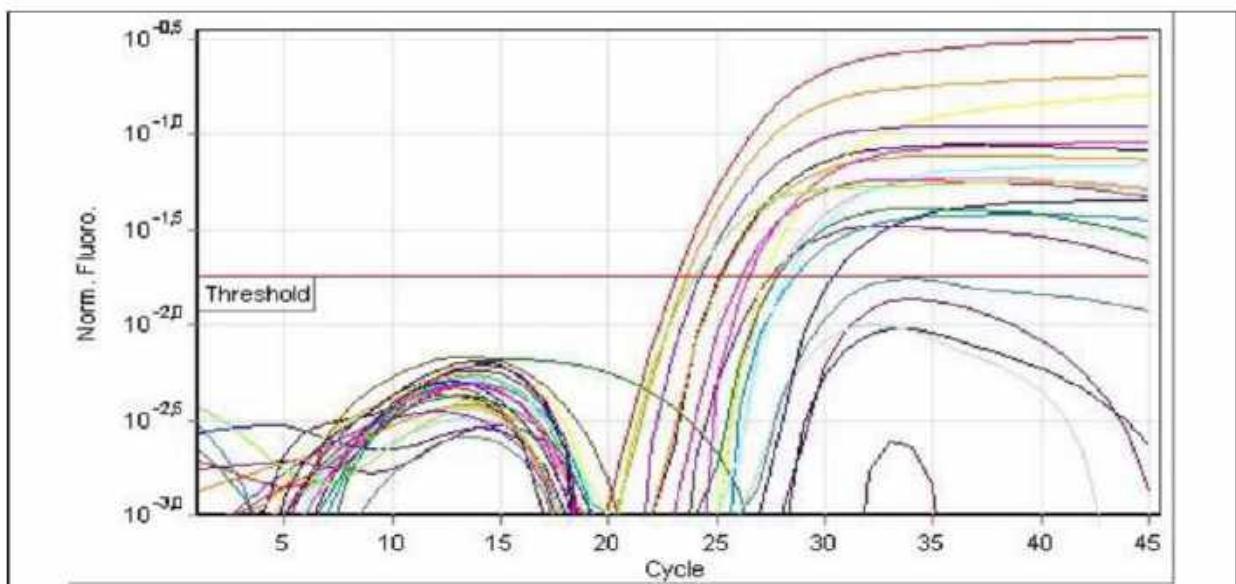


Рис. 37. Дослідження зразків в RT-LAMP щодо детектування N гену SARS-CoV-2 (детектування по каналу GREEN кожні 20 секунд)



No.	колір	назва	Тип	Ct				зразок
1	■	66254	зразок	23,15	65173	■	28,32	зразок
2	■	66288	зразок	-	66264	■	-	зразок
3	■	66302	зразок	-	654	■	-	зразок
4	■	66254	зразок	27,56	656	■	-	зразок
5	■	66276	зразок	27,75	66280	■	24,23	зразок
6	■	65272	зразок	28,62	66281	■	26,10	зразок
7	■	65175	зразок	-	66278	■	26,47	зразок
8	■	65148	зразок	23,58	65271	■	30,40	зразок
9	■	65273	зразок	25,10	66272	■	23,95	зразок
10	■	65183	зразок	-	657	■	-	зразок
11	■	65060	зразок	-	K+	■	27,84	K+
12	■	65215	зразок	27,26	K-	■		K-

Рис. 38. Дослідження зразків в RT-LAMP щодо детектування S гену SARS-CoV-2 (детектування по каналу GREEN кожні 20 секунд).

При аналізі результатів випробувань методу RT-LAMP для набору праймерів на фрагмент гена N, ми спостерігали обмеження чутливості близько $Ct \approx 30\text{--}32$. Пряме порівняння значень Ct для набору праймерів гену S та гену N для всіх зразків виявлено різницю приблизно 1,2–2,3 Ct. Це дозволило припустити, що праймери гена N були більш чутливими ніж праймери гену S для виявлення РНК SARS-CoV-2 за допомогою даного тесту.

Для визначення специфічності і чутливості аналізу RT-LAMP, ми проаналізували всі наявні позитивні зразки. Всього ми проаналізували 25 зразків РНК, повторюючи дослідження щонайменше 3 рази. Візуалізація результатів аналізу RT-LAMP через 30 хв після початку інкубації при 64°C показали очікувані результати, що вказує на те, що RT-LAMP аналіз мав достатню відтворюваність. Узгодженість результатів під час аналізу підтвердила поріг $\Delta OD > +0,3$ як надійний показник для ідентифікації зразків, які були позитивними на РНК SARS-CoV-2.

Також нами встановлено, що RT-qPCR – позитивні зразки з $Ct < 30$ показали позитивні результати в аналізі RT-LAMP, тоді як майже всі зразки зі значеннями Ct від 30 до 40 показали негативний результат.

Ми також спостерігали невеликі варіювання між різними постановками одних і тих самих проб що, ймовірно, викликано похибками операторів в роботі із матеріалами та реагентами. Ми також отримали кілька негативних зразків в RT-qPCR, які дали позитивні результати аналізу в реакції RT-LAMP.

Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4% (95% довірчий інтервал Вільсона: 64,8 до 99,9%), а також чутливість для зразків з $Ct < 30$ на RT-qPCR було 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 78,8 до 99,7%). Для гену S загальна специфічність склала 92,8% (95% довірчий інтервал Вільсона: 65,7 до 99,9%), а також чутливість для зразків з $Ct < 30$ на RT-qPCR була 96,8% (95% довірчий інтервал Вільсона: Від 38,9 до 99,9%) (рис. 36).

Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7% (95% довірчий інтервал Вілсона: 48,7 до 97,9%), а також чутливість для зразків з $Ct < 30$ на RT-qPCR складала 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 75,6 до 99,9%). Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75% (95% довірчий інтервал Вілсона: 40,9 до 92,8%), а також чутливість для зразків з $Ct < 30$ на RT-qPCR була 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: Від 34,2 до 99,3%) (Рис 36).

2.5 Секвенування геному штамів коронавірусу, що циркулює в Україні, та їх біоінформаційний аналіз.

Протягом звітного періоду виконували наступні завдання, передбачені планом виконання робіт:

Завдання 1. Секвенування отриманої РНК вірусу.

Завдання 2. Філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності ізолятів вірусу, що поширені в Україні, та їх порівняння з відомими сіквенсами SARS-CoV-2.

Завдання 3. Виявлення за результатами сіквенсу можливих мутацій в геномі вірусу та визначення їх локалізації.

Оскільки система для секвенування була придбана в кінці серпня 2021 року, доставка, інсталяція та сервісний запуск приладу був здійснений лише в кінці жовтня, роботи за завданнями: секвенування отриманої РНК вірусу, філогенетичний аналіз нуклеотидної послідовності ізолятів вірусу, що поширені в Україні, та їх порівняння з відомими сіквенсами SARS-CoV-2 та виявлення за результатами сіквенсу можливих мутацій в геномі вірусу та визначення їх локалізації виконувались протягом листопаду 2021 року, тому були просеквеновані лише 12 зразків із 20 наявних, при цьому із достатньою якістю отримано 8 сіквенсів.

Зразки були мічені молекулярними мітками, які зазначаються в тексті нижче як номери зразків, при цьому загальний опис 8 найкращіх зразків наводиться в таблиці 21.

Таблиця 21
Характеристика зразків для проведення секвенування

Номер зразка	Ідентифікатор	Місце виділення	Ст в RT-qPCR за N геном
2	65060	Хмельницький ОЦКПХ МОЗ України	30
3	65175	Сумський ОЦКПХ МОЗ України	30
7	66254	Київський МЦКПХ МОЗ України	21
13	66271	Київський МЦКПХ МОЗ України	20
14	66280	Київський МЦКПХ МОЗ України	20
516	66288	Київський МЦКПХ МОЗ України	26
592	65148	Волинський ОЦКПХ МОЗ України	26
593	65173	Сумський ОЦКПХ МОЗ України	27

На першому чіпі отримано 3 послідовності прийнятної якості (№№ 516, 592, 593), на другому 5 (№№ 2, 3, 7, 13, 14).

Зчитані з чіпу сирі дані завантажуються на вбудований сервер приладу. Після декодування сигналу в літери генетичного коду і перед вирівнюванням прочитань на референсний геном програмне забезпечення секвенатора генерує первинну статистику, яка дозволяє дати грубу, початкову оцінку ефективності експерименту: завантаження чіпу, кількість зчитаних баз, кількість послідовностей, довжини прочитань тощо (рис. 39–41). В нашому досліді вдалося досягти високого завантаження чіпів. В першому з них 93% всіх комірок містять ISP (Ion Sphere Particles), завантаження рівномірне, із поодинокими бульбашками повітря на периферії. Другий завантажено на 87%, рівномірно, з помірною кількістю бульбашок (рис. 39).

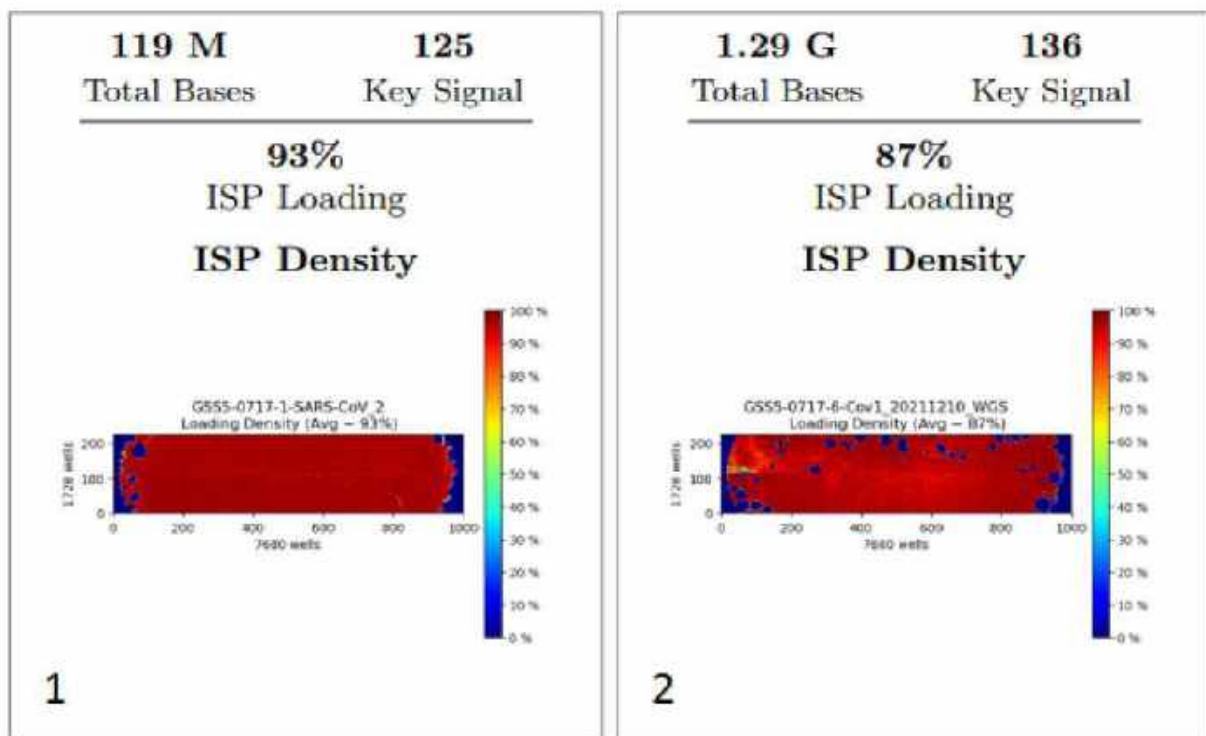


Рис. 39. Кольорове зображення щільності завантаження чіпу. Темно-червоним – ділянки високого завантаження, темно-синім – низького завантаження. Зліва чіп №1, зправа – №2.

Далі програмне забезпечення приладу відфільтровує неспеціфічні дані і дані невідповідної якості: поліклональні (polyclonal) ISP, тестові послідовності виробника, димери адаптерів, послідовності низької якості (рис. 40).

Поліклональні ISP утримують різні амплікони – неідентичні фрагменти ДНК. Це не дозволяє отримати в комірці чіпу однозначний сигнал зміни pH в кожному циклі роботи секвенатора. Тестові послідовності додаються як контроль для оцінки виконання секвенування. Димери адаптерів – послідовності між адаптерами коротші ніж 8 нуклеотидів. ISP низької якості – такі, що генерують низький або нерозпізнаний сигнал.

На першому чіпі відсоток поліклональних ISP склав 37%. Моноклональних (clonal) ISP – 63% (7 380 738 прочитань), з них 90% являють собою: ISP з тестовими послідовностями виробника – 1%, ISP з димерами адаптерів – 68%, ISP низької якості – 21%. Після проходження всіх описаних фільтрів даних на частку ISP придатних для подальшого аналізу (Final library) залишилось 6,6% (765 213 прочитань різної довжини, 119 млн нуклеотидів), або 10% від кількості завантажених до чіпу моноклональних ISP (рис. 41).

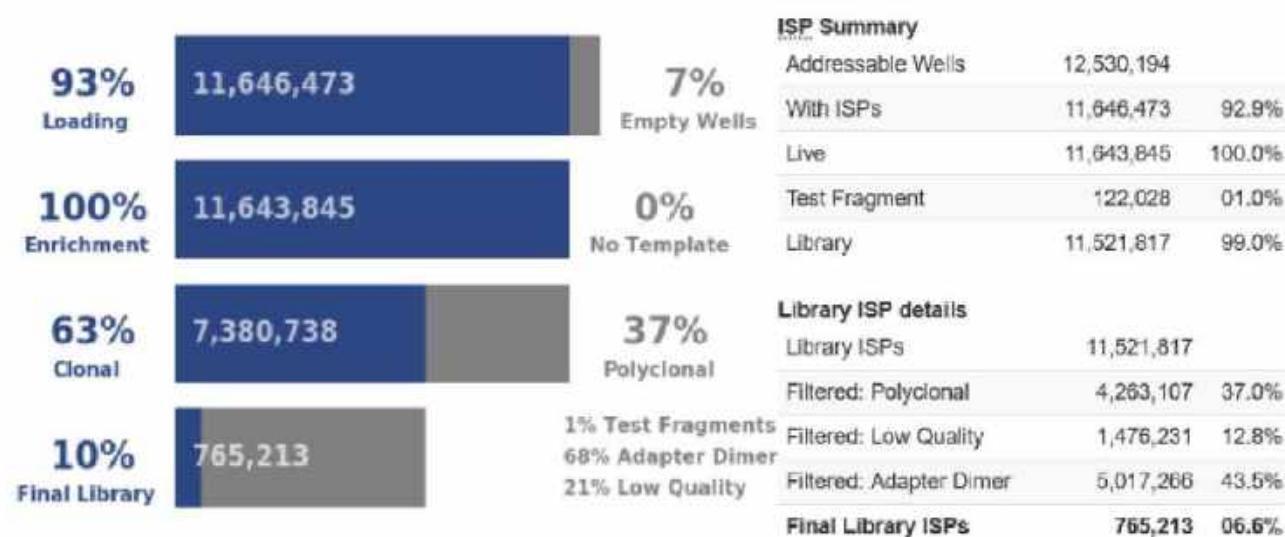


Рис. 40. Статистика завантажених фрагментів до чіпу №1: відсотки на діаграмі зліва (синім кольором) розраховуються відносно значення у попередньому верхньому рядку. Перший рядок – відсоток завантажених / пустих комірок відносно до загальної кількості комірок на чіпі.

На другому чіпі відсоток поліклональних ISP дещо менший, ніж на першому – 31%. Моноклональних (clonal) ISP – 69% (7538265 прочитань), з них фільтрації підлягають 6%: з тестовими послідовностями виробника – 1%,

ISP низької якості – 5% (рис. 41). До фінальної бібліотеки віднесено 94% ISP. Таким чином на другий чіп було завантажено майже в 10 разів більше ISP із придатними для подальшого вирівнювання на референсний геном послідовностями.

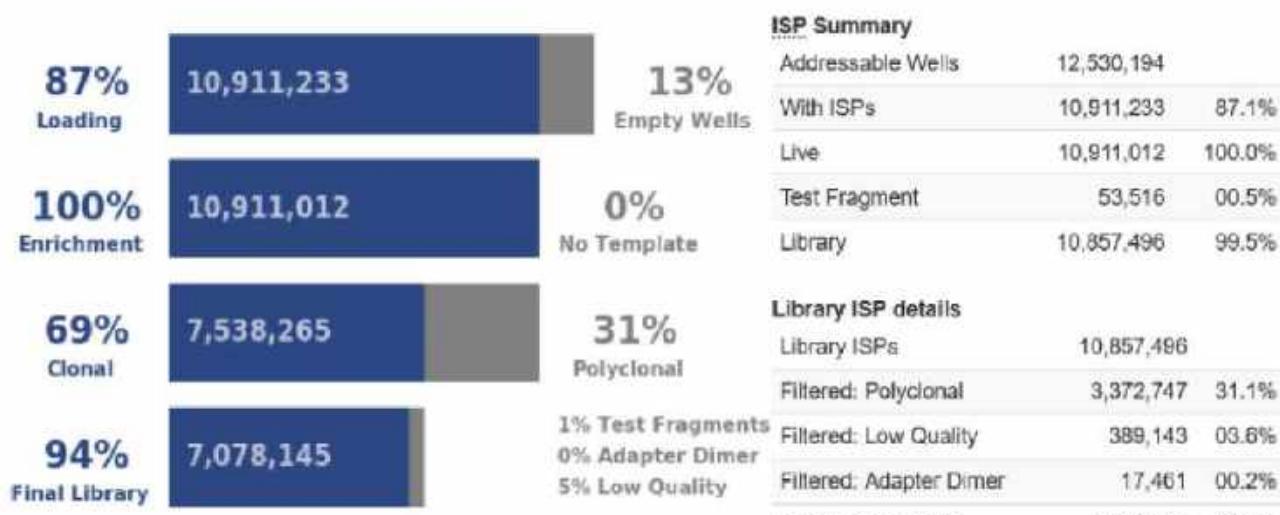


Рис. 41. Статистика завантажених фрагментів до чіпу №2: відсотки на діаграмі зліва (синім кольором) розраховуються відносно значення у попередньому верхньому рядку. Перший рядок – відсоток завантажених / пустих комірок відносно до загальної кількості комірок на чіпі.

На першому чіпі середня довжина придатних до аналізу прочитань склала 155 нуклеотидів. Половина з них довша 171 нуклеотидів. Гістограма відображає розподіл за довжиною зчитаних фрагментів бібліотеки після фільтрації даних та обрізки адаптерів. На гістограмі видно значну кількість коротких прочитань, в той час як діапазон довжин ампліконів, на які націлені застосовані нами пули праймерів становить 125–275 нуклеотидів (рис. 42).

Показники довжини фрагментів на другому чіпі краші ніж на першому. Середня довжина прочитань бібліотеки становить 183 нуклеотидів. Медіана – 202 нуклеотидів. Доля коротких прочитань менша за таку на першому чіпі, що видно на гістограмі (рис. 42).

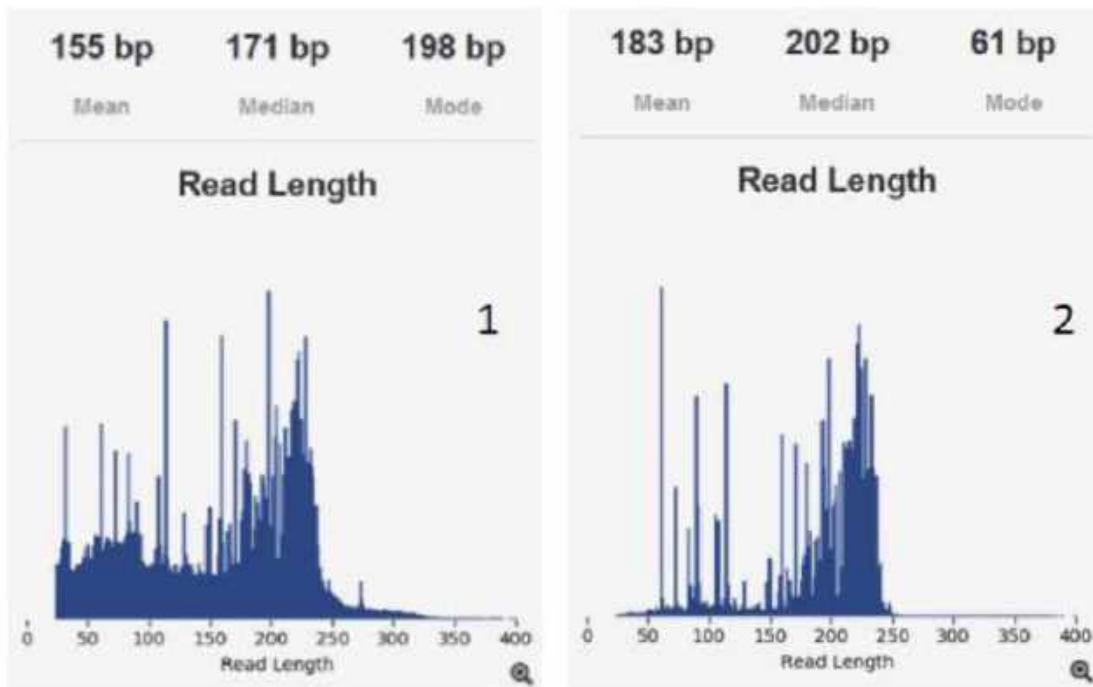


Рис. 42. Показники довжини прочитань і їх розподіл на гістограмі:
Mean – середнє арифметичне довжин; **Median** – значення довжини, що ділить розподіл на дві рівні половини; **Mode** – найвищий пік на гістограмі. Зліва чіп №1, зправа – №2.

Після аналізу якості завантажених на чіп ISP програмне забезпечення вирівняних основ для первого чіпа становить 78,6 мегабаз або 72%. Це значно нижче ніж на другому чіпі: 1,26 гігабаз і 99% відповідно. Таким чином, з другого чіпа отримано в 16 разів більше прочитань нуклеотидів, які вирівнюються на цільовий геном.

Відсоток покриття референсного геному і середня глибина прочитання для зразків з другого чіпу очікувано вищі за такі у зразків з чіпу №1 високою середньою глибиною покриття має значну її нерівномірність із багатьма невпевнено прочитаними нуклеотидами (у вихідному файлі позначаються символом N).

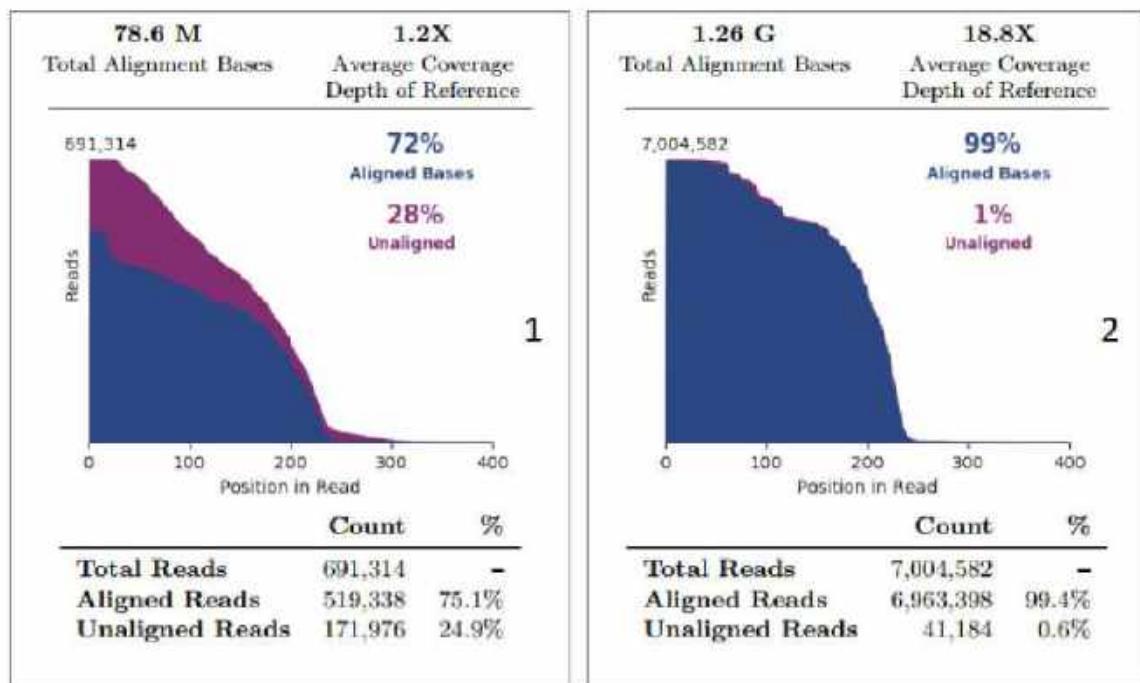


Рис. 43. Кількість вирівняніх читань (висота синьої області) і невирівняніх (висота фіолетової області) для кожної позиції у вирівняній послідовності. Зліва чіп №1, зправа – №2.

У зібраних і вирівняних на референсний геном послідовностях всіх зразків спостерігаються ділянки невпевненого прочитання, глибина покриття в яких становить меншу за 20Х. Такі ділянки спостерігаються в тому числі в гені спайкового протеїну (S-ген), який відповідає за приєднання до рецепторів клітини-мішенні і мутації в якому викликають особливий інтерес (табл. 22, 23, рис. 44–51).

Таблиця 22

Статистика покриття секвенованих зразків на референсний геном.

Таблиця 23

**Характеристики повногеномного сіквенсу після збірки і вирівнювання
на референсний геном**

Номер зразка	Старт-кінець вирівнювання	Замін нуклеотидів	Делецій нуклеотидів	Інсерцій нуклеотидів	Аміпокислотних замін	Аміпокислотних делецій	Невизначеніх нуклеотидів (N символ)	Делеції	Ділянки з N символами
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	43-29842	44	19	0	25	6	1689	1 1 2 8 8 - 1 1 2 9 6 - 2 1 1 7 6 5 - 2 1 7 7 0 -	1679-1708, 2162-2201, 2424-2463, 3184-3232, 3705-3750, 3975-4011, 4241-4278, 5282-5325, 5546-5587, 5811-5857, 6074-6124, 6339-6380, 6830-6883, 7100-7148, 7361-7425, 7642-7687, 8159-8203, 8690-8733, 9391-9432, 9645-9684, 10680-10719, 10948- 10993, 11486-11509, 13322-13362, 13441- 13484, 13706-13751, 14473-14515, 14732- 14777, 15006-15049, 16471-16508, 20073- 20109, 20882-20912, 21536-21597, 21803- 21842, 23725-23767, 24949-24984, 25216- 25248, 26352-26389, 26606-26639, 27353- 27384
3	43-29842	43	13	0	33	4	520	2 2 0 2 9	6830-6882, 7284-7332, 14473-14515, 14729- 14777, 21814-22025, 23055-23084, 24684- 24724, 25888-25930
7	43-29842	44	13	0	36	4	266	2 2 0 2	6830-6882, 7018-7062, 7284-7332, 11111-11137, 23055-23084, 26557- 26588, 27711-27740
13	43-29842	43	13	0	35	4	30	2	23055-23084
14	43-29842	46	16	0	40	5	362	6 5 0	6830-6883, 7100-7332, 21804-21842, 23049- 23084

Продовження табл. 23

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
516	43-29842	40	7	0	33	2	2929	2 8 2 4 8	211-316, 1061-1127, 1679-1708, 3198-3229, 3295-3342, 3456-3478, 3825-3891, 4111-4162, 4391-4435, 4647-4684,

								4876-4920, 5393-5449, 5933-6027, 6513-6552, 6830-7062, 7284-7332, 7552-7599, 7770-7812, 8490-8551, 8887-8899, 9134-9141, 9391-9432, 9644-9684, 9781-9857, 11108-11153, 11486- 11523, 11634-11685, 14320-14376, 14475- 14515, 15846-15891, 17713-17753, 17976- 18025, 19020-19035, 19283-19303, 20232- 20295, 20457-20498, 20684-20763, 21366- 21451, 21803-22034, 22193-22227, 22686- 22791, 23049-23084, 23738-23765, 23896- 24008, 24425-24465, 25070-25122, 25798- 25844, 26352-26467, 27200-27232, 27702- 27749
592	43- 29842	40	12	0	31	4	22029- 22034, 28248- 28253	6830-6883,9132- 9179,14473- 14515,17713- 17753,21803- 22025,22320- 22368,23049- 23089,24425- 24465,27455-27496
593	43- 29842	42	12	0	33	4	22029- 22034, 28248- 28253	1679-1721,2162- 2206,4240-4278,6830- 6883,7284-7332,9132- 9179,9644-9687,11108- 11151,11478- 11523,14473- 14515,14729- 14777,17713- 17753,21803- 22025,22320- 22368,23049- 23089,24425- 24465,27454- 27499,27702- 27749,29467-29498

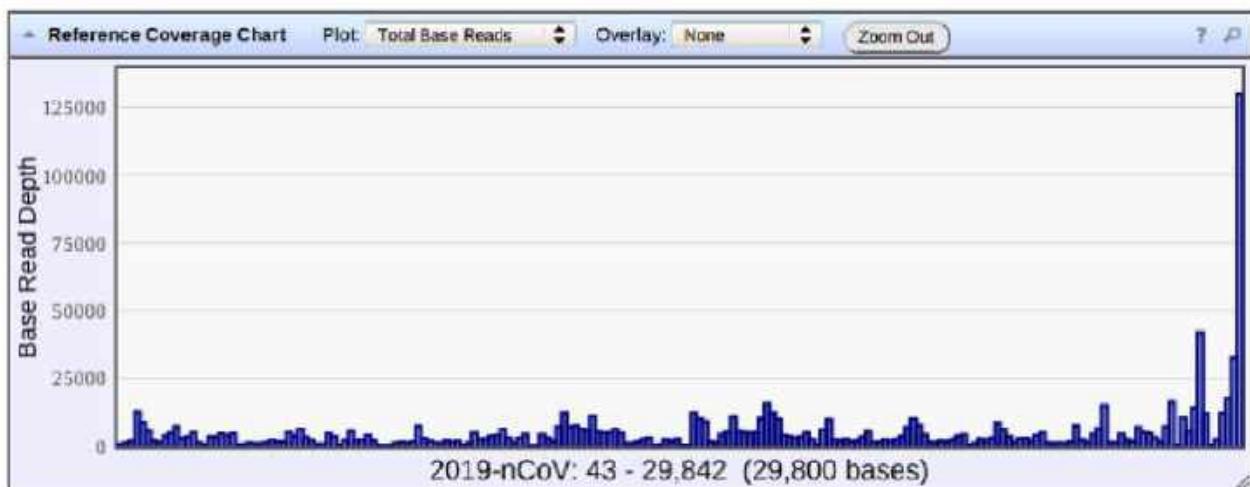


Рис. 44. Глибина покриття прочитаних основ зразка 2 на референсний геном.

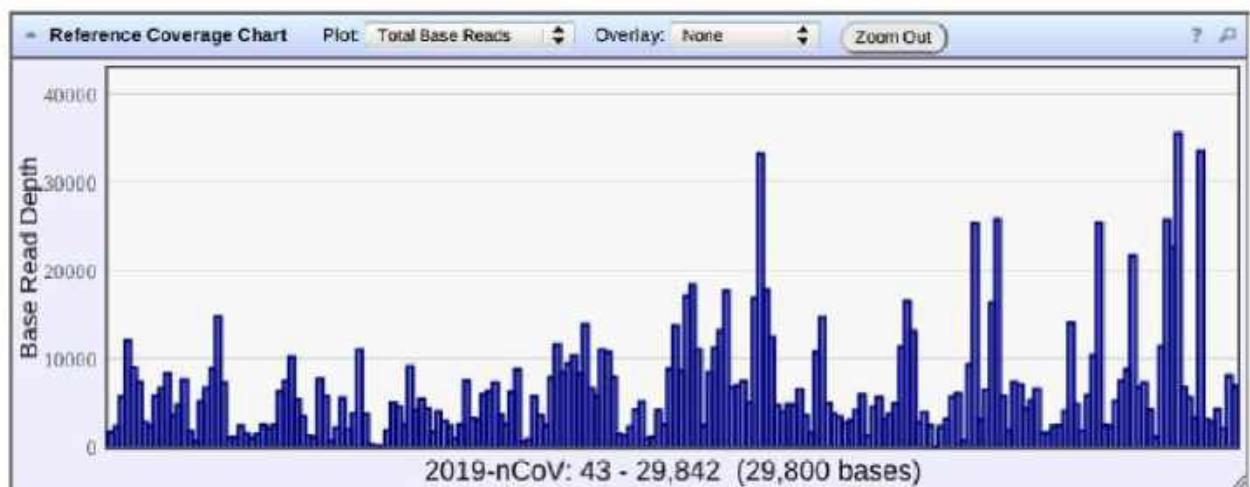


Рис. 45. Глибина покриття прочитаних основ зразка 3 на референсний геном.

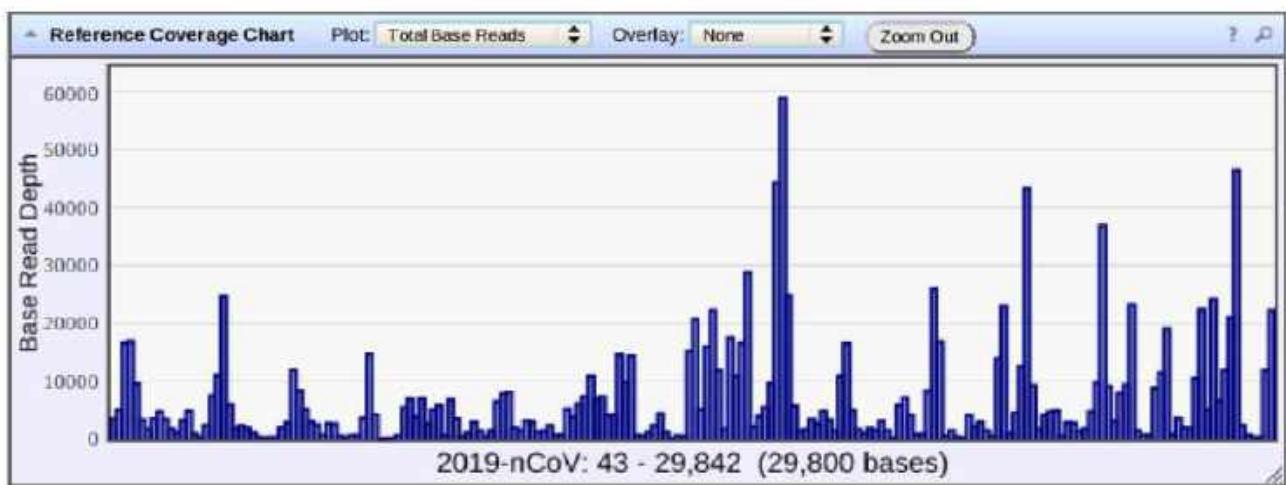


Рис. 46. Глибина покриття прочитаних основ зразка 7 на референсний геном.

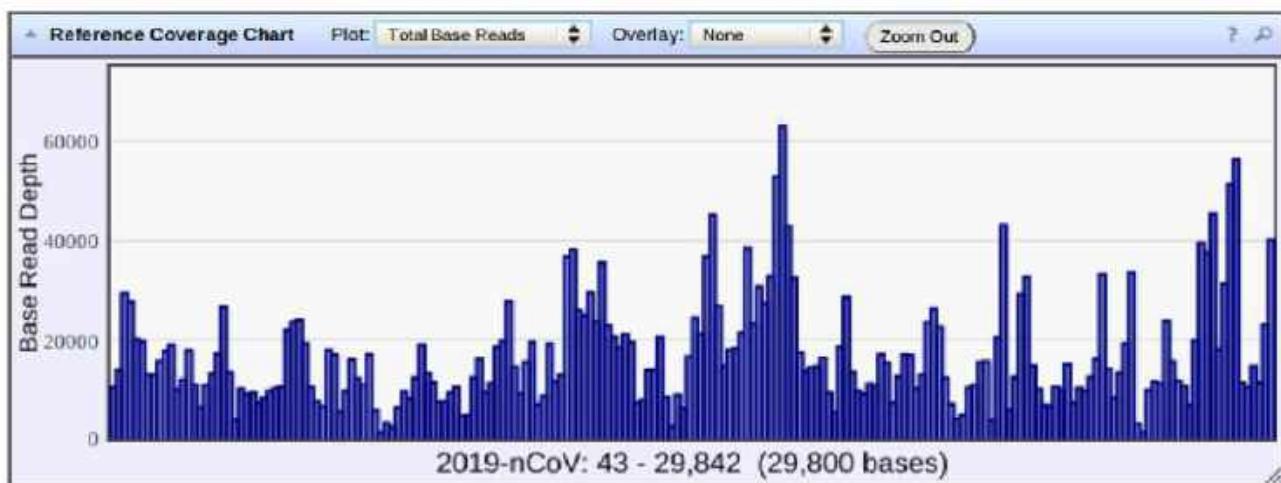


Рис. 47. Глибина покриття прочитаних основ зразка 13 на референсний геном.

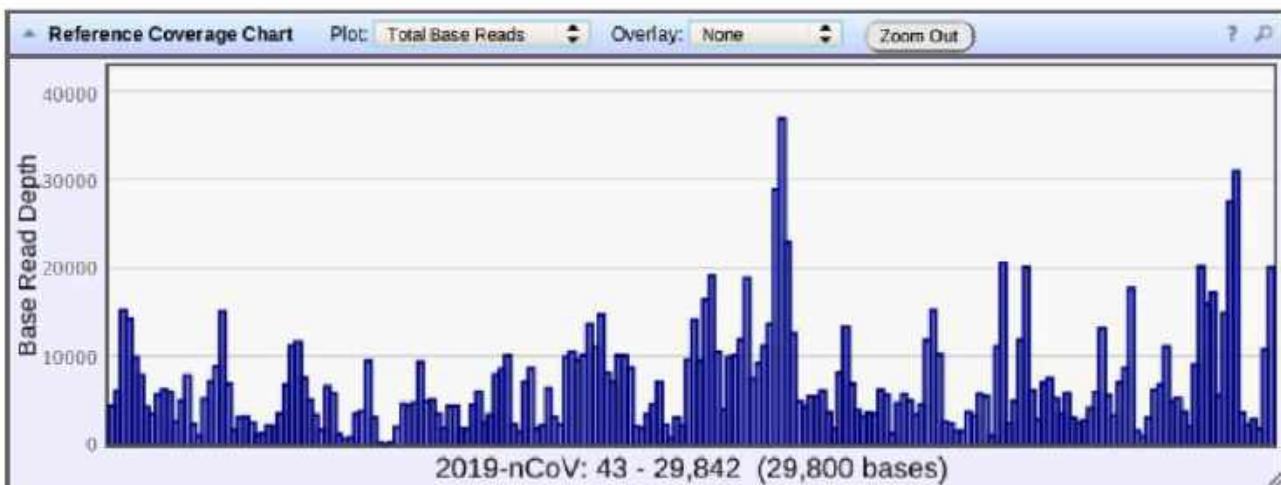


Рис. 48. Глибина покриття прочитаних основ зразка 14 на референсний геном.

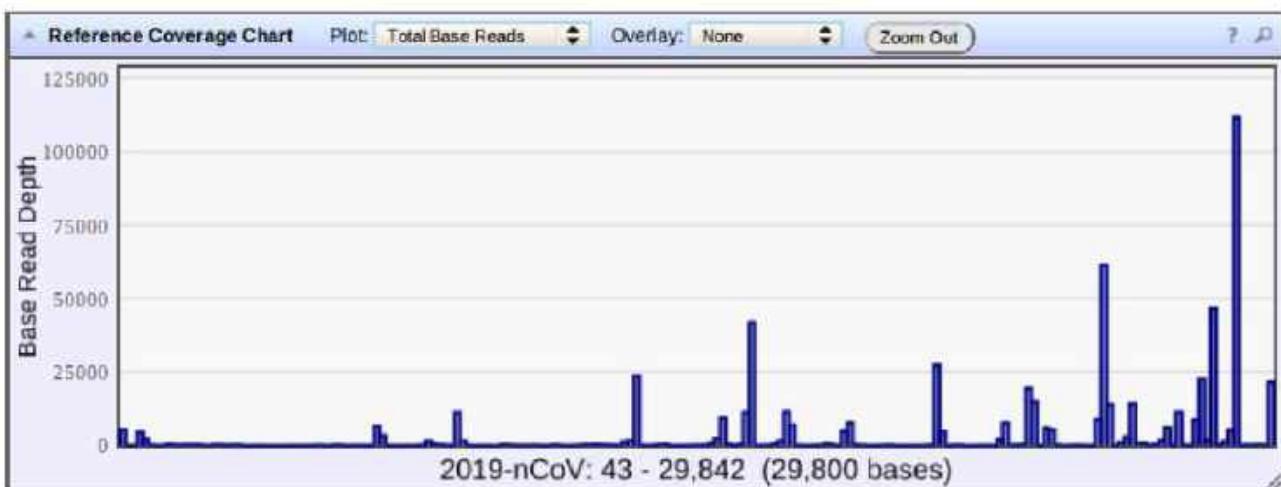


Рис. 49. Глибина покриття прочитаних основ зразка 516 на референсний геном.

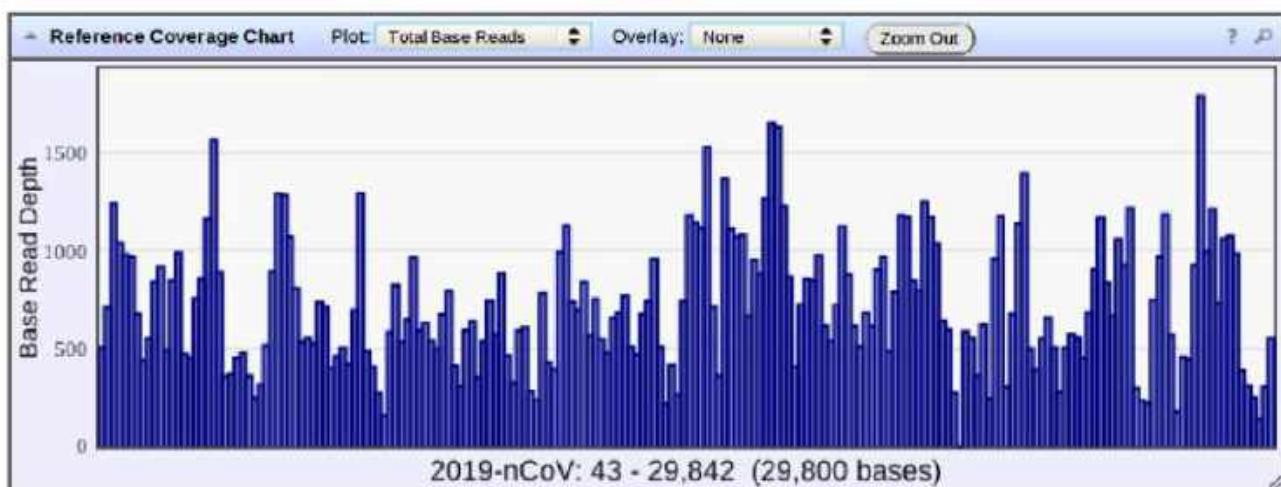


Рис. 50. Глибина покриття прочитаних основ зразка 592 на референсний геном.

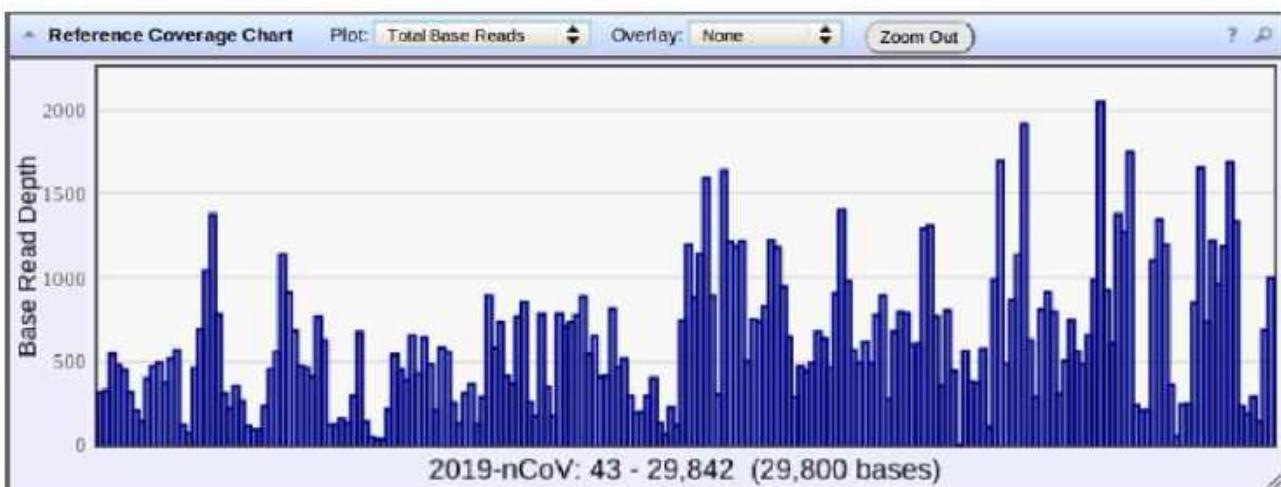


Рис. 51. Глибина покриття прочитаних основ зразка 593 на референсний геном.

На сьогодні уніфікована номенклатура варіантів вірусу SARS-CoV-2 не створена, тому наукове співтовариство користується декількома основними системами класифікації: GISAID, Nextstrain, PANGO. В PANGO на відміну від інших застосовується динамічна номенклатура, яка зосереджена на активно циркулюючих лініях вірусу і таких, що поширяються на нові території. Всесвітня організація охорони здоров'я в свою чергу для спрощення комунікації поза науковою аудиторією розробила систему позначення варіантів вірусу літерами грецького алфавіту.

Сім з восьми секвенованих нами ізолятів (зразки №№ 3, 7, 13, 14, 516, 592, 593) за позначенням ВООЗ відносяться до варіанту Delta (табл. 24). За

класифікацією Nextstrain вони відносяться до варіанту 21J (Delta), який являється субкладою варіанту 21A (Delta). 21J широко розповсюдився по всьому світі, особливо в Європі, Північній і Південній Америках, Африці та Океанії. Крім всіх мутацій варіанту 21A він додатково має мутацію в гені N – заміна амінокислоти в позиції G215C; в гені ORF1a – амінокислотні заміни заміна T40I. Також він має дві синонімічні мутації (кодується та сама амінокислота) в позиціях нуклеотидів C8986T і A11332G.

За номенклатурою PANGO наші сім ізолятів Delta поділяються на п'ять субліній: два AY.33 (B.1.617.2.33), один AY.36 (B.1.617.2.36), один AY.122 глобальної бази даних секвенованих ізолятів GISAID вірус лінії AY.33 найбільше виявляють в Бельгії, Данії, Франції, Нідерландах і Германії; AY.36 – в Нігерії, Великій Британії і США; AY.122 – в країнах Європи; B.1.617.2 – переважно індійська лінія; AY.4.2 – переважно лінія з Великої Британії.

Виявлені мутації всіх досліджених ізолятів наглядно показано на графічних схемах геному вірусу на рисунках 52–59.

Один із восьми ізолятів (зразок № 2) відноситься до варіанту Alpha, відомого з 14 Грудня 2020 появою у Великій Британії. За класифікацією Nextstrain він позначається 20I (Alpha, V1). В номенклатурі PANGO ізолят відноситься до лінії B.1.1.7. Найбільше поширений в Великій Британії, США, Германії, Швеції, Данії. Варіант характеризується множинними мутаціями в S гені (табл. 24).

Найхарактернішими мутаціями є заміна S:N501Y і делеція S:H69-. Також характерні S:Y144-, S:P681H. Часта мутація укорочення гену ORF8, в якій амінокислота замінена на стоп-кодон: ORF8:Q27*; мутації нуклеокапсиду всі перелічені мутації за винятком S:N501Y (табл. 24).

Із секвенованих нами зразків найдалі від референсної послідовності на філогенетичному дереві знаходиться № 14, який має найбільшу кількість мутацій (рис. 60). Найбільш спорідненими між собою являються дві пари

наших зразків, які відносяться до тих самих ліній. Це зразки 7 і 13 – лінія AY.33. Інші зразки мають менше споріднення між собою. Інструментом USheR ми побудували філогенетичні дерева для кожного зразка із вибіркою найближчих до них послідовностей із бази даних GISAID. Найближчий філогенетичний

с
у
с

Таблиця 24

і **Амінокислотні мутації отриманих сіквенсів**

Номер зразка	N _a	Амінокислотні мутації по генах									
		ORF1a	ORF1b	S	ORF3A	M	ORF7a	ORF7b	ORF8	ORF9b	N
									9		
2	20I (Alpha, VI) / B.I.1.7	T708I, A859V, T1001L, A1708D, I2230T, K2497N, S3675-, G3676-, F3677-	P314L, H1550Y	A570D, D614G, P681H, T716I, S982A, D1118H, T1231A, H69-, V70-, Y144-	Y184H				Q27*, R52I, K68*, Y73C	T83I	D3L, R203K, G204P, S235F
3	21J (Delta) / AY.36 (B.1.617.2.3.6)	A1306S, P2046L, P2287S, V2930L, T3255I, T3646A	P314L, G662S, C721R, P1000L, V1538L, A1918V	T19R, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, D1084Y, V1104L, L84-, P85-	S26L, T223I	I82T	V82A, T120I	T40I	D119-, F120-	T60A	D63G, P199S, R203M, G215C, D377Y
7	21J (Delta) / AY.33 (B.1.617.2.3.3)	G49C, T346I, K851R, A1306S, P2046L, P2287S, V2930L, T3255I, T3646A, Q3777R	P314L, G662S, P1000L, A1918V	T19R, T29A, G142D, R158G, T250I, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, E156-, F157-	S26L, V97L	L29F, I82T	V82A, T120I	T40I, T60A	D119-, F120-		D63G, R203M, G215C, D377Y

P
E
R
L

Продовження табл. 24

								9			
13	21J (Delta) / AY.33 (B.1.617.2.33)	G49C, T346I, A1306S, P2046L, P2287S, V2930L, T3255I, T3646A, Q3777R	P314L, G662S, P1000L, A1918V	T19R, T29A, G142D, R158G, T250I, L452R, T478K, D614G, P681R,	S26L, V97L	L29F, I82T	V82A, T120I	T40I	D119-, F120-	T60A	D63G, R203M, G215C, D377Y

t
t
p

				D950N, E156-, F157-							
14	2IJ (Delta) / AY.122 (B.1.617.2.122)	K261N, S1218N, A1306S, S2030L, P2046L, M2259I, V2930L, T3255I, P3447I, T3646A, R4387S, N2081-	P314L, G662S, P1000L, E1242D, A1918V	T19R, G142D, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, E156-, F157-	S26L, T190I	I82T	P45L, V82A, T120I	T40I	D119- , F120-	T60A, L64F	D63G, P67L, A90V, L139F, R203M, G215C, D377Y
516	2IJ (Delta) / B.1.617.2	A206V, V561F, A1306S, S1510F, P2046L, P2287S, V2930L, T3255I, T3646A	M592L, G662S, P1000L, A1918V, K2557R	T19R, L452R, T478K, D614G, P681R, S689L, D950N	S26L, G100C, G172V	I82T	V82A, T120I	T40I	D119- , F120-	T60A	D63G, R203M, G215C, D377Y
592	2IJ (Delta) / AY.4.2 (B.1.617.2.4.2)	A1306S, P2046L, P2287S, A2529V, V2930L, T3255I, T3646A	P314L, G662S, P1000L, A1918V, V1961F	T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, E156-, F157-	S26L	A2S, I82T	V82A, T120I	T40I	D119- , F120-	T60A	D63G, R203M, G215C, D377Y
593	2IJ (Delta) / AY.4.2 (B.1.617.2.4.2)	E1238D, A1306S, P2046L, P2287S, A2529V, V2930L, T3255I, T3646A	P314L, G662S, P1000L, A1918V, V1961F	T19R, R158G, A222V, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N, E156-, F157-	S26L	A2S, I82T	H19Q, V82A, T120I	T40I	D119- , F120-	T60A	D63G, R203M, G215C, D377Y

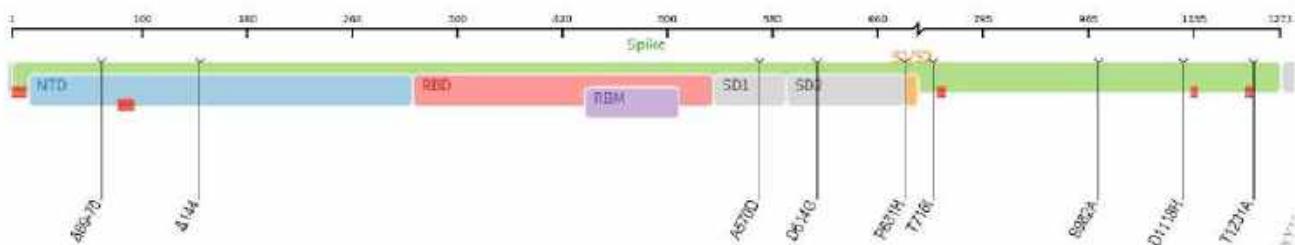


Рис. 52. Мутації в S-гені зразка 2. Червоним штрихуванням позначено не секвеновані ділянки: 1-12, 81-94, 721-735, 1130-1141, 1219-1229.

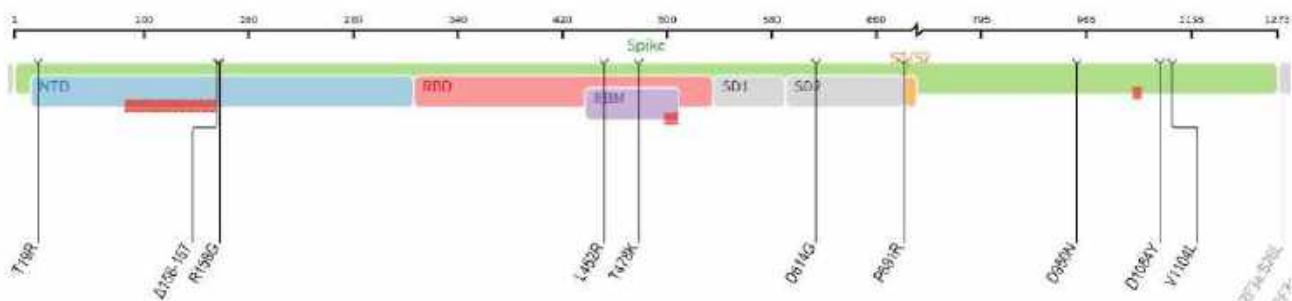


Рис. 53. Мутації в S-гені зразка 3. Червоним штрихуванням позначено несеквеновані ділянки: 85-155, 498-508, 1041-1054.

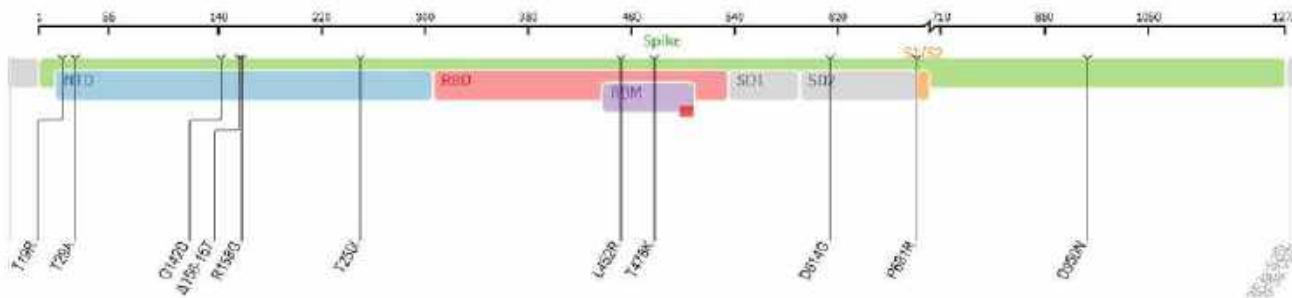


Рис. 54. Мутації в S-гені зразка 7. Червоним штрихуванням позначено несеквеновану ділянку: 498-508.

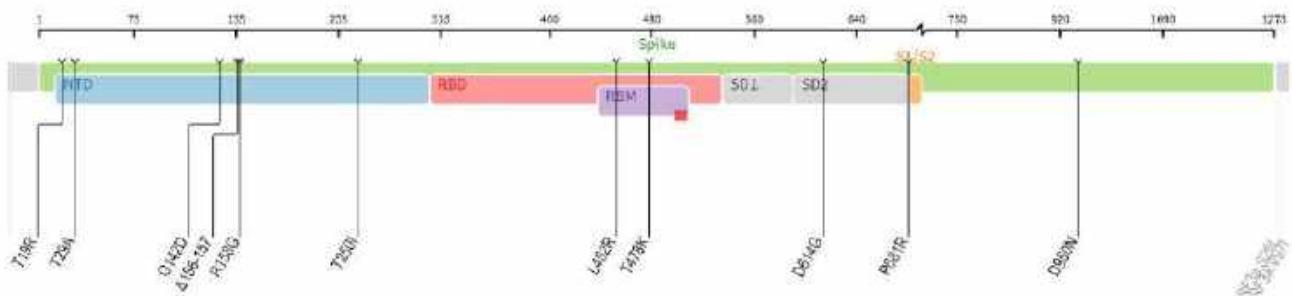


Рис. 55. Мутації в S-гені зразка 13. Червоним штрихуванням позначено несеквеновану ділянку: 498-508.

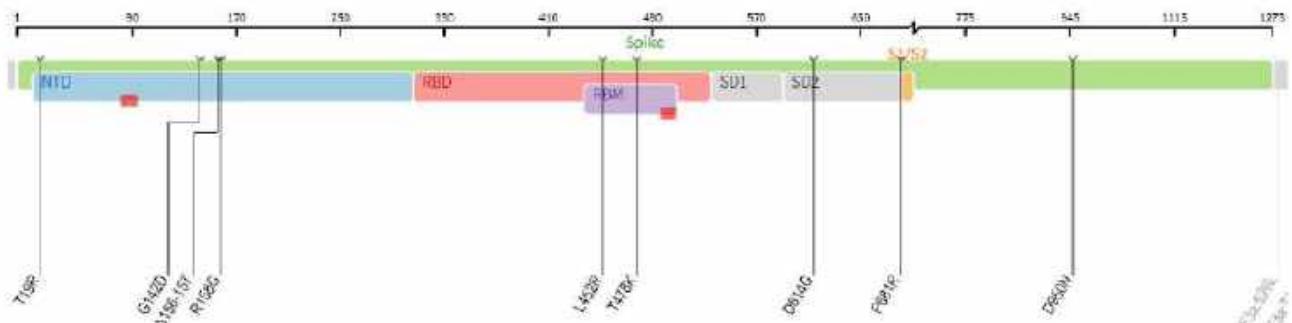


Рис. 56. Мутації в S-гені зразка 14. Червоним штрихуванням позначено несеквеновані ділянки: 81-94, 496-508.

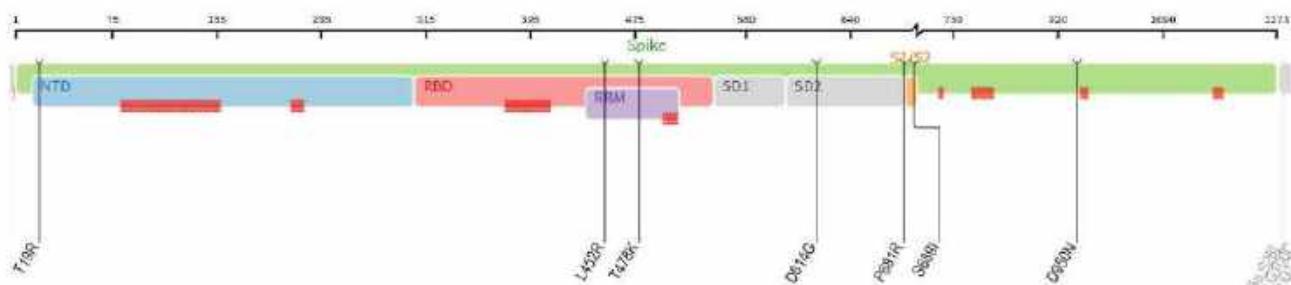


Рис. 57. Мутації в S-гені зразка 516. Червоним штрихуванням позначено несеквеновані ділянки: 81-158, 211-222, 375-410, 496-508, 726-735, 779-816,

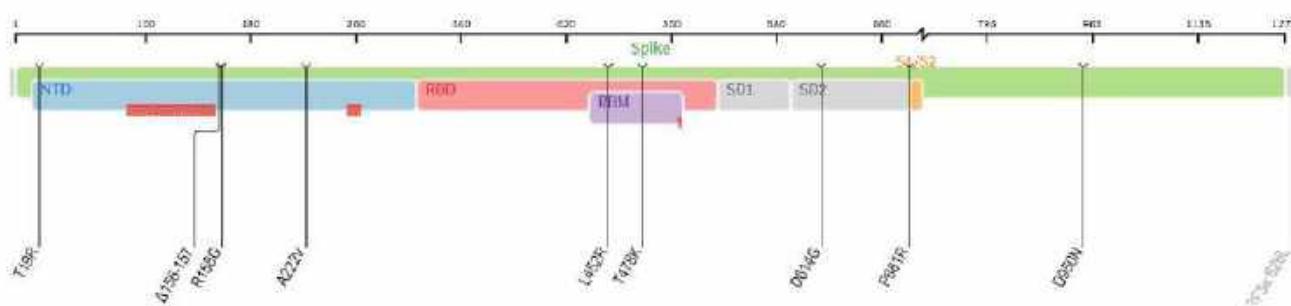


Рис. 58. Мутації в S-гені зразка 592. Червоним штрихуванням позначено несеквеновані ділянки: 85-153, 253-264, 505-508.

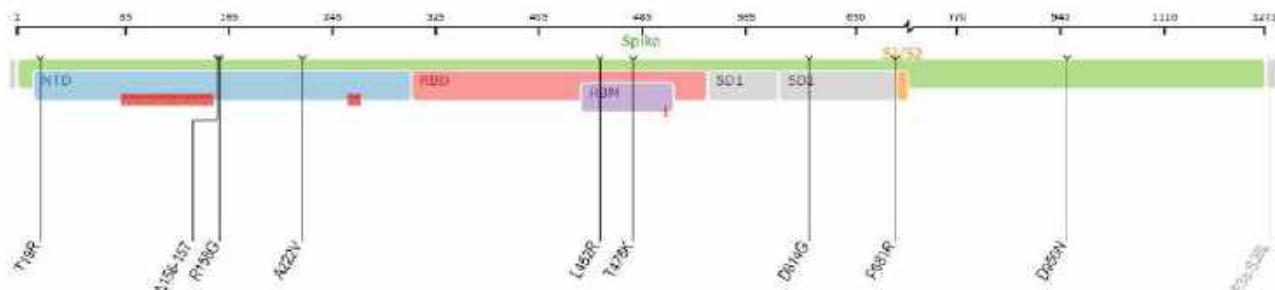


Рис. 59. Мутації в S-гені зразка 593. Червоним штрихуванням позначено несеквеновані ділянки: 81-153, 257-267, 501-504.

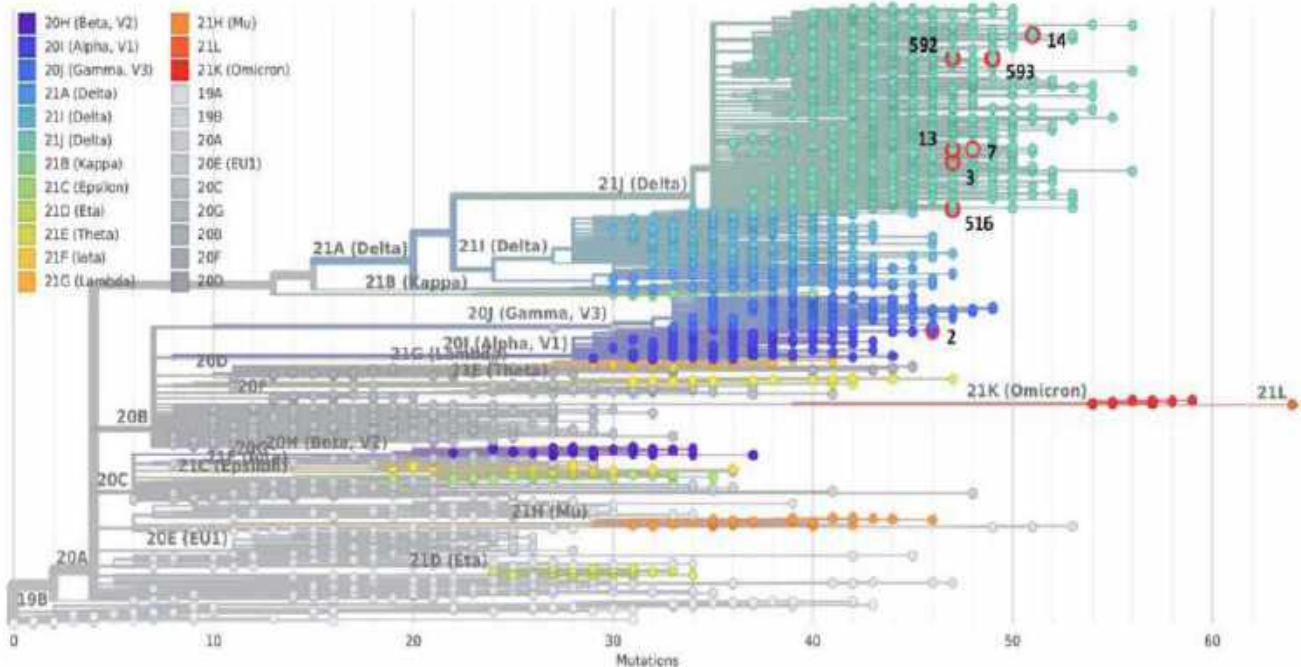


Рис. 60. Філогенетичне дерево глобальної вибірки 2273 геномів вірусу інструментом Nextclade 1.10.0. Відсеквеновані нами зразки помічені червоним колом і номером. На шкалі позначено кількість мутацій.

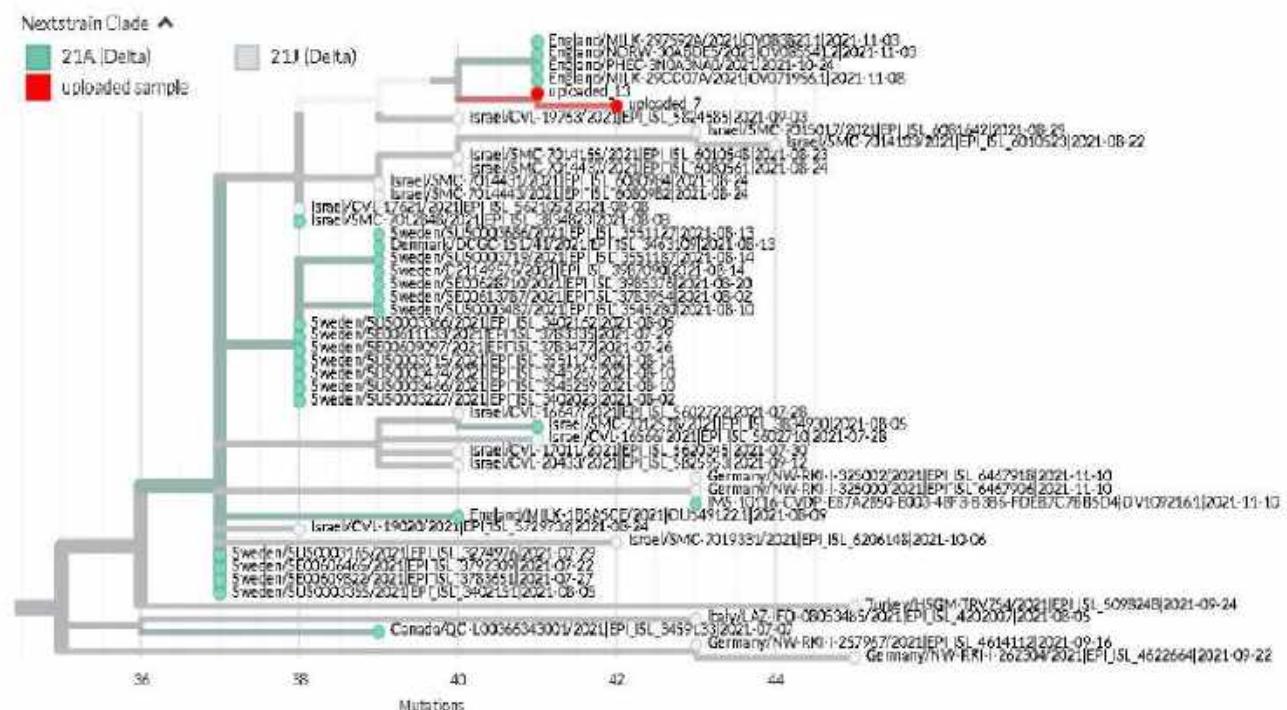


Рис. 61. Найбільш споріднені послідовності до зразків 7 і 13 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з бази даних GISAID. Найближчий сусід на дереві – зразок Israel/CVL-

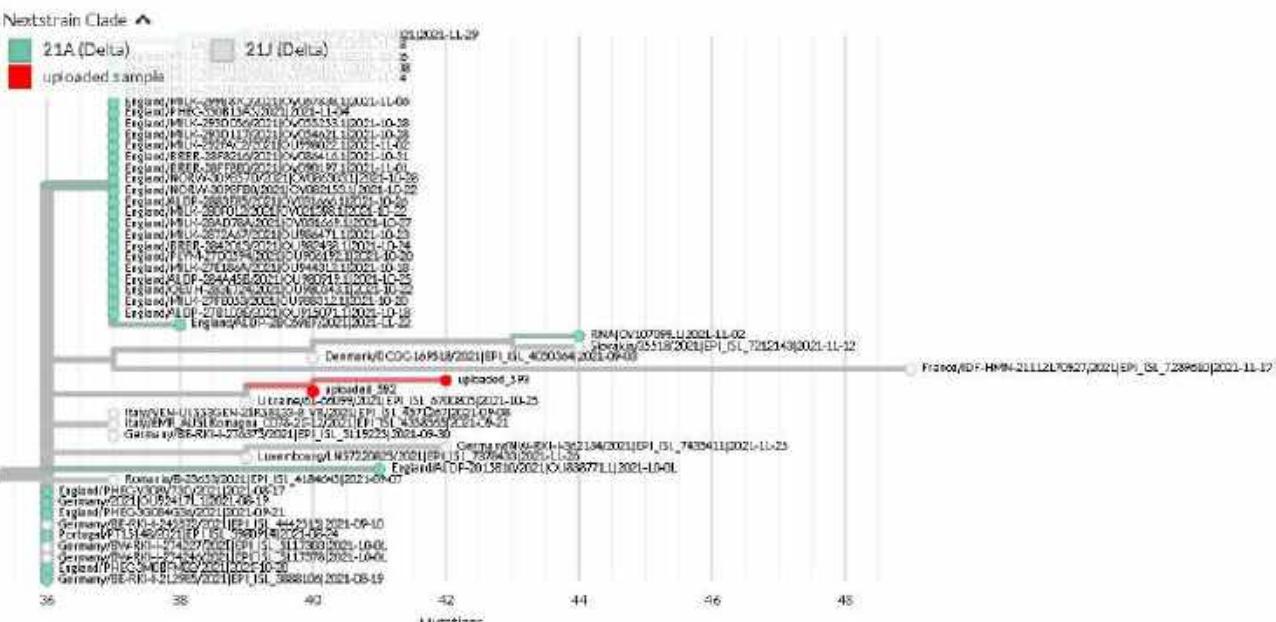


Рис. 62. Найбільш споріднені послідовності до зразків 592 і 593 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з

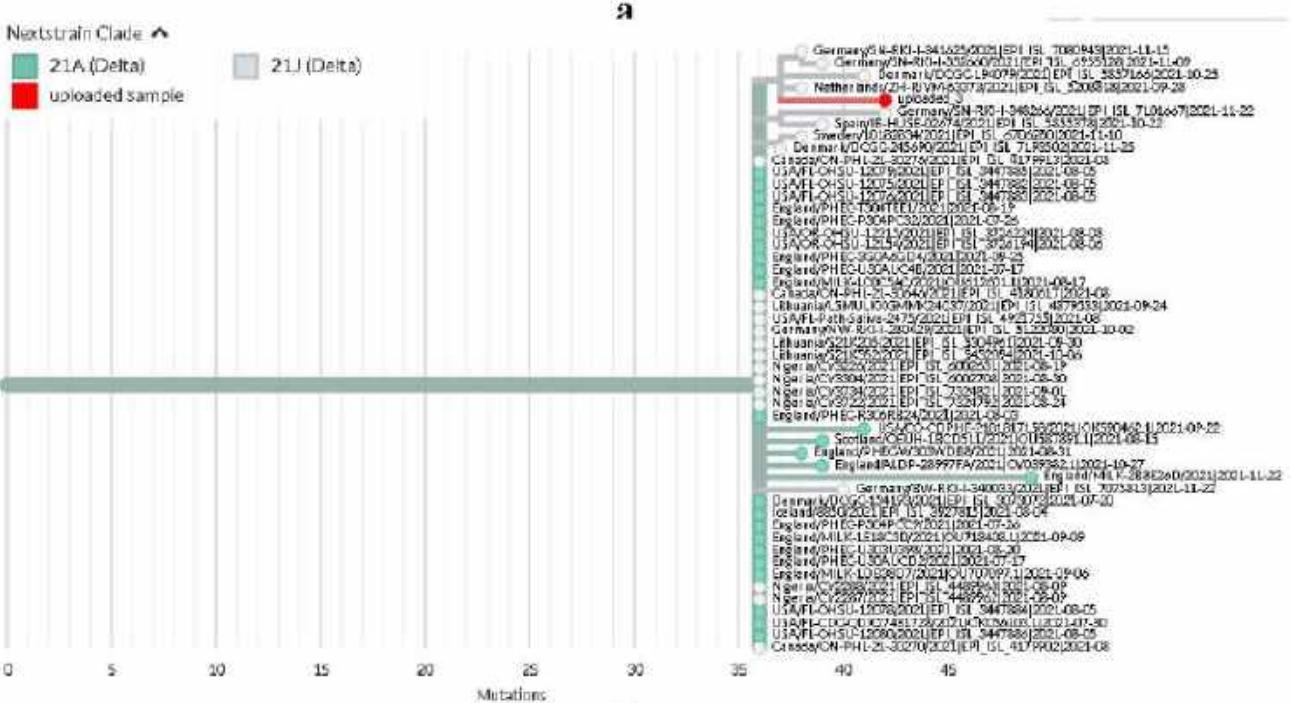


Рис. 63. Найбільш споріднені послідовності до зразка 3 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з бази даних GISAID. Найближчий сусід на дереві – зразок Netherlands/ZH-

а
й
б
л
и
ж
ч
и

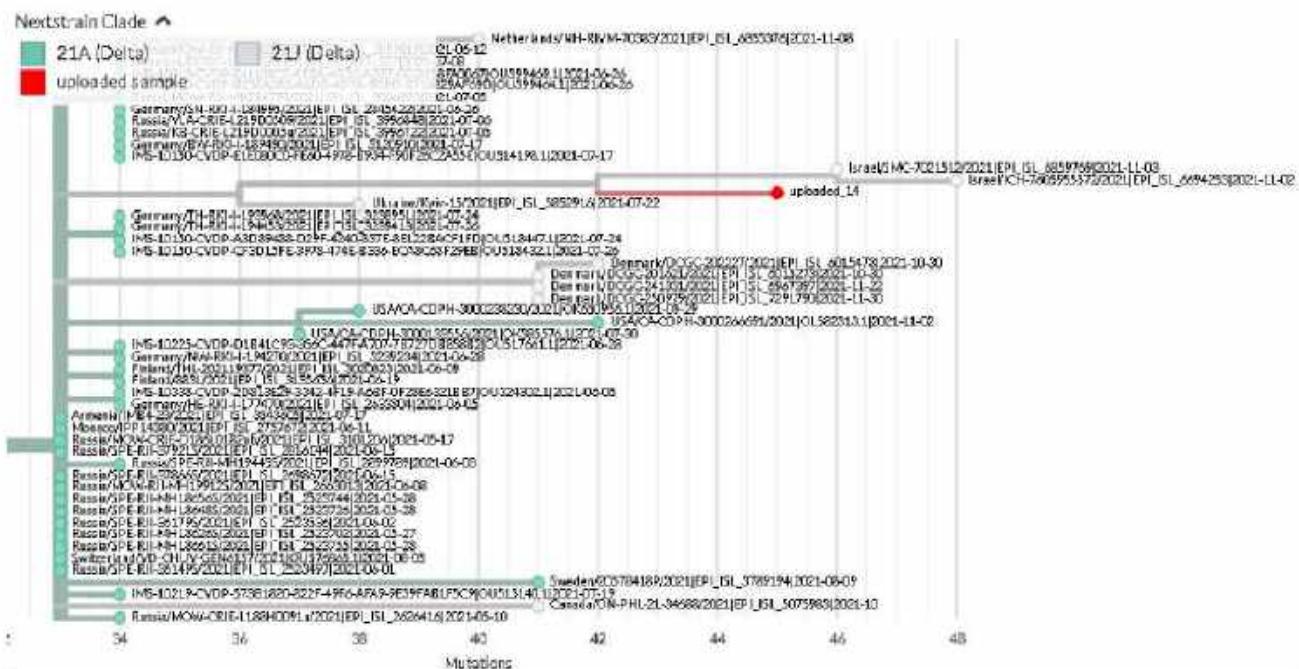


Рис. 64. Найбільш споріднені послідовності до зразка 14 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з бази даних GISAID. Найближчий сусід на дереві – зразок Ukraine/Kyiv-

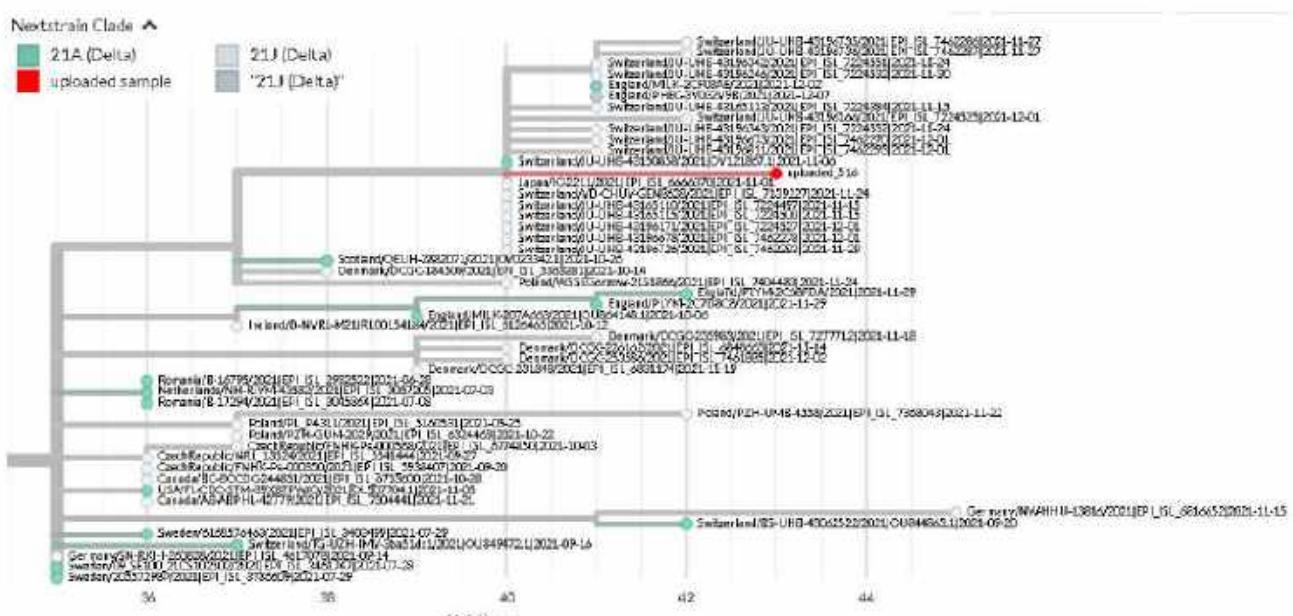


Рис. 65. Найбільш споріднені послідовності до зразка 516 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з бази даних GISAID. Найближчий сусід на дереві – зразок Switzerland/JU-

二〇四〇年

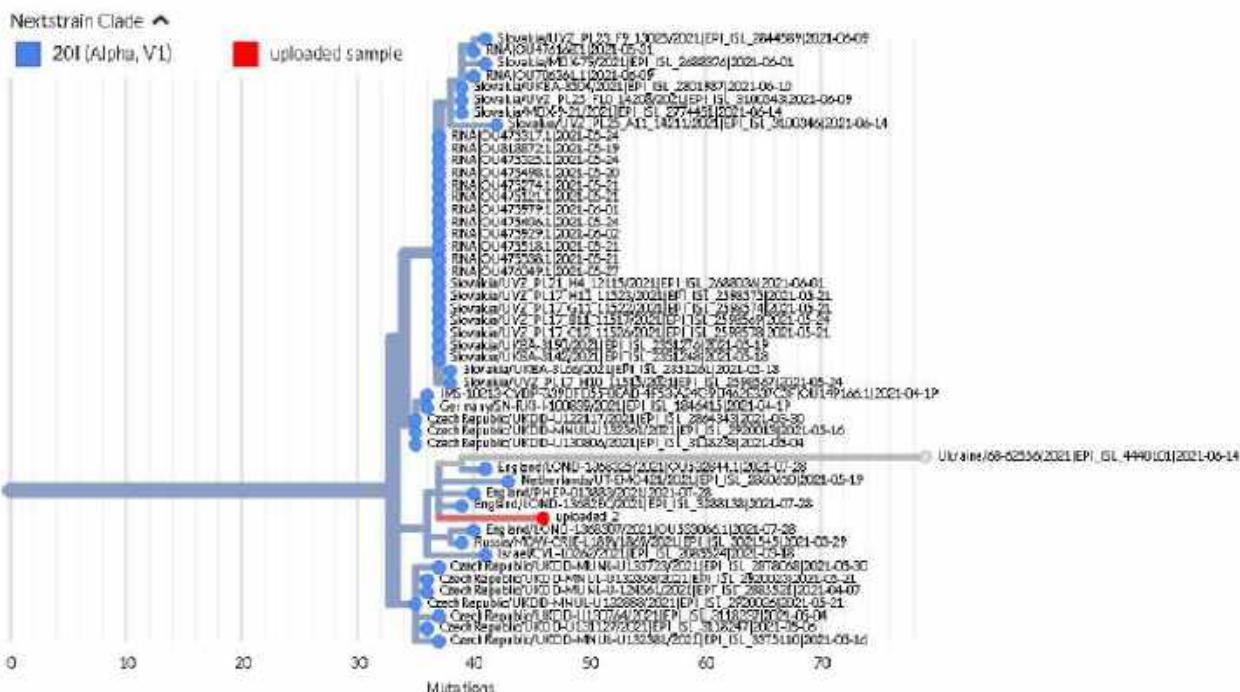


Рис. 66. Найбільш споріднені послідовності до зразка 2 на філогенетичному дереві, побудованому інструментом UShER на вибірці з

б

а

Таким чином, серед досліджених ізолятів науковці ІВМ НААН виявили п'ять субліній варіанту Delta: два AY.33 (B.1.617.2.33), один AY.36 (B.1.617.2.36), один AY.122 (B.1.617.2.122), один B.1.617.2 та два AY.4.2 (B.1.617.2.4.2). Один із восьми наших ізолятів відноситься до варіанту Alpha, який відноситься до лінії B.1.1.7.

Варіант Delta характеризується множинними мутаціями в S гені. Важливо підкреслити, що і сам індійський «материнський» штам, і його мутовані варіанти мають дуже високий рівень контагіозності порівняно з уханським штамом SARS-CoV-2, що вперше виявлений у грудні 2019 року в Китаї, та британським варіантом Альфа, який спричинив попередню хвилю захворювання в світі, включаючи Україну.

Вчені ІВМ НААН продовжують більш глибокий структурно-функціональний аналіз отриманих результатів для виявлення особливостей просеквенованих ізолятів SARS-CoV-2 з метою наступної публікації результатів досліджень.

б

л

и

ч

2.6 Розробка протоколу відбору проб від домашніх тварин для виявлення специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2.

Розроблення протоколу відбору проб від домашніх тварин для виявлення специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2.

З метою забезпечення біобезпеки за проведення відбору проб, транспортування, зберігання та зберігання, а також з метою забезпечення стабільності зразків при зберіганні протягом звітного періоду виконавцями проекту було проведено розроблення протоколу відбору проб від домашніх тварин для виявлення специфічних фрагментів геному коронавірусу SARS-CoV-2.

Протокол був створений із урахуванням діючих вимог та правил щодо методу випробувань ПЛР, валідації методів, відбору зразків, транспортуванню та інших операцій, пов'язаних із переміщенням та зберіганням потенційно небезпечних біологічних зразків. При створенні протоколу ураховані вимоги до однозначної ідентифікації та маркування відібраних зразків.

Розробка протоколу відбору зразків проведена із урахуванням літературних та інших джерел щодо поточного стану епідемічного процесу з урахуванням фонових характеристик на території всіх запланованих об'єктів моніторингу, аналізу існуючих методик польового обстеження, відбору та аналізу проб тощо.

Процесом відбору зразків охоплюються всі фактори, які можуть впливати на достовірність результатів випробувань.

Запропонований підхід є швидким (експресним) і економічно ефективним [59–61].

Експрес-метод забезпечує відбір проб біологічного матеріалу за відносно короткий проміжок часу. Метод займає не більше двох-трьох осіб, на період від 20 до 40 хвилин на кожен об'єкт відбору проб, проходження до 10 об'єктів відбору проб за робочий день (в залежності від відстаней, які потрібно покрити), і вимагає не більше 10 хвилин офісної підготовки актів відбору зразків та пакування проб у транспортні контейнери [60–61].

Програма відбору проб розробляється з урахуванням місцевих топографічних та гідрологічних умов, що обстежується області, інформації про місцеві особливості поширення SARS-CoV-2.

Щоб забезпечити надійність процедур відбору та аналізу проб, запропонований протокол заснований на наукових, прийнятих на міжнародному рівні принципах; при цьому забезпечено можливість їх сумлінного застосування. Рішення в області управління ризиками винесені на основі оцінки ризиків та інших актуальних факторів, пов'язаних з охороною здоров'я населення та тварин, і враховує дані щодо епідеміологічної ситуації.

Прозорі процедури відбору, а також оцінки отриманих результатів дозволяють оперувати в умовах відкритості, так що кожна сторона поінформована про дії, що вживаються іншими сторонами. Маючи повне уявлення про процедурах, всі зацікавлені сторони можуть приймати поінформовані рішення, що, в свою чергу, знижує потенційний ризик виникнення суперечок щодо результатів відбору і аналізу проб.

Розроблений СОП наведено в Додатку Б.

2.7 Розробка СОПів для лабораторної діагностики коронавірусу методом LAMP

Використання методу ізотермічної ампліфікації, що опосередкована через петлю, LAMP, суміщеною зі зворотною транскрипцією (RT-LAMP) розглядається як перспективний та надійний метод виявлення вірусу SARS-CoV-2 в лабораторних умовах.

Особливістю методу є те, що вся процедура ампліфікації проводиться в умовах постійної температури за короткий проміжок часу, від 30 до 50 хвилин, та усуває необхідність в застосування спеціалізованого обладнання, необхідного для проведення класичної ПЦР. Діагностичні тести з використанням цієї техніки були розроблені для визначення РНК-вірусів, бактерій, грибків і інших патогенів. На даний час опубліковано або кілька

статей та препрінтів, присвячених використанню RT-LAMP для виявлення SARS-CoV-2.

Протягом звітного періоду виконавцями проекту розроблено стандартну операційну процедуру для виявлення SARS-CoV-2 методом RT-LAMP.

Важливо, що продукти ампліфікації можуть бути визначені як за допомогою ПЛР-ампліфікатора в реальному часі, так і без використання спеціального обладнання шляхом візуального аналізу зміни забарвлення реакційної суміші в пробірці, завдяки застосуванню інтеркалуючих барвників типу SYBR Green, які змінюють колір зв'язуючись з подвійною спіраллю ДНК утворених у реакції ампліконів.

Для проведення реакції нами рекомендовано використати набори праймерів, які мають високу специфічність та чутливість. Ми рекомендуємо використовувати праймери, розроблені Wei E. Huang et al., 2020 (DOI:10.1111/1751-7915.13586) [62], що дозволяють детектувати фрагмент гену нуклеокапсиду (N-ген) SARS-CoV-2 та фрагмент гену оболонки (S-ген) SARS-CoV-2 Для контролю якості реакції ампліфікації в як ген внутрішнього контролю рекомендовано детектувати фрагмент гену, що кодує 18S рРНК (Curtis A.K. et al., 2020, DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.02.012) [62].

Запропоновані праймери для детектування N та S генів методом RT-LAMP, відповідно до опублікованих даних, показують відсутність неспецифічної ампліфікації та перехресної реакції з іншими видами коронавірусів людей та тварин або з іншим респіраторними вірусами і забезпечують поріг чутливості методу, що близький до порогу чутливості ПЛР зі зворотньою транскрипцією (RT-PCR) у реальному часі.

Сіквенс запропонованих праймерів та умови проведення RT-LAMP наведено в СОП Виявлення віrusу SARS-CoV-2 методом циклічної ізотермічної ампліфікації(LAMP) (Додаток А).

Переваги запропонованого методу включають обмеження залежності від дорогих інструментів, швидку обробку та зручну інтерпретацію результатів. Впровадження RT-LAMP, за нашими розрахунками, дозволить

зменшити витрати на реагенти в п'ять-сім разів та значно скоротити час на проведення досліджень.

Подальшим впровадженням розробленого СОПу буде підтвердження того, що аналіз є високо специфічним для виявлення SARS-CoV-2 та не має перехресної реактивності з іншими респіраторними вірусами, включаючи сезонний грип та коронавіруси тварин. Буде також підтверджено відсутність помилкових хибно позитивних та хибно негативних результатів.

Використовуючи запропоновані праймери, ми плануємо підтвердити чутливість методу порівняно з класичним методом RT-PCR.

На додавнення до стандартної операційної процедури з використанням петлевої ізотермічної ампліфікації (RT-LAMP) для детектування вірусу SARS-CoV-2 нами також були розроблені СОПи, які необхідні для проведення підготовчих етапів роботи – екстракції тотальної РНК з мазків, суспензії тканин, супернатанту культури тканин та екстракції зразків з мазків для детектування коронавірусу SARS-CoV-2.

Крім того, попередні експерименти з іншими патогенами демонструють, що RT-LAMP буде проводитись як з виділенням РНК віrusу, так і без РНК-екстракції шляхом інактивації сухих тампонів або мазків, що містять віруси у лізуючому буферному розчині (наприклад Triton X100) та використання цього розчину безпосередньо в реакційній суміші.

Наша методологія передбачає використання ампліфікатора PCR в режимі реального часу, який вимірює накопичення цільових продуктів за допомогою барвника SYBR, що дозволяє виявляти збудник в режимі реального часу та стандартизувати процедуру. Ми також плануємо встановити чи можна використати методи фотоелектроколориметрії або спектрофотометрії для детектування продуктів реакції RT-LAMP.

Таким чином, протягом звітного періоду для подальшого проведення лабораторних досліджень виконавцями проекту були розроблені необхідні стандартні операційні процедури:

1. Екстракція тотальної РНК та ДНК з мазків, сусpenзій тканин, супернатанту культури тканин. Стандартна операційна процедура / Розробники: Ничик С.А., Гудзь Н.В., Тарасов О.А., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 13 с. (Додаток В).

2. Екстракція зразків з мазків для детектування коронавірусу SARS-CoV-2 / Розробники: Ничик С.А., Гудзь Н.В., Тарасов О.А., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 6 с. (Додаток Г).

3. Виявлення вірусу SARS-CoV-2 методом циклічної ізотермічної ампліфікації (LAMP) / Розробники: Ничик С.А., Гудзь Н.В., Тарасов О.А., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 22 с. (Додаток А).

2.8 Розроблення методичних рекомендацій з порядку дезінфекції присадибних територій та будівель в господарствах, де виявлені інфіковані тварини

Ветеринарна санітарія – це наука про профілактику і ліквідацію інфекційних та інвазійних хвороб тварин шляхом знищення на об'єктах зовнішнього середовища збудників хвороб і їх переносників та способи отримання продуктів і сировини тваринного походження високої санітарної якості, безпечних для людини.

Методичні рекомендації з проведення ветеринарної дезінфекції розроблені відповідно до діючих нормативних документів, а саме Закону України «Про ветеринарну медицину» від 25 червня 1992 року № 2498-XII та Закону України «Про забезпечення санітарного та епідемічного благополуччя населення» від 24 лютого 1994 року № 4004-XII з метою недопущення поширення на території України інфекційних хвороб тварин (птахів).

Ці рекомендації визначають основні положення, види і порядок проведення дезінфекції об'єктів тваринництва.

Методичні рекомендації передбачають терміни проведення, методи дезінфекції виробничих і допоміжних приміщень, спецодягу і взуття,

транспортних засобів, території та інших об'єктів обробки, потреби в дезінфікуючих засобах, мийно-дезінфекційної техніки та людських ресурсах з урахуванням обсягу робіт, розташування об'єктів обробки, технології виробництва, епізоотичної ситуації та інших особливостей господарства.

Наведено рекомендації щодо дотримання заходів особистої безпеки, правил безпеки при роботі з дезінфекційними засобами та дезінфекційної технікою, враховуючи охорону природного середовища, передбачені діючими нормативними документами, та методи бактеріологічного контролю якості дезінфекцій.

Розроблені методичні рекомендації призначенні для ветлікарів господарств, спеціалістів регіональних державних лабораторій ветеринарної медицини, науковців, аспірантів, викладачів вищих навчальних закладів 3–4 рівнів акредитації зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Отже, за звітний період виконавцями проекту були розроблені:

Методичні рекомендації з порядку дезінфекції присадибних територій та будівель в господарствах, де виявлені інфіковані тварини / Розробники: Ничик С.А., Гудзь Н.В., Тарасов О.А., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 63 с. (Додаток Д).

2.9 Розробка інструкції з дезінфекції приміщень при виявленні тварин, інфікованих вірусом SARS-CoV-2

Інструкція розроблена на підставі детального вивчення наявних літературних джерел, рекомендацій МОЗ України та ВООЗ.

В інструкції наведено заходи з дезінфекції приміщень, в яких знаходяться або можуть знаходитись особи з підозрою на захворювання або особи з підтвердженням COVID-19.

Описані в інструкції заходи спрямовані на зменшення тривалості виживання та кількості живих вірусів в навколишньому середовищі. Інструкція може оновлюватись у зв'язку новими повідомленнями та додатковою інформацією щодо статистичного матеріалу та результатів

наукових досліджень, які у зв'язку з пандемією коронавірусу зараз активно проводяться у багатьох країнах світу.

Інструкція може застосовуватись як в умовах великих та малих тваринницьких господарств, так і в оселях, де утримуються домашні та службові тварини.

Відповідно до наявної інформації, зараження коронавірусом SARS-CoV-2 набагато частіше відбувається повітряно-краплинним шляхом, ніж через предмети і поверхні, такі як дверні ручки, стільниці, клавіатури, іграшки тощо. Наявні дані свідчать про те, що SARS-CoV-2 може залишатися життєздатним протягом декількох годин або днів на поверхнях із різних матеріалів.

Очищення забруднених або ймовірно забруднених поверхонь з наступною дезінфекцією – це найкраща практика для запобігання COVID-19 та інших респіраторних вірусних захворювань в домашніх умовах та в громадських місцях.

В системі ветеринарно-санітарних заходів, що забезпечують безпеку тваринництва від заразних хвороб та санітарну якість продуктів, сировини і кормів тваринного походження, дезінфекція займає одне з найважливіших місць.

У разі виявлення тварин інфікованих SARS-CoV-2, прибирання та дезінфекція проводиться на всіх об'єктах, де виявлені такі тварини.

Прибирання означає видалення бруду з поверхонь. Прибирання не вбиває віруси та мікроорганізми, але, видаляючи їх, знижує їх кількість і ризик поширення інфекції.

Дезінфекція передбачає застосування хімічних сполук – дезінфікуючих засобів, для знищення мікробів на поверхнях, для зниження ризиків поширення інфекцій.

Основне призначення таких заходів – розірвати епізоотичний ланцюг шляхом впливу на її найважливішу ланку – фактор передачі збудника хвороби від джерела інфекції до чутливого організму.

В розробленій інструкції передбачено умови і терміни проведення та методи дезінфекції приміщень, спецодягу і взуття, транспортних засобів, території та інших об'єктів, види дезінфікуючих засобів а також детально надано техніки проведення дезінфекції.

Для дезінфекції використовують засоби, що мають відповідні сертифікати виробника, що засвідчують їх відповідність вимогам Державних (галузевих) стандартів або Технічних умов та рекомендовані до застосування міжнародними та національними організаціями охорони громадського здоров'я.

При проведенні робіт з дезінфекції необхідно дотримуватися заходів особистої безпеки, правила безпеки при роботі з засобами та технікою дезінфекції, передбачені діючими нормативними документами. Отже, за звітний період виконавцями проекту була розроблена:

Інструкція з дезінфекції при виявленні тварин, інфікованих SARS-CoV-2 / Розробники: Ничик С.А., Гудзь Н.В., Тарасов О.А., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 6 с. (Додаток Е).

2.10 Розробка проекту Інструкції з профілактики та елімінації поширення коронавірусу серед домашніх тварин.

Проект Інструкції з профілактики та елімінації поширення коронавірусу серед домашніх тварин розроблено із урахуванням рекомендацій МОЗ України, CDC (Центру США для контролю та запобіганню поширення інфекцій), AVMA (Американської Асоціації Ветеринарної Медицини), NASPHV (Національної асоціації ветеринарів та громадського здоров'я США), тимчасових вказівок для працівників охорони здоров'я, які займаються лікуванням людей, хворих на COVID-19 в домашніх умовах та ізоляції, які мають домашніх тварин чи інших тварин Європейського союзу, діючих вимог до біозахисту та біобезпеки та інших.

Відомо, що вірус SARS-CoV-2, що викликає пандемію COVID-19 передається від людини до людини, але все частіше з'являються публікації про інфікування тварин SARS-CoV-2.

Доведено, що кілька видів тварин чутливі до зараження SARS-CoV-2 як природним, так і експериментальним шляхом (табл. 25). Слід зауважити, що дані є приблизними через малий об'єм експериментальних даних щодо чутливості ВРХ, ДРХ, свиней і домашньої птиці а також котів та собак до інфекції.

Встановлені механізми передачі інфекції включають повітряно-крапельний, контактний, фекально-оральний.

SARS-CoV-2 поширюється переважно від людини до людини повітряно-крапельним шляхом. На даний момент немає суттєвих доказів того, що тварини відіграють значну роль у розповсюдженні віруса, що викликає Covid-19. Існує ймовірність поширення вірусу від людей до тварин після тісного контакту тварини з людиною, хворою на Covid-19.

Однак, на сьогодні немає доказів того, що тварини-компаньйони грають епідеміологічну роль в поширенні зараження людей SARS-CoV-2. Повідомлення про інфікування на норкових фермах припускають, що в умовах скупчення великого поголів'я чутливих тварин в обмеженому просторі існує можливість передачі SARS-CoV-2 від норки до людини після зараження цих тварин.

В інструкції описані клінічні прояви хвороби, діагностика, із зазначенням особливостей відбору, пакування, зберігання та транспортування зразків до лабораторії.

Таблиця 25

Інформація щодо чутливості видів тварин до зараження SARS-CoV-2

Вид тварин	Спосіб інфікування	Сприйнятливість (відсутня/низька/висока)	Клінічні ознаки	Передача збудника
Свині	Експериментальний	Відсутня	Відсутні	Відсутня
Птиця (кури, качки, індикі)	Експериментальний	Відсутня	Відсутні	Відсутня
Собаки	Природний і експериментальний	Низька	Відсутні (можливі в деяких випадках)	Відсутня
Коти (домашні)	Природний і експериментальний	Висока	Наявні (відсутні або слабовиражені в деяких випадках)	Наявна, між котами
Тигр і лев	Природний	Висока	Наявні	Наявна, між тваринами
Тхір	Експериментальний	Висока	Відсутні (в деяких випадках слабовиражені)	Наявна, між тхорами
Норка (американська норка)	Природний	Висока	Наявні	Наявна, між норками і юмовірна від норок до людині
Золотистий сирійський хом'як	Експериментальний	Висока	Наявні (відсутні або слабовиражені в деяких випадках)	Наявна, між хом'яками
Макака	Експериментальний	Висока	Наявні	Наявна

Значна увага при створенні інструкції приділена заходам щодо профілактики зараження тварин SARS-CoV-2. Для профілактики зараження тварин SARS-CoV-2 проводять комплекс заходів, направлених на ізоляцію хворих та контактних тварин.

Оскільки на сьогодні наявні дані свідчать про те, що сільськогосподарські тварини, а саме ВРХ, свині, вівці, кози характеризуються відсутністю сприйнятливості до SARS-CoV-2, а також відсутністю симптомів та можуть виступати лише в якості механічного фактору передачі збудника, такі тварини не потребують специфічних заходів профілактики та вживання карантинних заходів.

Важливим є те, що в розробленому документі описані заходи щодо тварин-компаньйонів (собаки та коти), а також хутрових звірів (норка, тхір). Оскільки, згідно останніх даних, тварини-компаньйони та хутрові звіри можуть хворіти на Covid-19 із клінічними ознаками та поширювати збудник на тварин та, ймовірно, на людей (точні дані відсутні), необхідно вживати комплекс заходів, спрямованих на попередження розповсюдження збудника.

В проекті інструкції зазначені заходи та особливості поводження із позитивними на SARS-CoV-2 тваринами, а також впровадження правил безпеки для обслуговуючого персоналу в неблагополучних пунктах.

Після отримання офіційної інформації про встановлення діагнозу на Covid-19 компетентним органом приймається рішення про оголошення спалаху Covid-19 у господарстві, визначаються межі спалаху, зони захисту і нагляду та проводяться протиепізоотичні заходи:

- охоронно-карантинні заходи – забезпечення локалізації вогнища інфекції, виконання карантинних заходів із недопущення поширення захворювання;
- епізоотологічні заходи – обстеження епізоотичних вогнищ та інфікованих об'єктів, аналіз епізоотичної ситуації, розроблення та контроль здійснення заходів із ліквідації захворювання;
- діагностичні заходи – відбір біологічного матеріалу та його доставка до діагностичних лабораторій;
- матеріально-технічні заходи – забезпечення дезінфекційною технікою, засобами для ліквідації осередку інфекції (технікою, обладнанням тощо), засобами індивідуального захисту осіб, які працюють у зоні спалаху хвороби.

В інструкції передбачено правила та заходи, спрямовані на захист фахівців ветеринарної медицини від зараження SARS-CoV-2, включаючи детальний опис засобів індивідуального захисту, поводження із власником домашньої тварини із респіраторними симптомами, підозрою або із підтвердженням діагнозом Covid-19.

В інструкції також враховані сучасні методи та підходи до дезінфекції та наводяться рекомендації щодо знишення вірусу SARS-CoV-2 в навколошньому середовищі.

Останнім пунктом інструкції є стратегія нагляду, яка включає нагляд за популяцією чутливих тварин для виявлення хвороби. Залежно від історії хвороби та видів, з яких складається цільова популяція тварин, потрібно валідувати чутливість і специфічність діагностичних тестів. Повинна діяти ефективна процедура моніторингу позитивних результатів, які є підтвердженням поширення вірусу SARS-CoV-2.

Метою клінічного нагляду є виявлення клінічних ознак COVID-19 або інфікування SARS-CoV-2. Виявлені під час клінічного нагляду підозри на COVID-19 в обов'язковому порядку повинно бути підтверджено або спростовано лабораторними дослідженнями. Клінічний огляд повинен бути спрямований на ті види тварин, в яких проявляються виражені клінічні ознаки хвороби.

Метою вірусологічного нагляду є:

- виявлення вірусної активності в групах ризику;
- підтвердження діагнозу виявленням SARS-CoV-2 молекулярно-генетичними та серологічними методами;
- простежування позитивних результатів тестів;
- типізація генотипів вірусів, що циркулюють у країні.

Результати отримані під час генетичного аналізу специфічних фрагментів геному вірусу у пробах, відібраних від заражених тварин, дають змогу отримати інформацію про тип та генетичний профіль циркулюючих вірусів.

Отже, протягом звітного періоду для досліджень виконавцями проекту було розроблено:

Проект Інструкції з профілактики та елімінації поширення коронавірусу серед домашніх тварин / Розробники: Ничик С.А., Тарасов О.А., Гудзь Н.В., Мельничук С.Д., Сорочинський Б.В. – 12 с. (Додаток Ж).

2.11 Організація проведення інформаційно-роз'яснювальної роботи з населенням щодо санітарно-гігієнічних заходів для недопущення поширення коронавірусної інфекції серед тварин.

Проведено просвітницьку роботу з місцевим населенням в Львівській, Тернопольській, Хмельницькій та Полтавській областях (у 5 районах та 20 населених пунктах в кожній області) – всього 120 населених пунктів.

Надано рекомендації щодо дотримання заходів особистої безпеки, правил безпеки при роботі з дезінфекційними засобами та дезінфекційної технікою, враховуючи охорону природного середовища, передбачені діючими нормативними документами.

Роз'яснені основні заходи спрямовані на зменшення тривалості виживання та кількості живих вірусів в навколошньому середовищі на основі нових повідомлень та додаткової інформації щодо статистичного матеріалу та результатів наукових досліджень, які у зв'язку з пандемією COVID-19 зараз активно проводяться у багатьох країнах світу.

Новий коронавірус SARS-CoV-2, який викликає хворобу COVID-19, залишається недостатньо вивченим. Враховуючи, що на даний час відомо, що поширення цього віrusу найчастіше відбувається від людини до людини серед людей, які знаходяться в тісному контакті, в межах приблизно 1,5–2 м. Цей тип передачі відбувається повітряно-крапельним шляхом. Останні дослідження вказують на те, що інфіковані люди без симптомів, ймовірно, також грають роль в поширенні COVID-19. Відповідно до наявної інформації, зараження коронавірусом SARS-CoV-2 набагато частіше відбувається повітряно-крапельним шляхом, ніж через предмети і поверхні, такі як дверні ручки, стільниці, клавіатури, іграшки тощо. Наявні дані свідчать про те, що SARS-CoV-2 може залишатися життєздатним від декількох годин до трьох днів на поверхнях із різних матеріалів.

Проведено роз'яснення щодо правил та заходів, спрямованих на захист фахівців ветеринарної медицини від зараження SARS-CoV-2, включаючи детальний опис засобів індивідуального захисту, поводження із власником

домашньої тварини із респіраторними симптомами, підозрою або із підтверденим діагнозом COVID-19.

Під час зустрічей з представниками Держпродспоживслужби була представлена стратегія нагляду, яка включає нагляд за популяцією чутливих тварин для виявлення хвороби. Залежно від історії хвороби та видів, з яких складається цільова популяція тварин, потрібно валідувати чутливість і специфічність діагностичних тестів. Повинна діяти ефективна процедура моніторингу позитивних результатів, які є підтвердженням поширення вірусу SARS-CoV-2. Виявлені під час клінічного нагляду підозри на COVID-19 в обов'язковому порядку повинно бути підтверджено або спростовано лабораторними дослідженнями. Клінічний огляд повинен бути спрямований на ті види тварин, в яких проявляються виражені клінічні ознаки хвороби.

Таким чином, в результаті виконання етапу проекту було підвищено рівень обізнаності населення щодо правил особистої гігієни та ветеринарно-санітарних заходів утримання тварин з метою запобігання поширення вірусу SARS-CoV-2 в популяціях домашніх тварин, які наражаються на максимальний ризик інфікування.

2.12 Придбання необхідних матеріалів та обладнання для виконання проекту.

За виконання календарного плану етапу 2020 року Виконавцем згідно Розрахунку до кошторису Проекту через систему Е-тендер оформлено договір на придбання ампліфікатора BioRad 1000 із модулем SX96 згідно завдань проекту та необхідні для цього реагенти.

За виконання календарного плану етапу 2021 року Виконавцем згідно Розрахунку до кошторису Проекту через систему Е-тендер оформлено договір на придбання сучасної системи для проведення повногеномного секвенування вірусу SARS-CoV-2 Ion Torrent 5 «Temno Fisher Scientific» для визначення особливостей маркерних генів і аналізу генетичної мінливості збудника згідно

завдань проекту та необхідні для цього реагенти. Секвенування позитивних зразків заплановано під час виконання наступного етапу проекту.

Висновки

1. Проведено епідеміологічний аналіз поширення захворювання Covid-19 в Україні та визначено населені пункти в 6 областях для відбору проб (згідно відкритих даних).

2. Здійснено виїзди та відібрано 1214 пробу в 6 областях України – Львівський, Тернопольський, Хмельницький, Полтавський, Чернігівській та Житомирській від цільових видів тварин, а також деяких тварин приватного зоопарку. Присутності вірусу SARS-CoV-2 в зразках від тварин за дослідження методом ПЛР в реальному часі не встановлено.

3. Оптимізовано умови проведення петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP, loop-mediated amplification) для швидкого і ефективного діагностування вірусу SARS-CoV-2 з урахуванням останніх даних літератури.

4. Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4%, а чутливість для зразків з $\text{Ct} < 30$ на RT-qPCR була 98,5%. Для гену S загальна специфічність склала 92,8%, чутливість для зразків з $\text{Ct} < 30$ – 96,8%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7%, чутливість – 98,5%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75%, а також чутливість 98,5%.

5. Проведено секвенування геному 8 ізолятів вірусу SARS-CoV-2 та серед секвенованих ізолятів виявлено п'ять субліній варіанту Delta: два AY.33 (B.1.617.2.33), один AY.36 (B.1.617.2.36), один AY.122 (B.1.617.2.122), один B.1.617.2 та два AY.4.2 (B.1.617.2.4.2). Один із восьми ізолятів віднесено до варіанту Alpha, який є представником лінії B.1.1.7.

6. Розроблено проект інструкції щодо профілактики та елімінації SARS-CoV-2, при цьому оцінено небезпеку для різних видів тварин. Розроблені стандартні операційні процедури, які включають: відбір проб,

транспортування, зберігання, знищення зразків біологічного матеріалу від тварин, екстракцію тотальної РНК та ДНК з мазків, сусpenзії тканин, супернатанту культури тканин, екстракцію зразків з мазків для детектування коронавірусу SARS-CoV-2 та виявлення вірусу SARS-CoV-2 методом петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP), що дозволить стандартизувати і оптимізувати умови проведення тестів щодо виявлення специфічних фрагментів зазначеного віrusу.

7. Розроблено інструкцію щодо проведення дезінфекції для ліквідації та профілактики захворювань, що викликаються коронавірусом, при виявленні тварин, інфікованих SARS-CoV-2.

8. Проведено просвітницьку роботу з місцевим населенням в Львівській, Тернопольській, Хмельницькій, Полтавській, Чернігівській та Житомирській областях (в 5 районах та 20 населених пунктах в кожній області – всього 30 районів та 120 населених пунктів).

9. Проведено тендер, закуплено та отримано необхідні матеріали для проведення секвенування, систему для секвенування (секвенатор) Ion torrent S5 (ThermoFisher Scientific) та ампліфікатор BioRad1000 із модулем SFX96. Матеріали та обладнання були використані для виконання завдань проекту, передбачених календарним планом.

Перелік джерел посилання

1. Zoonotic origins of human coronaviruses / Zi-Wei Ye, et al. // Int J Biol Sci. – 2020. – No. 16(10). – P. 1686–1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
2. SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far / Rabi F.A. et al. // Pathogens. – 2020. – No. 9(3). – P. 231. doi: 10.3390/pathogens9030231.
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Alexander E. Gorbatenko et al. // Nat Microbiol. – 2020. – No. 5(4). P. 536–544. doi: 10.1038/s41564-020-0695-z.
4. Ying Yan. Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures / Ying Yan, Le Chang, Lunan Wang // Rev Med Virol. – 2020. – No. 30(3). – P. e2106. doi: 10.1002/rmv.2106.
5. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay / Yan C., et al. // Clin Microbiol Infect. – 2020. – No. 26(6). – P. 773– 779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.
6. J. Kashir, A. Yaqinuddin. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19 / Kashir J., Yaqinuddin A. // Med Hypotheses. – 2020. – No. 141. – P. 109786. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109786.
7. T. Phun. Genetic diversity and evolution of SARS-CoV-2 / Phun T. // Infect Genet Evol. – 2020. – No. 81. – P. 104260. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104260.
8. Yong-Zhen Zhang. A Genomic Perspective on the Origin and Emergence of SARS-CoV-2 / Zhang Yong-Zhen, Holmes E. C. // Cell. – 2020. – No. 181(2). – P. 223–227. doi: 10.1016/j.cell.2020.03.035.
9. Zoonotic origins of human coronaviruses / Zi-Wei Ye, et al. // Int J Biol Sci. – 2020. – No. 16(10). – P. 1686–1697. doi: 10.7150/ijbs.45472.
10. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / Peng Zhou, et al. // Nature. – 2020. – No. 579(7798). – P. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
11. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins / Tommy Tsan-Yuk Lam, et al. // Nature. – 2020. – No. 583(7815). – P. 282–285. doi: 10.1038/s41586-020-2169-0.
12. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? / Ping Liu, et al. // PLoS Pathog. – 2020. – No. 16(5). – P. e1008421. doi: 10.1371/journal.ppat.1008421.
13. First experimental proof of Rotavirus A (RVA) genotype G18P[17] inducing the clinical presentation of 'young pigeon disease syndrome' (YPDS) in domestic pigeons (*Columba*

livia) / Rubbenstroth D., et al. // Transbound Emerg Dis. – 2020. – No. 67(4). – P. 1507–1516. doi: 10.1111/tbed.13485.

14. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters / Sia S.F., et al. // Nature. – 2020. – No. 583(7818). – P. 834–838. doi: 10.1038/s41586-020-2342-5.

15. Infection and Rapid Transmission of SARS-CoV-2 in Ferrets / Kim Y.I., et al. // Cell Host Microbe. – 2020. – No. 27(5). – P. 704–709.e2. doi: 10.1016/j.chom.2020.03.023.

16. Infection of dogs with SARS-CoV-2 / Th. Sit, et al. // Nature. – 2020. – No. 586(7831). – P. 776–778. doi: 10.1038/s41586-020-2334-5.

17. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates / Damas J., et al. // PNAS. – 2020. – No. 117 (36). – P. 22311–22322. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010146117>.

18. Yuan, S. Analysis of Possible Intermediate Hosts of the New Coronavirus SARS-CoV-2 / Yuan S., Jiang S.C., Li Z.L. // Front Vet Sci. – 2020. – No. 7. – P. 379. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00379>.

19. Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen / MacLean O.A., et al. // PLoS Biol. – 2021. – 19 (3). – P. e3001115. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001115>.

20. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / Hoffmann, M., et al. // Cell. – 2020. – No. 181 (2). doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

21. 2020. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / Lan J., et al. // Nature. – No. 581 (7807) – P. 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>.

22. Abdel-Moneim, A.S. Evidence for SARS-CoV-2 Infection of Animal Hosts / Abdel-Moneim A.S., Abdelwhab E.M. // Pathogens. – 2020. – No. 9 (7). <https://doi.org/10.3390/pathogens9070529>.

23. Li F. Receptor recognition and cross-species infections of SARS coronavirus / Li F. // Antiviral Res. – 2013. – No. 100 (1). – P. 246–254. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.08.014>.

24. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus / Wan Y., et al. // J Virol. – 2020. – No. 94 (7). <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>.

25. Host range projection of SARS-CoV-2: South Asia perspective / Ahmed R., et al. // Infect Genet Evol. – 2021. – No. 87. – P. 104670. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104670>.

26. Predicting the zoonotic capacity of mammal species for SARS-CoV-2 (preprint) / Fischhoff I.R., et al. – 2021. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.02.18.431844>.

27. Predicting susceptibility for SARS-CoV-2 infection in domestic and wildlife animals using ACE2 protein sequence homology / Kumar A., et al. // Zoo Biol. – 2021. – No. 40 (1). – P. 79–85. <https://doi.org/10.1101/2021.02.18.431844>.
28. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2 / Liu Y., et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2021. – No. 18 (12). – P. e2025373118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025373118>.
29. Adaptation of SARS-CoV-2 in BAB/cmice for testing vaccine efficacy / Gu, H., et al. // Science. – 2020. – 369 (6511). – P. 1603–1607. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>.
30. Mutational spectra of SARSCoV- 2 isolated from animals / Elaswad, A., et al. // Peer J. – 2020. – 8. – P. e10609. <https://doi.org/10.7717/peerj.10609>.
31. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets / Richard M., et al. // Nat Commun. – 2020. – No.11 (1). – P. 3496. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>.
32. Cai H.Y. SARS-CoV-2 spike protein gene variants with N501T and G142D mutation dominated infections in minks in the US / Cai H.Y., Cai A. // Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2021. – Vol. 33, Is. 5. – P. 939–942. <https://doi.org/10.1177/10406387211023481>.
- 33 Ferretti L. Quantifying SARS-CoV-2 transmission suggests epidemic control with digital contact tracing / Ferretti L, Wymant C, Kendall M, et al. // Science. – 2020. – 368(6491):eabb6936. <https://doi.org/10.1126/science.abb6936.7>.
34. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK/ Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA et al.// Lancet. –2021.– 397(10269):99–111. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32661-1).
35. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2)./ Li R, Pei S, Chen B, et al.// Science. – 2020. – 368(6490):489–93. <https://doi.org/10.1126/science.abb3221>.
36. Convergent evolution of SARS-CoV-2 spike mutations, L452R, E484Q and P681R, in the second wave of COVID-19 in Maharashtra, India./ Cherian S, Potdar V, Jadhav S, Yadav P, Gupta N, Das M, et al. // BioRxivv. –2021.– <https://doi.org/10.1101/2021.04.22.440932>.
37. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding./ Lu R, Zhao X, Li J, et al.// Lancet. – 2020.– 395(10224):565–74. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30251-8).
- 38 Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach./ Naqvi AAT, Fatima K, Mohammad T, et al. // Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.– 2020.– 1866(10):165878. <https://doi.org/10.1016/j.bbadiis.2020.165878>.

39. Estimated transmissibility and severity of novel SARS-CoV-2 variant of concern 202012/01 in England/ Davies NG, Abbott S, Barnard RC, Jarvis CI, et al. // MedRxiv. – 2021–2020–12. <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.20248822>
40. SARS-CoV-2 Natural Transmission from Human to Cat, Belgium, March 2020 / Garigliany M., et al. // Emerg Infect Dis. – 2020. – No. 26 (12). – P. 3069–3071. <https://doi.org/10.3201/eid2612.202223>.
41. Occurrence of Antibodies against SARS-CoV-2 in the Domestic Cat Population of Germany / Michelitsch A., et al. // Vaccines (Basel). – 2020. – No. 8 (4). – P. 772. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040772>.
42. Detection of SARS-CoV-2 in pets living with COVID-19 owners diagnosed during the COVID-19 lockdown in Spain: A case of an asymptomatic cat with SARS-CoV-2 in Europe / Ruiz-Arondo I., et al. // Transbound Emerg Dis. – 2021. – Is. 68 (2). – P. 973–976. <https://doi.org/10.1111/tbed.13803>.
43. Zhao, J. The Potential Intermediate Hosts for SARS-CoV-2 / Zhao J., Cui W., Tian B.P. // Front Microbiol. – 2020. – Is.11. – P. 580137. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580137>.
44. Evidence of exposure to SARS-CoV-2 in cats and dogs from households in Italy / Patterson E.I. et al. // Nature Communications. – Vol. 11. – P. 6231. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20097-0>.
45. From People to Panthera: Natural SARS-CoV-2 Infection in Tigers and Lions at the Bronx Zoo / McAloose D., et al. // Host-Microbe Biology. – 2020. – Vol. 11, Is. 5. – P. e02220-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02220-20>.
46. Mink SARS-CoV-2 Infection in Poland – short communication / Domanska-Blicharz K., et al. // J Vet Res. – 2021. – Vol. 65 (1). – P. 1–5. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0017>.
47. Mink, SARS-CoV-2, and the Human-Animal Interface / Fenollar F., et al. // Front Microbiol. – 2021. – Vol. 12. – P. 663815. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.663815>.
48. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study / Schlottau K., et al. // Lancet Microbe. – 2020. – Vol. 1 (5). – P. e218–e225. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6).
49. Detection and molecular characterisation of SARS-CoV-2 in farmed mink (Neovision vision) in Poland (preprint) / Rabalski L., et al. // 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.422670>.

50. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2 / Wei E. Huang, et al. // *Microbial Biotechnology*. – 2020. – No. 13. – P. 950–961. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
51. A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood / Kelly A Curtis, et al. // *J Virol Methods*. – 2018. – No. 255. – P. 91–97. doi: [10.1016/j.jviromet.2018.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.02.012).
52. Aksamentov, I., Roemer, C., Hodcroft, E. B., & Neher, R. A., (2021). Nextclade: clade assignment, mutation calling and quality control for viral genomes. *Journal of Open Source Software*, 6(67), 3773, <https://doi.org/10.21105/joss.03773>
53. James Hadfield, Colin Megill, Sidney M Bell, John Huddleston, Barney Potter, Charlton Callender, Pavel Sagulenko, Trevor Bedford, Richard A Neher Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 23, 01 December 2018, Pages 4121–4123, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
54. Tzou, Philip L., Kaiming Tao, Janin Nouhin, Soo-Yon Rhee, Benjamin D. Hu, Shruti Pai, Neil Parkin, and Robert W. Shafer 2020. "Coronavirus Antiviral Research Database (CoV-RDB): An Online Database Designed to Facilitate Comparisons between Candidate Anti-Coronavirus Compounds" *Viruses* 12, no. 9: 1006. <https://doi.org/10.3390/v12091006>
55. James Hadfield, Colin Megill, Sidney M Bell, John Huddleston, Barney Potter, Charlton Callender, Pavel Sagulenko, Trevor Bedford, Richard A Neher, Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution, *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 23, 01 December 2018, Pages 4121–4123, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
55. R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing (R Foundation for Statistical Computing); www.R-project.org/.
56. Wickham H. Welcome to the Tidyverse. / Wickham H., Averick M., Bryan J., et al // *J. Open Source Softw.* – 2019. – № 4, 1686.
57. Wickham H., *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. – Springer. – 2016. – 46p.
58. Dorai-Raj S.R package “binom”: Binomial confidence intervals for several parameterizations (CRAN); <https://cran.r-project.org/package=binom>
59. Mori, Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases / Y.Mori, T.Notomi, // *J. Infect. Chemother.* – 2009. – №15, –P.62–69.
60. Ahn, S. J. et al. Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *BMC Infect. Dis.* – 2019. – № 19, –P. 676.

61. Zhang, Y. et al. Rapid Molecular Detection of SARS-CoV-2 (COVID-19) Virus RNA Using Colorimetric LAMP. – 2020 doi:10.1101/2020.02.26.20028373.
62. Wei E. Huang RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2 / Wei E. Huang, Boon Lim, Chia-Chen Hsu, Dan Xiong Wei Wu et al. // Microbial Biotechnology. – 2020. – №13, – P. 950–961 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
63. Kelly A Curtis A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood/ Kelly A Curtis , Daphne Morrison, Donna L Rudolph, Anupama Shankar et al. // J Virol Methods. – 2018. – № 255. – P. 91–97. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.02.012.