

# Облікова картка дисертації

## I. Загальні відомості

**Державний обліковий номер:** 0825U001810

**Особливі позначки:** відкрита

**Дата реєстрації:** 20-05-2025

**Статус:** Запланована

**Реквізити наказу МОН / наказу закладу:**



## II. Відомості про здобувача

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Кіт Марина Юріївна

2. Maryna Y. Kit

**Кваліфікація:**

**Ідентифікатор ORCID ID:** 0000-0003-4306-7611

**Вид дисертації:** доктор філософії

**Аспірантура/Докторантура:** так

**Шифр наукової спеціальності:** 091

**Назва наукової спеціальності:** Біологія

**Галузь / галузі знань:** біологія

**Освітньо-наукова програма зі спеціальності:** Біологія та біохімія

**Дата захисту:**

**Спеціальність за освітою:** Біологія

**Місце роботи здобувача:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

### **III. Відомості про організацію, де відбувся захист**

**Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради):** PhD 9229

**Повне найменування юридичної особи:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

### **IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію**

**Повне найменування юридичної особи:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

### **V. Відомості про дисертацію**

**Мова дисертації:** Українська

**Коди тематичних рубрик:** 34.05, 62.37, 68.41.41, 68.41.53

**Тема дисертації:**

1. Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів
2. Improvement of African swine fever rapid diagnostics by molecular methods

**Реферат:**

1. Африканська чума свиней (АЧС) є транскордонне емерджентне вірусне контагіозне захворювання домашніх та диких свиней, гостра форма якого спричиняє загибель інфікованих тварин на рівні 100 %. Захворювання поширене в країнах Африки, Європи, Азії та Океанії. Наразі засобів лікування та зареєстрованих в Україні вакцин проти АЧС немає, тому ключовою ланкою боротьби із захворюванням є його швидка та ефективна діагностика. Також відомо, що у країнах, де вірус добре вкорінився, спостерігається його циркуляція в популяціях диких свиней, у тому числі це стосується слабковірулентних штамів збудника, що не спричиняють загибелі інфікованих тварин і після захворювання роблять їх позитивними вірусоносіями. З огляду на вищесказане, розробка вітчизняних методів діагностики є важливим завданням, а проведення скринінгових досліджень необхідне для встановлення ситуації щодо АЧС у популяції диких

свиней на території України. У дисертаційній роботі на підставі проведених молекулярно-генетичних, молекулярно-біотехнологічних, серологічних, біоінформатичних та статистичних досліджень вдосконалено систему її лабораторної діагностики за рахунок розробки та впровадження методик виявлення ДНК збудника на основі полімеразної ланцюгової реакції, петльової ізотермічної ампліфікації та антитіл до нього на основі імуноферментного аналізу. За використання експресуючої системи *E. coli* було отримано 6 рекомбінантних протеїнів вірусу АЧС (p10, p32, p54, p54ΔTM, лігаза, лігазаΔДЗД) та оптимізовано протоколи їх хроматографічного очищення. Для білків p54 та p32 показано можливість їх використання для детекції антитіл до збудника АЧС у сироватках крові свиней за допомогою ІФА та вестерн-блоту. Очищений за протоколом солюбілізації за допомогою детергентів рекомбінантний вірусний білок p32 є придатним для застосування його як антигена для проведення непрямого ІФА з метою детекції антитіл до вірусу АЧС. Його оптимальна концентрація складає 5 мкг/мл, розведення досліджуваної сироватки – 1:100 та вторинних антитіл – 1:10000. Внутрішньосистемний та міжсистемний коефіцієнти варіативності отриманих за допомогою розробленої методики результатів становлять 3,18 % та 7,59 % для позитивної та 1,56 % і 7,30 % для негативної сироваток відповідно. Розроблена тест-система для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus» здійснює ампліфікацію фрагмента гена b646l збудника АЧС, забезпечує отримання специфічних, точних і відтворюваних результатів і виявляє 10 копій цільового гена в 1 мкл, що відповідає 20 копіям на реакцію. Сконструйований на основі проведених біоінформатичних досліджень позитивний контрольний зразок на основі плазмідного вектору pTZ57R/T\_ASF зі вставкою гена b646l розміром 1763 п. н. кодує послідовності, які є цільовими для методів детекції ДНК вірусу АЧС, рекомендованих для використання ВООЗТ (класичної ПЛР та ПЛР у реальному часі). Розроблена методика детекції фрагмента гена c962g вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації дозволяє проводити ефективне виявлення вірусу АЧС протягом 40 хв з лімітом детекції 10 копій цільового гена в 1 мкл досліджуваного зразка. Її специфічність за дослідження гетерологічних і референтних зразків ДНК вірусу АЧС становить 100 %, а внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності результатів – 1,81 %, що відповідає вимогам до діагностичних тестів. Завдяки легкості проведення, метод може використовуватися в лабораторіях з обмеженими ресурсами і в польових умовах. Вдосконалений нами спосіб відбору ротової рідини диких свиней на канат з приманкою дозволяє використовувати його у польових умовах. Розроблений спосіб детекції гена nd5 *Sus scrofa* за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації дозволив підтвердити приналежність диким свиням 56 зі 101 зразка, зібраного у 2020–2021 рр. на території Харківської області, з яких 15 зразків (26,7 %) містили генетичний матеріал збудника АЧС, що свідчить про вкорінення вірусу у популяції диких свиней у цьому регіоні.

2. African swine fever (ASF) is a transboundary emergent viral contagious disease of domestic pigs and wild boars. An acute form of the disease causes up to 100 % mortality rate. ASF is spread in African, European, Asian, and Pacific countries. Since there are neither registered and widely used vaccine nor treatment, diagnostics remains one of the crucial issues for the disease control. It is also known that the virus circulates in wild boar populations in the countries where the virus is well-established. It includes low virulent strains that do not cause death of infected animals but make them lifelong virus carriers. Considering these facts, the development of domestic diagnostic tools is an important task, whereas a screening study is essential for clarification of the ASF situation among wild boars in Ukraine. In the thesis, based on the molecular, biotechnological, genetic, serological, bioinformatics and statistical studies, the system of ASF laboratory diagnosis was improved by developing and implementing methods for detecting the pathogen DNA based on polymerase chain reaction, loop isothermal amplification and antibodies to it based on enzyme-linked immunosorbent assay. Using the *E. coli* expression system, 6 recombinant proteins of the ASF virus (ASFV) (p10, p32, p54, p54ΔTM, ligase, ligaseΔDBD) were obtained and their chromatographic purification protocols were optimized. The possibility of using p54 and p32 proteins for the detection of antibodies to the ASFV in swine sera using ELISA and Western blot was proved. The recombinant protein p32 purified by the solubilization protocol using detergents is applicable as an antigen for indirect ELISA for the detection of antibodies to ASFV. Its optimal concentration is 5 μg/ml, dilution of the test serum is 1:100 and secondary antibodies is 1:10000. The intra-assay and inter-assay coefficients of variability of the results obtained

using the developed assay are 3.18% and 7.59% for positive and 1.56% and 7.30% for negative sera, respectively. The developed kit for detection of ASF virus genetic material by qPCR, 'Sui-DNA-test-ASF virus', amplifies the b646l gene fragment of the ASFV, provides specific, accurate and reproducible results and detects 10 copies of the target gene in 1 µl, which corresponds to 20 copies per reaction. A positive control sample based on the plasmid vector pTZ57R/T\_ASF with the insertion of the 1763 bp region of b646l gene encodes sequences that are targeted for the methods of detecting ASF virus DNA recommended by WHO (conventional and qPCR). The developed assay for detecting the c962r gene fragment of the ASFV using loop-mediated isothermal amplification allows for the effective detection of the pathogen within 40 minutes with a detection limit of 10 copies of the target gene in 1 µL of the test sample. Its specificity while testing heterologous and reference samples of ASF virus DNA is 100%, and the intra-assay coefficient of variation is 1.81%, which meets the requirements for diagnostic tests. Due to its easy implementation, the assay can be used in laboratories with limited resources and under field conditions. The improved method of oral fluid sampling from wild boars using a rope in a bait can be applied under field conditions. The developed method of detecting the nd5 gene of *Sus scrofa* using loop isothermal amplification allowed confirming that 56 out of 101 oral fluids samples collected in 2020–2021 in Kharkiv oblast belonged to wild boars, of which 15 samples (26.7%) contained genetic material of the ASF virus, indicating that the virus is established in the wild boar population in this region.

### **Державний реєстраційний номер ДіР:**

**Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:** Науки про життя, нові технології профілактики та лікування найпоширеніших захворювань

**Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:** Технологічне оновлення та розвиток агропромислового комплексу

**Підсумки дослідження:** Нове вирішення актуального наукового завдання

### **Публікації:**

- Gallardo, C., P. Sastre, P. Rueda, A. P. Gerilovych, M. Kit, I. Nurmoja, and M. F. Le Potier. 2021. "5. Methods for African swine fever diagnosis in clinical and environmental samples." in *Understanding and Combatting African Swine Fever*, 141–60. Wageningen, the Netherlands: Wageningen Academic Publishers. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7\\_5](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-910-7_5).
- Kit, M., J. Schwarz, and A. Gerilovych. 2021. "Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on the C962R gene for African swine fever virus detection". *Agricultural Science and Practice* 8, no. 3: 3–12. <https://doi.org/10.15407/agrisp8.03.003>.
- Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, О. Ю. Лиманська, М. Ю. Кіт, А. І. Бузун, та В. Л. Ареф'єв. 2018. "Вивчення специфічності та чутливості тест-системи для детекції вірусу африканської чуми свиней методом ПЛІР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»". *Ветеринарна медицина* 104: 359–62. [https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed\\_104.pdf](https://jvm.kharkov.ua/sbornik/104/VetMed_104.pdf).
- Kit, M., O. Zlenko, O. Solodiankin, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2020. "Development of recombinant positive control for African swine fever virus PCR detection." *Biotechnologia Acta* 13, no. 6: 58–63. <https://doi.org/10.15407/biotech13.06.058>.
- Kit, M. Yu. 2021. "Development of recombinant antigen expression and purification for African swine fever serological diagnostics." *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety* 7, no. 3: 24–31. <https://doi.org/10.36016/jymbbs-2021-7-3-4>.
- Kit, M., O. Solodyanin, V. Arefiev, V. Bolotin, and A. Gerilovych. 2018. "Development of universal positive DNA-control of ASF virus and validation of real-time PCR with its use." in *3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium*, Kyiv, Ukraine, April, 16–20, 2018, 118.
- Kit, M., and A. Gerilovych. 2021. "Development of DNA detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification." in *2021 International BioThreat Reduction Symposium*, Kyiv, Ukraine, 29

June, 29–July, 2, 64.

- Kit, M., C. Popp, H. von Buttlar, A. Gerilovych, and J. Schwarz. 2021. “Oral fluid-based surveillance study of African swine fever among wild boars in Ukraine.” in 17th Medical Biodefence Conference, Munich, Germany, September, 28–October, 1, 54.
- Buzun, A.-I., M. Kit, M. Stegnyy, and I. Bobrovickaya. 2022. “Vers l’farm initiative: Comment un antigène artificiel de la peste porcine africaine peut aider l’exportation agricole de l’Ukraine”. *пГОп*, no. July 8, 2022 [3rd International Scientific and Practical Conference “Débats Scientifiques et Orientations Prospectives du Développement Scientifique”, Paris, France, July 8, 2022]: 138–42. <https://doi.org/10.36074/logos-08.07.2022.037>.
- Kit, M. Ю., та О. Б. Зленко. 2024. “Скринінгове дослідження вірусу африканської чуми свиней у популяції диких кабанів на території Харківської області”. у Онлайн-конференція аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров’я та біотехнології «VetBioConnect», м. Харків, 3–4 червня 2024 р., 29–31. [https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect\\_2024\\_theses.pdf](https://www.iekvm.kharkov.ua/documents/VetBioConnect_2024_theses.pdf).
- Kit, M. Ю. 2024. “Розробка способу детекції ДНК свині (*Sus scrofa*) за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації”. у Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції: II міжнародна науково-практична конференція науково-педагогічних працівників та молодих науковців, м. Одеса, 17–18 жовтня 2024 р., 113–5. [https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024\\_ZBIRNYK\\_FVM.pdf](https://osau.edu.ua/wp-content/uploads/2024/11/2024_ZBIRNYK_FVM.pdf).
- Стегній, Б. Т., О. С. Солодянкін, А. П. Герілович, О. В. Піщанський, А. О. Меженський, М. А. Сапачова, Н. Г. Рудова, М. Ю. Кіт, та А. В. Кузьмінов. 2019. Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus». Патент України на корисну модель 133163, поданий 22 жовтня 2018 р., та опублікований 25 березня 2019 р. <https://sis.nipo.gov.ua/uk/search/detail/1340792>.
- Герілович, А. П., та М. Ю. Кіт. 2021. Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації (методичні рекомендації) [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».
- Кіт, М. Ю., О. Б. Зленко, та Т. Б. Дідик. 2024. Методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС» [затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.]. Харків: ННЦ «ІЕКВМ».

**Наукова (науково-технічна) продукція:** методичні документи

**Соціально-економічна спрямованість:** створення принципово нової продукції (матеріалів, технологій тощо) для забезпечення експортного потенціалу та заміщенню імпорту

**Охоронні документи на ОПВ:**

Винаходи, корисні моделі, промислові зразки

Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus»

**Впровадження результатів дисертації:** Впроваджено

**Зв'язок з науковими темами:** 0116U000237, 0119U100134, 0121U108358

## **VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Палій Анатолій Павлович

2. Anatoliy P. Paliy

**Кваліфікація:** д. вет. н., професор, 16.00.03

**Ідентифікатор ORCID ID:** 0000-0002-9193-3548

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

## **VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів**

**Офіційні опоненти**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Ситюк Микола Петрович

2. Mykola Sytiuk

**Кваліфікація:** д. вет. н., старший науковий співробітник, 16.00.03

**Ідентифікатор ORCID ID:** 0000-0001-6220-4867

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:** Інститут ветеринарної медицини Національної академії аграрних наук України

**Код за ЄДРПОУ:** 05510830

**Місцезнаходження:** вул. Донецька, буд. 30, Київ, 03151, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Колибо Денис Володимирович

2. Denys Kolybo

**Кваліфікація:** д. б. н., професор, 03.00.03

**Ідентифікатор ORCID ID:** 0000-0002-8476-0992

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:** Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна Національної академії наук України

**Код за ЄДРПОУ:** 05417288

**Місцезнаходження:** вул. Леонтовича, буд. 9, Київ, 01054, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія наук України

**Ідентифікатор ROR:**

### **Рецензенти**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Коваленко Лариса Володимирівна

2. Larysa V. Kovalenko

**Кваліфікація:** к. б. н., старший науковий співробітник, 03.00.04

**Ідентифікатор ORCID ID:** 0000-0003-1856-1298

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові:**

1. Кольчик Олена Володимирівна

2. Olena Kolchuk

**Кваліфікація:** к. вет. н., старший науковий співробітник, 16.00.08

**Ідентифікатор ORCID ID:** 000-0003-0497-2512

**Додаткова інформація:**

**Повне найменування юридичної особи:** Національний науковий центр "Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини"

**Код за ЄДРПОУ:** 00497087

**Місцезнаходження:** вул. Пушкінська, буд. 83, Харків, Харківський р-н., 61023, Україна

**Форма власності:** Державна

**Сфера управління:** Національна академія аграрних наук України

**Ідентифікатор ROR:**

## **VIII. Заключні відомості**

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові  
голови ради**

Руденко Євген Володимирович

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові  
головуючого на засіданні**

Руденко Євген Володимирович

**Відповідальний за підготовку  
облікових документів**

Кіт Марина Юріївна

**Реєстратор**

УкрІНТЕІ

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є  
відповідальним за реєстрацію наукової  
діяльності**



Юрченко Тетяна Анатоліївна