

Відгук
офіційного опонента на дисертаційну роботу
Рубленко Наталії Михайлівни
на тему: “Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в
полімеразній ланцюговій реакції”
на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук зі спеціальності
16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія,
інфекційні хвороби та імунологія»

Актуальність теми дисертаційної роботи та напрямів досліджень.

Сальмонельози тварин та людини представляють собою актуальну проблему для гуманної та ветеринарної медицини внаслідок високих рівнів захворюваності у всьому світі, що пов'язано з передачею збудників інфекції через продукти харчування та масовим набуттям сальмонелами моно- та полірезистентності до різних традиційних антимікробних препаратів (ампіцилін, хлорамфенікол, аміноглікозиди, сульфаніламід, тетрацикліни, тощо).

Останнім часом резистентність ентеробактерій, зокрема сальмонел, до ряду антибіотиків набуває все більшого розповсюдження. Набуття резистентності сальмонелами значно ускладнює боротьбу з сальмонельозом. Із відкриттям зони свободної торгівлі між Україною та ЄС, моніторинг резистентних до антибіотиків штамів сальмонел на цих територіях став вкрай актуальним.

Традиційні мікробіологічні методи не забезпечують виявлення маркерів антибіотикорезистентності у 100% штамів ентеробактерій. Ситуація істотно ускладнюється тим, що досить часто зустрічаються випадки наявності у мікроорганізмів декількох детермінант стійкості одночасно. Ефективність у вирішенні цього завдання в значній мірі визначається використанням молекулярно-генетичних методів дослідження, заснованих на використанні полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Зазначене обґрунтовує повною мірою актуальність досліджень **Рубленко Наталії Михайлівни**, метою яких було проведення моніторингу і детекції розповсюдженості генів факторів патогенності та резистентності до антибактеріальних препаратів, обґрунтування їх фенотипових проявів у музейних і польових штамів виду *Salmonella enterica*.

Для досягнення цієї мети перед дисертантом були поставлені такі завдання:

- провести моніторинг лабораторних досліджень в Україні (2006–2019 рр.) щодо розповсюдження бактерій роду *Salmonella*;
- провести виділення чистих культур ізолятів сальмонел із господарств з вирощування бройлерів та виробництва яєць та сформувати вибірку польових штамів;
- дослідити чутливість польових та музейних штамів сальмонели до антибактеріальних препаратів;
- встановити молекулярно-біологічні характеристики польових і музейних штамів сальмонел щодо наявності помірних бактеріофагів за індукції хіміотерапевтичним препаратом Мітоміцин С;
- дослідити наявність та поширеність генів патогенності, антибіотикорезистентності та репліконів плазмід серед польових та музейних штамів сальмонел;
- розробити на підставі встановлених молекулярно-біологічних властивостей мультиплексну систему для виявлення генетичного матеріалу сальмонел.

Дисертаційна робота **Рубленко Н.М.** виконувалася у рамках планових науково-дослідних робіт Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів у рамках завдань «Удосконалення системи підтримання та розширення колекції Національного центру штамів мікроорганізмів» (№ державної реєстрації 0116U007116, 2015–2016 рр.) та

«Розробка засобів та методів контролю і стандартизації ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) та мікробіологічних досліджень» (№ державної реєстрації 0109U001083, 2017–2019 рр.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень та висновків, представлених у дисертації.

Представлені до захисту положення дисертаційної роботи **Рубленко Н.М.** мають логічний зв'язок, є достатньо обґрунтованими, належним чином описані та експериментально розкриті, відповідають поставленій меті та вирішують задачі, поставлені перед здобувачем.

Дисертаційна робота виконувалась упродовж 2014 – 2020 рр. у відділі молекулярної біології та імунохімії, а також у відділі бактеріологічних досліджень та контролю якості ветеринарних імунобіологічних засобів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів Держпродспоживслужби України.

Робота виконувалась з використанням епізоотологічних, молекулярно-біологічних, бактеріологічних, серологічних та статистичних методів досліджень.

Вивчено біологічні характеристики польових штамів збудників роду *Salmonella* (n = 57), що надходили із регіональних лабораторій ветеринарної медицини, а також польові штами, виділені зі змивів, взятих на території низки птахогосподарств. Крім того, здобувачем досліджено властивості штамів сальмонел (n = 17) з колекції Національному центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Робота здобувача виконувалась у 5 етапів, що включали аналіз поширення сальмонельозу птиці на території України в 2006 – 2019 рр. за даними Державного інституту лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Держпродспоживслужби України; ідентифікацію генів факторів патогенності та факторів, що можуть підвищувати вірулентність у сальмонел методом ПЛР (за ампліфікацією таргетних генів і ділянок (*invA*,

agfB, *sefA*, *prt*, *sulI*, 5'-3'CS, *tetG*) та репліконів плазмід (*pN*, *pFIA*, *pFIIA*); визначення чутливості культур збудників сальмонельозу до антибактеріальних препаратів (з використанням бактеріологічних методів); індукцію помірних бактеріофагів з використанням мітоміцину C, а також розробку наборів праймерів для ідентифікації бактерій роду *Salmonella* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Результати досліджень були статистично оброблені за допомогою програми MS Excel.

Дослідження виконані з використанням сучасних наукових підходів, дизайн та достовірність результатів експериментів не викликають сумніву.

Структура та обсяг дисертації.

Дисертація складається з розділів: Вступ, Огляд літератури, Вибір напрямів досліджень, матеріали і методи виконання роботи, Результати експериментальних досліджень, Аналіз та узагальнення результатів досліджень, Висновки, Пропозиції виробництву, Додатки, Список використаних літературних джерел.

Робота викладена на 201-й сторінці комп'ютерного тексту, ілюстрована 16 таблицями і 36 рисунками, містить 16 додатків.

Список використаних джерел включає 416 найменувань, у тому числі 387 латиницею.

Наукове значення результатів роботи та їх новизна.

Наукове значення дисертаційної роботи **Рубленко Н.М.** полягає у проведенні моніторингу та аналізу поширеності сальмонельозу птиці в Україні за період 2006–2019 рр. в Україні.

Дисертанткою вперше встановлено наявність генів патогенності та антибіотикорезистентності у штамів *Salmonella enterica*, що циркулюють у популяції свійської птиці в Україні та серед штамів, які зберігаються в Колекції Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Встановлено наявність ену *invA*, експресія якого забезпечує інвазію збудника до епітеліальних клітин тонкого кишечника птиці всіх досліджених штамів сальмонел.

Рубленко Н.М. при дослідженні ізолятів збудника сальмонельозу виявлено гени, продукти яких відповідають за адгезію: *agfB*, *sefA*, *sopE*.

Проведено ідентифікацію репліконів плазмід різних груп несумісності: *pFIA*, *pN*, *pFIIA*. При цьому встановлено, що польові штами містили реплікони плазмід однієї або двох груп. Наявність двох репліконів у геномі встановлено у трьох штамів з Колекції ДНКІБШМ. Водночас у польових та музейних штамів виявлено гени, що забезпечують синтез факторів колонізації – *gipA*, *sodCI*, *sopE*.

За результатами молекулярно-біологічних досліджень дисертантом розроблено мультиплексну систему для виявлення генетичного матеріалу *Salmonella* та диференціації сероварів Enteritidis і Typhimurium методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Встановлено, що аналітична чутливість методики детекції ДНК сальмонел на основі запропонованих праймерів для детекції роду *Salmonella* становить: для *S. Typhimurium* – 0,25 нг/зразок (*Typhimurium*) та *S. Enteritidis* – 0,27 нг/зразок (*Enteritidis*).

Практичне значення роботи.

Практичне значення роботи здобувача полягає у визначенні дисертанткою поширеності генів патогенності серед польових та музейних штамів бактерій роду *Salmonella* може бути використана для удосконалення епізоотологічного моніторингу та впровадження у практику ветеринарної медицини молекулярно-генетичних методів для контролю циркуляції збудників сальмонельозу.

Дослідженнями **Рубленко Н.М.** встановлено поширеність генів резистентності до тетрациклінів, сульфаніламідів та функціональної ділянки інтегрону з хромосомною локалізацією у польових та музейних штамів *S. enterica* є підставою для удосконалення системи контролю за антибіотикорезистентністю бактерій. У колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ задекларовано ряд штамів сальмонел, зокрема, *S. Typhimurium* VM1, *S. Virchow* L116, *S. Typhimurium* Pg1, *S.*

Typhimurium PN, *S. Enteritidis* S1, *S. Typhimurium* L1, *S. Typhimurium* L2, *S. Enteritidis* PN, *S. Enteritidis* 11, що підтверджується відповідними свідоцтвами про депонування.

Здобувачем розроблено мультиплексну систему для виявлення генетичного матеріалу *Salmonella* та диференціації сероварів *Enteritidis* та *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції, яку описано у науково-методичних рекомендаціях «Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» (Затверджено Науково-методичною радою Держпродспоживслужби України; прот. №3 від 4.10.2019 р).

Матеріали дисертаційної роботи **Рубленко Н.М.** використовуються у навчальному процесі та наукових дослідженнях Національного університету біоресурсів і природокористування України, Львівському Національному університеті ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, Білоцерківському національному аграрному університеті, Дніпровському державному аграрно-економічному університеті, Поліському національному університеті, Інституті післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини БНАУ, Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Держпродспоживслужби України.

Апробація результатів дисертаційних досліджень.

Матеріали дисертаційної роботи доповідались, обговорювалися та отримали позитивну оцінку:

- Науковому симпозіумі в межах концепції «Єдине здоров'я» (м. Київ 2016, 2017 рр.),
- Науково-практичній конференції «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 2019 р.).

За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць, з яких 6 статей - у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до

міжнародних наукометричних баз даних, методичні рекомендації та 3 тези наукових доповідей.

Критична оцінка дисертації:

Незважаючи на актуальність, наукову новизну та вагоме практичне значення роботи Рубленко Н.М. необхідно зупинитися на деяких зауваженнях:

1. Перелік скорочень наведений не за абеткою, в ньому присутні не усі скорочення.
2. У роботі міститься ряд невдалих виразів, русизмів та технічних помилок, зокрема, “ізоляти відбирали”, хоча мова іде про виділення чи ізолювання, сальмонельоз не “розповсюджується”, а поширюється (розділ вступ та автореферат), “збільшення циркуляції” (с. 18), “падіж” замість “загибель” (с. 25) тощо (сс. 38, 42, 44, 48, 63, 72 та ін.).
3. Корми не можуть бути джерелом збудника, адже джерелом може бути хворий організм, або організм носій, натомість корми є фактором передачі.
4. На рисунку 1.2 незрозуміло в яких одиницях наведені показники циркуляції сальмонел серед птиці. В цьому ж рисунку було б доцільно навести посилання на відповідний сайт.
5. У підрозділі з лабораторної діагностики відсутня згадка про дослідження патогенності культур сальмонел в біопробі.
6. У Розділі ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ доцільно було б вказати походження польових ізолятів сальмонел в розрізі областей України.
7. Не зовсім доречно в цьому ж розділі вбачаються наведені літературні дані щодо факторів патогенності сальмонел (сс. 49-52).
8. Не вказано виробника діагностичних сироваток для ідентифікації серотипів сальмонел.

9. Бажано було б вказати параметри статистичної обробки даних результатів досліджень, описаних в дисертаційній роботі.
10. Динаміку випадків сальмонельозу по роках (рис. 3.2) краще б було викласти з додаванням числових значень по роках.
11. Ідентифікацію ізолятів за антигенною формулою більш наглядно було б представити у вигляді таблиці з урахуванням географії їх походження.
12. На рис. 3.10 відсутні треки позитивного та негативного контролів. На електрофореграмах або в описах рисунків доцільно було б вказати розміри ПЛР-продуктів, а також характеристики маркеру довжин фрагментів.
13. На рис. 3.21, 3.22, 3.23 та 3.24, а також 3.26 та 3.27 доцільно було б вказати одиниці виміру значення осі ординат.
14. На рис. 3.30-3.33 було б доцільно надати опис зразків, що ампліфікувалися та відповідним чином прономерувати криві ампліфікації.
15. Не зрозуміло авторство даних рисунків 4.1-4.2 з розділу “Обговорення...”, доцільно було б або внести посилання, або, якщо дані належать дисертанту, перенести ці ілюстрації до попереднього розділу.

Також до здобувача є ряд запитань, зокрема:

1. З чим пов'язано зменшення кількості виділень культур сальмонел в останні роки?
2. В чому полягає типування сальмонел з використанням методу помірних фагів та в яких країнах він засосовується в якості рутинного діагностичного підходу?
3. Які перспективи існують для широкого застосування методів молекулярної діагностики в системі лабораторної діагностики сальмонельозу? Наскільки економічно доцільним є їх застосування?

Висновок

У цілому вважаємо, що дисертаційна робота **Рубленко Наталії Михайлівни** є завершеною науковою працею, яка за своїм об'ємом, новизною, науковим, теоретичним та практичним значенням **відповідає п.11** «Порядку присудження наукових ступенів і присвоєння вченого звання старшого наукового співробітника» Департаменту атестації кадрів вищої кваліфікації Міністерства освіти і науки України, а її **автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 — ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія.**

Офіційний опонент,
Заступник директора ННЦ "ІЕКВМ"
з наукової роботи, доктор
ветеринарних наук, професор,
член-кореспондент НААН



А.П. Герілович

Підпис д.вет.н., проф., члена-кореспондента НААН Геріловича А.П.
засвідчую

Вчений секретар ННЦ "ІЕКВМ",
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник



Л.В. Коваленко