

ВІДГУК

офіційного опонента доктора ветеринарних наук, старшого наукового співробітника Музики Віктора Павловича на дисертацію та автореферат

КОЗИЦЬКОЇ ТАМАРИ ГРИГОРІВНИ

на тему: «*Метицилінрезистентний стафілокок: поширення, біологічні властивості та діагностика*» поданої на захист у спеціалізовану вчену раду при Національному університеті біоресурсів та природокористування України на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія.

Актуальність обраної теми. Антибактеріальні препарати представляють собою один з основних терапевтичних інструментів для лікування стафілококових інфекцій. Але їх використання, як в гуманній, так і у ветеринарній медицині призвело до виникнення штамів стафілококів, які вже не реагують на антибіотики. Найбільш поширений стійкий до антибіотиків збудник в Європі – це метицилінрезистентний стафілокок (*MRSA*). Згідно даних Європейського центру по контролю за інфекціями (ECDC) реєструється 170 000 *MRSA* інфекцій за рік, серед яких 5 тисяч випадків закінчуються летально, приносячи фінансові збитки європейській системі охорони здоров'я близько 380 млн. євро.

В нашій країні функціонують багато підприємств діяльність яких, пов'язана з вирощуванням сільськогосподарських тварин та птиці, переробкою та виробництвом харчових продуктів тваринного походження, тому існує велика вірогідність того, що тварини та люди можуть бути носіями *MRSA*, збудник може контамінувати продукцію тваринного походження, через яку передаватися людям.

Дисертацію виконано на базі науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, як підрозділ наукових програм за темами: «Розробка, вивчення та порівняння різних методів і засобів ветеринарно-санітарної оцінки і контролю якості та безпеки продукції тваринного і рослинного походження та кормів» (номер державної реєстрації 0109U001082, 2009–2018 рр.) та «Оцінка ступеню поширення антибіотикорезистентності у збудників зоонозів в Україні» (номер державної реєстрації 0118U100599, 2019–2028 рр.).

Виходячи з напрямків досліджень, визначених у державних завданнях, автор дисертаційної роботи поставив за мету дослідити поширення, біологічні властивості *S. aureus*, які циркулюють серед тварин, у продукції тваринного походження та в об'єктах довкілля на території України та удосконалити методи діагностики *MRSA*. Усе це підтверджує актуальність обраної теми, вказує на її новизну, визначає науково-методичний рівень і практичну значимість таких досліджень. Тому, можна вважати, що тема дисертаційної роботи Козицької Тамари Григорівни є актуальною, адже дисертантом вивчене поширення стафілококозів серед тварин в Україні, частоту виділення *S. aureus* у зразках продукції тваринного походження та в об'єктах довкілля, що підлягають ветеринарно-санітарному контролю в Україні, шляхом проведення бактеріологічних досліджень у зазначених зразках *S. aureus*, описані особливості культурально-морфологічних, біохімічних та патогенних властивостей виділених ізолятів *S. aureus*, визначена їх чутливість до антибактеріальних препаратів, визначено набуті молекулярно-генетичні механізми стійкості до метициліну (ген *mecA*), встановлений рівень поширеності *MRSA* серед ізолятів *S. aureus*, виділених з об'єктів досліджень, вивчена їх здатність до утворення біоплівки та чутливість до дезінфікуючих засобів.

Наукова новизна одержаних результатів. Наукова новизна дисертаційної роботи Козицької Тамари Григорівни не викликає сумніву, а використання комплексних методів дослідження: бактеріологічних (культурально-морфологічних, ферментативних, біохімічних, визначення чутливості до антибактеріальних препаратів та дезінфікуючих засобів, вивчення здатності до формування біоплівки); біологічних (патогенність *S. aureus* для білих мишей); молекулярно-генетичних (підтвердження наявності гену *mecA* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі) є доказом їх достовірності.

Наукові положення, які викладені у дисертації випливають з отриманих результатів і ґрунтуються на глибокому аналізі й узагальненні даних літератури. Більшість наукових положень дисертації сформульовані вперше, що свідчить про їх новизну, теоретичне і практичне значення.

Наукова новизна положень, які сформульовані у дисертації, полягає в наступному:

Проведено широкомасштабний аналіз щодо поширення *S. aureus* серед різних видів тварин, у зразках продукції тваринного походження, об'єктах довкілля, що підлягають ветеринарно-санітарному контролю, в Україні.

Досліджено біологічні властивості та проведено порівняльний аналіз чутливості до антибактеріальних препаратів у 39 дослідних ізолятів *S. aureus*.

Експериментально обґрунтовано доцільність проведення комплексних досліджень із застосуванням мікробіологічних та молекулярно-генетичних методів для визначення набутих механізмів резистентності у метицилінрезистентних *S. aureus* (виявлення гену *mecA*).

Задепоновано штамп *MRSA* (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму № «22-22» в Депозитарії Державного науково-дослідного контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів від 18.02.2019 р).

Досліджено та проведено порівняльний аналіз здатності до утворення біоплівки у штамів *S. aureus*, одержаних із різних об'єктів.

На основі аналізу проведених експериментів отримано нові наукові дані про стійкість виявлених антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* (*MRSA*) до дезінфікуючих засобів із різними діючими речовинами.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані, проаналізовані та узагальнені дисертантом результати досліджень, представляють інтерес і мають практичну значимість. Результати досліджень дисертанта стали науковим підґрунтям для розроблення та впровадження в систему лабораторної діагностики в державних лабораторіях Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів нормативних документів, а саме: «Методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (розглянуто та затверджено Науково-методичною радою Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, протокол № 1 від 25 грудня 2014 року), «Методичних вказівок. Сучасні методи визначення чутливості та виявлення механізмів резистентності *S. aureus* до антибактеріальних препаратів», «Методичних

рекомендацій з визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках» (розглянуто та затверджено Вченою радою Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, відповідно протокол № 1 від 27 лютого 2019 року та протокол № 1 від 24 лютого 2020 року). Розроблено паспорт на штам MRSA «22/22» та задепоновано в Державному науково-дослідному контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів з метою використання в якості тест-культури штам MRSA для внутрішньо лабораторного контролю якості мікробіологічних досліджень, для розроблення діагностикумів (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму в Депозитарії від 18.02.2019 р.).

Обсяг і структура дисертації. Дисертацію Козицької Тамари Григорівни викладено на 176 сторінках, ілюстровано 19 таблицями та 21 рисунком. Робота складається з анотацій, вступу, 4 розділів, висновків, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел налічує 214 найменування.

Вступ до дисертації присвячений обґрунтуванню важливості досліджень, пов'язаних з темою дисертаційної роботи.

Розділи і підрозділи власних досліджень дисертації викладені у чіткій послідовності, пов'язані один з одним, комплексно і конкретно розкривають наукову проблему. Всебічна обізнаність дисертантом проблеми є підставою для того, щоб стверджувати, що структура роботи, методичні підходи, проведені експериментальні дослідження та їх подальший аналіз зроблені цілком логічно й обґрунтовано.

Також слід відзначити аналітичний підсумок у кожному підрозділі дисертаційної роботи.

У **Розділі 1. Огляд літератури** (с. 24–47), викладений матеріал включає 5 підрозділів, які є достатньо інформативними та відображають обізнаність дисертантки з проблематикою, якій присвячена виконана дисертаційна робота.

У даному розділі викладений ретроспективний аналіз наукових літературних даних щодо формування систематики та з вивчення характерних властивостей стафілококів, в т. ч. *S. aureus*, за період з минулого століття до теперішнього часу.

Такий підхід допомагає глибше зрозуміти проблему стафілококових інфекцій у тварин, птиці і людини та пояснює сучасну систематику збудників стафілококових захворювань.

У означеному розділі приділено достатню увагу епізоотичній ситуації щодо інфекцій стафілококової етіології в Україні, оскільки останнім часом, за даними вчених, частота їх виявлення зростає, що стало поштовхом для здобувачки у виборі теми дисертаційної роботи.

Достатня увага була присвячена аналізу наукових даних щодо метицилінрезистентних стафілококів (*MRSA*), механізмам їхньої резистентності та методам їхнього виявлення, дисертантою було акцентовано увагу на нез'ясованих питаннях, зокрема частоті виявлення *MRSA* серед штамів *S. aureus*, одержаних із патологічного матеріалу від тварин, птиці, продукції тваринного походження та об'єктів довкілля в Україні.

Отже, за обраною темою дисертації здобувачкою проведено достатній за обсягом та фаховим аналізом наукових літературних даних.

У Розділі 2 Вибір напрямів дослідження, матеріали та методи досліджень (с. 48–60), чітко відображений науковий пошук дисертантки для досягнення поставленої мети і виконання завдань, що підтверджено вибором напрямку досліджень, добре продуманих та обґрунтованих, що склалися із 6 етапів їх проведення, де дисертанткою логічно та методично були обґрунтовані обрані методи досліджень та послідовність їхнього виконання.

Робота виконана упродовж 2014–2020 років на базі науково-дослідного бактеріологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи із застосуванням сучасного технічно перевіреного сертифікованого обладнання, діагностикумів.

Застосування загальноприйнятих, спеціальних та власних валідованих методик дало змогу виконати всі поставлені завдання.

Методи статистичної обробки одержаних результатів досліджень повністю забезпечили їхню достовірність.

Розділ 3 Результати власних досліджень (с. 61–133) займає основну частину дисертації та включає 8 підрозділів:

3.1. Аналіз результатів бактеріологічних досліджень проб патологічного та біологічного матеріалу від тварин щодо *S. aureus* на території України за період 2015–2019 рр. (ст. 61-72), в якому представлений аналіз результатів бактеріологічних досліджень та виділення ізолятів *S. aureus*, із патологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин (коней, великої і дрібної рогатої худоби, свиней, хутрових звірів) та птиці за період 2015 – 2019 рр.

3.2. Аналіз результатів бактеріологічних досліджень щодо контамінації продукції тваринного походження *S. aureus* за період 2015–2019 рр. (ст. 73-80), в підрозділі показані результати бактеріологічних випробувань на контамінацію *S. aureus* зразків сировини та продукції тваринного походження за період 2015 – 2019 рр., що надало можливість спостерігати за тенденцією до зниження мікробіологічної забрудненості збудником та поліпшення ситуації щодо безпечності харчових продуктів тваринного походження стосовно їхньої контамінації золотистими стафілококами за останній 5 років на території України.

3.3. Аналіз результатів бактеріологічних досліджень щодо контамінації об'єктів довкілля *S. aureus* в Україні за період 2015–2019 рр. (ст. 81-89), в підрозділі проаналізовано рівень контамінації золотистим стафілококом поверхонь об'єктів навколишнього середовища та підтверджується присутність негативного впливу людського фактору через порушення санітарно-гігієнічних вимог на виробництві: несвоєчасне прибирання і санації приміщень, дезінфекції інвентаря, обладнання та стін, порушення правил власної гігієни і несвоєчасне проведення медичного огляду працівників.

3.4. Особливості біологічних властивостей та діагностики польових ізолятів *S. aureus*, одержаних із патологічного й біологічного матеріалів від тварин, проб продукції тваринного походження та із проб, відібраних з об'єктів довкілля (ст. 89-100), у підрозділі розміщено аналіз результатів бактеріологічних досліджень патологічного, біологічного матеріалу тварин, зразків продукції тваринного походження і об'єктів довкілля з мікроскопією виготовлених препаратів, пофарбованих за методом Грама, та посівами на селективні для бактерій

роду *Staphylococcus* поживні середовища, вивченням характеру росту, виділенням чистих культур стафілококів для видової диференціації стафілококів, встановлена належність 39 дослідних ізолятів до виду *S. aureus*.

3.5. Визначення чутливості досліджуваних штамів *S. aureus* до антибактеріальних препаратів (ст. 100-109), в підрозділі викладено аналіз результатів досліджень з вивчення чутливості 39 дослідних штамів *S. aureus* до антибіотиків з виведенням антибіотикограм загального профілю, за якими встановлено належність штамів золотистого стафілококу до полірезистентних, мультирезистентних та таких, що чутливі до дії використаних антибактеріальних препаратів. Проведений аналіз щодо стійкості дослідних штамів *S. aureus* свідчить про небезпеку втрати їх подальшої ефективності за застосування у лікуванні людей і тварин від стафілококових інфекцій.

3.6. Виявлення метицилінрезистентних штамів *S. aureus* (MRSA) із патологічного і біологічного матеріалів від тварин, проб продукції тваринного походження і проб, відібраних із об'єктів довкілля (ст. 109-117), у підрозділі показані результати досліджень з визначення серед 39 дослідних штамів *S. aureus* метицилінрезистентних стафілококів (MRSA), які мають додатковий пеніцилінзв'язуючий білок: ПСБ2а або ПСБ2с, які кодуються генами *mecA* або *mecC*, що є набутими і чужорідними для *S. aureus*. Виявлено 21 штама (53,8 %) MRSA-штамів 53,8 %.

Крім того, представлені результати досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та підтверджено наявність гена *mecA* у 21 із 39 дослідних ізолятів *S. aureus*.

В підрозділі представлені результати досліджень *S. aureus* штаму «22/22», який за мікробіологічними характеристиками був задепонований у Депозитарії Державного науково-контрольного інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

3.7 Результати досліджень здатності до утворення біоплівки виявлення біоплівкоутворюючих властивостей штамів *S. aureus* (ст. 117-121), в підрозділі представлені результати досліджень з вивчення біоплівкоутворюючих властивостей у 7 мультиантибіотикорезистентних штамів MRSA, за аналізом яких високий рівень щільності сформованих біоплівок виявлений серед 57,1 % дослідних штамів

золотистого стафілококу, з середнім рівнем щільності – у 28,6 % та низьким рівнем щільності 14,3 % штамів дослідних культур, що вказує на високу небезпеку для здоров'я тварин та людини через присутність у харчовому ланцюзі *S. aureus* і можливість бути інфікованими стафілококовими збудниками, що мають властивості утворювати біоплівки, оскільки їм притаманна висока стійкість до несприятливих факторів навколишнього середовища.

3.8 Вивчення стійкості антибіотикорезистентних штамів *S. aureus* до дезінфікуючих засобів (ст. 122-131), в підрозділі викладені результати досліджень з виявлення стійкості бактерій *MRSA*-штамів до бактерицидної дії дезінфікуючих засобів із різним хімічним складом з метою подальшого вивчення і ймовірного виявлення спільних фенотипових механізмів резистентності, оскільки і антибіотики і дезінфікуючі засоби є антибактеріальними препаратами. Аналіз викладених у даному підрозділі результатів засвідчував відсутність бактерицидної дії у низьких концентраціях дезінфектанту.

У **Розділі 4 Аналіз і узагальнення результатів дослідження** (ст. 134-145), дисертанткою проведено детальний всебічний аналіз і обговорення одержаних результатів досліджень.

Матеріал розділу викладений послідовно, логічно, фахово, з порівнянням одержаних власних результатів досліджень з науковими даними інших вітчизняних та зарубіжних вчених, що свідчить про добре знання дисертанткою наукових публікацій з проблеми стафілококозів та проводить їх аналіз на достатньо фаховому та науковому рівнях.

Висновки (ст. 146-148) – на основі фактичного матеріалу, одержаного після проведення досліджень, дисертанткою зроблено 9 послідовних, логічних і детально проаналізованих висновків, які є результатом власних досліджень та відображають виконання поставленої мети і завдань щодо досліджень.

Пропозиції виробництву (ст. 149) представлені наявністю задепонованого *MRSA*-штаму «22/22» для внутрішнього лабораторного контролю якості

мікробіологічних досліджень, розроблення діагностикумів та використання в якості тест-культури (позитивного контролю) за дослідження *MRSA-штамів*.

Пропозиції виробництву представлені 3 методичними рекомендаціями для спеціалістів регіональних, міських, районних та міжрайонних, спеціалізованих державних лабораторій ветеринарної медицини, виробничих лабораторій господарств/підприємств, фахівців Держпродспоживслужби, слухачів факультетів післядипломного навчання, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів III–IV рівнів акредитації зі спеціальності «Ветеринарна медицина», що свідчить про велике практичне надбання за виконання такої дисертаційної роботи.

Список використаної літератури (ст. 150-176) нараховує 214 найменування. Використана література відповідає напрямку досліджень, застарілих джерел містить мало, що свідчить про обізнаність дисертантки щодо даних про сучасні наукові досягнення в даній галузі науки.

Додатки (ст. 177-212) – дисертанткою викладені матеріали досліджень у табличному варіанті; копії Свідоцтва про первісне депонування мікроорганізму в Депозитарії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів на штам *S. aureus* штаму «22/22»; Паспорт штаму мікроорганізму, який знаходиться у Банку штамів мікроорганізмів бактеріологічної лабораторії Державного науково-дослідного інституту лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДІЛДВСЕ); акти перевірки властивостей та випробувань означеного штаму.

Відповідність змісту автореферату основним положенням дисертації – автореферат в повному обсязі відображає основні положення дисертаційної роботи. Вступна частина, висновки та пропозиції виробництву є ідентичними у дисертації і рефераті.

У дисертаційній роботі на тему «Метицилінрезистентний стафілокок: поширення, біологічні властивості та діагностика», виконаної Козицькою Тамарою Григорівною, зміст і структура логічно і послідовно пов'язані. Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, є достатнім.

Аналіз матеріалу дисертації та автореферату свідчать про фахову та наукову підготовленість Козицької Тамари Григорівни до виконання наукової роботи такого рівня.

Дискусійні, критичні зауваження та запитання до дисертанта.

Незважаючи на високу теоретичну, наукову та практичну цінність одержаних результатів за проведених досліджень, є деякі зауваження щодо викладу матеріалів у дисертаційній роботі та окремі запитання, котрі потребують пояснення та відповіді дисертантки.

Зауваження:

1. У розділі 1 «Огляд літератури», на с. 26 в табл. 1.1 всупереч «Переліку умовних скорочень» назву роду *Staphylococcus* скорочено до «*St.*» замість «*S.*».

2. У розділі 2 «Вибір напрямів дослідження, матеріали та методи досліджень» щодо першого та другого етапів досліджень – в описі в обох випадках повторюється методика виділення ізолятів *S. aureus*. Ймовірно, у другому етапі досліджень мали на увазі вже ідентифікацію ізолятів *S. aureus*.

3. У розділі 2 «Вибір напрямів дослідження, матеріали та методи досліджень» у схемі (рис. 2.1 на с. 49) відсутній 5 етап досліджень, присвячений експериментам з виявлення у штамів *S. aureus* здатності до формування біоплівки, хоча в описі етапів і дисертаційній роботі цей матеріал присутній.

4. У розділі 3 «Результати власних досліджень» щодо задепонованого *MRSA*-штаму «22/22» відсутні дані результатів скринінгу із цефокситіном, як основним чутливим високоспецифічним маркером бета-лактамів. Вами цей штам охарактеризований лише як мультиантибіотикорезистентний.

5. У розділі 3 «Результати власних досліджень» на ст. 72, 80, 89, 109, 117, 121, 131 написано «... результати цього розділу були опубліковані...», варто писати «...результати досліджень, викладені у цьому розділі, були опубліковані...».

6. У розділі 3 «Результати власних досліджень» по всьому тексту викладених матеріалів зустрічається недоречна фраза «...*S. aureus* виділявся...», варто писати «...*S. aureus* виділяли...»;

7. В тексті дисертаційної роботи зустрічаються окремі граматичні помилки технічного характеру (опечатки), русизми.

Запитання:

1. Як виготовляли бактеріальні суспензії *S. aureus* для проведення тестувань на чутливість до антибіотиків, за яким стандартом, яка концентрація клітин у такому стандарті (КУО/см³)?
2. Чим відрізняються полі- та мультирезистентні штами *S. aureus*?
3. Під час проведення досліджень з виявлення здатності штамів *S. aureus* до формування біоплівки, які тестові культури Ви використовували як позитивний і негативний контроль і чому?
4. Чому для вивчення бактерицидної дії дезінфектантів із різним хімічним складом як позитивний контроль Вами використана тестова культура *S. aureus* ATCC 6538?
5. Який механізм дії має цефокситін щодо *S. aureus*, оскільки він є високоспецифічним бета-лактамним маркером?
6. На Вашу думку, чи доречно використовувати антибіотики оксацилін (метицилін) для виявлення штамів *MRSA*? Чи достовірні результати можна отримати?
7. За виявлення метицилінрезистентних штамів *S. aureus* як контроль якості проведених досліджень Ви використовували тестову культуру *S. aureus* NCTC 12493. Чому саме цю культуру?

Публікації основних результатів дисертації. Основні положення дисертації викладено в 11 наукових працях, з яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази даних Web of Science, 3 методичні рекомендації, 2 тези наукових доповідей.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Все вище викладене дає підстави стверджувати, що незважаючи на зауваження, дисертаційна робота Козицької Тамари Григорівни заслуговує позитивної оцінки. Дисертаційна робота є завершеною науковою працею з логічно і послідовно викладеним матеріалом згідно з поставленими задачами.

Проаналізувавши дисертаційну роботу і автореферат, вважаю, що за актуальністю, новизною, обґрунтованістю одержаних результатів і положень, практичною значимістю дисертаційна робота Козицької Т.Г. *«Метицилінрезистентний стафілокок: поширення, біологічні властивості та діагностика»* відповідає вимогам п.11 Порядку присудження наукових ступенів щодо кандидатських дисертацій, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 24 липня 2013 р. № 567, а її автор заслуговує на присудження наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія».

12 квітня 2021 р.

Офіційний опонент, доктор ветеринарних наук,
старший науковий співробітник,
заступник директора з наукової роботи
Державного науково-дослідного контрольного
Інституту ветеринарних препаратів
та кормових добавок



В.П. Музика