

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу Рубленко Наталії Михайлівни «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» представленій на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук до спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за спеціальністю 16.00.03 – «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія».

Актуальність теми дисертації. Нині птахівництво – одна із найбільш потужних галузей аграрного виробництва. Основним інфекційним агентом, що спричинює контамінацію продукції птахівництва, є бактерії роду *Salmonella*, а їх джерелом здебільшого є корми та хвора птиця.

За моніторингу епізоотичної ситуації в птахогосподарствах та дослідженні біологічного матеріалу птиці найчастіше виділяють серовари, що належать до виду *enterica: Gallinarum, Pullorum, Typhimurium, Enteritidis, Infantis, Virchow*.

В Україні впродовж 10 років зберігається тенденція збільшення циркуляції сероварів *Salmonella Enteritidis*, так у 2015 році частка цих сальмонел, виділених з патологічного матеріалу, становила 5,9 %. Збудники пулорозу і тифу птиці досі є одними з найпоширеніших ізолятів сальмонел.

В Україні з 2016 року діє Інструкція з профілактики та ліквідації сальмонельозу птиці, узгоджена із директивами МЄБ. Відповідно до цього, постановка діагнозу здійснюється за виділення чистої живої культури бактеріологічними методами, а додатковими методами є імуноферментний та полімеразна ланцюгова реакція. Остання використовується і для вивчення властивостей штамів сальмонел. Низкою досліджень виявлено окремі генетичні детермінанти транспорту бактеріальних білків, синтезу систем кислотного і теплового шоку та протидії фагоцитозу. Однак, в Україні такі дослідження є поодинокими.

Отже, моніторинг, детекція та вивчення молекулярно-генетичних профілів і факторів патогенності штамів сальмонел, що виділяють на території України з патологічного і біологічного матеріалів та за контролю продукції птахівництва, є актуальними, оскільки це дасть змогу розробити новітні засоби діагностики і профілактики сальмонельозу птиці для його контролю та забезпечення громадського здоров'я.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано згідно з науково-дослідними роботами «Удосконалення системи підтримання та розширення колекції Національного центру штамів

мікроорганізмів» (номер державної реєстрації 0116U007116, 2015–2016 рр.) та «Розробка засобів та методів контролю і стандартизації ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) та мікробіологічних досліджень» (номер державної реєстрації 0109U001083, 2017–2019 рр.), у якій здобувачем виконано розділ «Розробка системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі».

Наукова новизна роботи полягає в тому, що автором проведено моніторинг поширеності сальмонел птиці в Україні за період 2006–2019 рр. в Україні. 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 Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів. Здобувачем доведено, що у всіх досліджених штаммах наявний ген *invA*, експресія якого забезпечує інвазію в епітеліальні клітини тонкого кишечника, зумовлюючи патогенність сальмонел.

Здобувачем встановлено наявність генів, які є основним елементом механізму експресії факторів адгезії у сальмонел. Також здійснено ідентифікацію репліконів плазмід різних груп несумісності: *pFIA*, *pN*, *pFIIA*. Доведено, що 21 % польових штамів містить реплікони плазмід двох груп, тимчасом у решти – лише один реплікон.

Рубленко Наталія Михайлівна встановила наявність хромосомних генетичних детермінант антибіотикорезистентності: ген *tetG* (резистентність до тетрацикліну), ген *sulI* (резистентність до сульфаніламідів) та консервативну ділянку інтегрону, яка є місцем інтеграції генів резистентності до антибактеріальних препаратів.

Здобувачем розроблено мультиплексну систему для виявлення генетичного матеріалу *Salmonella* та диференціації сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium* методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що автором впроваджено у практику ветеринарної медицини нові молекулярно-генетичні методи контролю циркуляції збудників сальмонельозу та удосконалена система контролю за антибіотикорезистентністю бактерій в Україні.

Здобувачем розроблено та впроваджено в практику ветеринарної медицини «Методичні рекомендації з індикації та диференціації бактерій роду *Salmonella* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції».

Матеріали дисертаційної роботи здобувача використовуються у навчальному процесі під час вивчення дисциплін «Ветеринарна мікробіологія

та імунологія», «Епізоотологія та інфекційні хвороби» та «Епізоотологія і система діагностичних процедур» та у наукових дослідженнях (Національний університет біоресурсів і природокористування, Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, Білоцерківський національний аграрний університет, Дніпровський державний аграрно-економічний університет, Поліський національний університет, Інститут післядипломного навчання керівників і спеціалістів ветеринарної медицини БНАУ, Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи Держпродспоживслужби України).

Структура роботи, обґрунтованість та достовірність результатів досліджень, заключень та висновків дисертанта. Основний зміст дисертації викладений на 201 сторінці комп'ютерного тексту та ілюстрований 16 таблицями і 37 рисунками. Робота складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів виконання роботи, результатів експериментальних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків та пропозицій виробництву, списку використаних джерел та додатків. Список використаних джерел включає 416 найменувань, у тому числі 387 латиницею.

У розділі 1 «ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ» в логічній послідовності викладений науковий матеріал, який присвячений епізоотологічним особливостям сальмонельозу птиці, біологічним властивостям збудника, ролі факторів патогенності і їх генетичній детермінації та лабораторній діагностиці сальмонельозу птиці.

Узагальнені літературні дані переконали дослідника зосередити увагу на вивченні обраної ним теми досліджень.

Розділ 2 «ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ВИКОНАННЯ РОБОТИ» здобувач розділив на декілька підрозділів у яких окремо наведено детальну інформацію щодо схем дослідів та методів досліджень.

Розділ 3 «РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ». Даний розділ можна розділити на шість основних частин.

У першій частині представлено результати моніторингу розповсюдження сальмонел в Україні за період з 2006 по 2019 роки. За підсумком аналіз виділення сальмонел на території України в період 2006 – 2019 років вказує на зменшення розповсюдження сальмонел на території України.

У другій частині цього розділу наведено результати виділення ізолятів виду *Salmonella enterica* та визначення серотипу в реакції аглютинації за

схемою Вайта-Кауфмана. За результатами досліджень встановлено, що сформована вибірка ізолятів сальмонел відображає стан епізоотичної ситуації із сальмонельозу в Україні та є актуальним об'єктом для дослідження.

Третя частина містить інформацію щодо детекції генів, що кодують фактори патогенності. Під час проведення вказаних досліджень методом полімеразної ланцюгової реакції проведено ідентифікацію генів, що кодують фактори патогенності: інвазія (*invA*), адгезія (*agfB*, *sefA*), ендотоксини (*prt*), колонізація (*sopE*, *gipA*, *sodC1*). Ідентифіковано гени резистентності до тетрациклінів (*tetG*), сульфаніламідів (*sulI*) та інтегрон *In104* – мобільний генетичний елемент, що у сальмонел локалізується на хромосомі.

У четвертій частині наведено результати визначення чутливості сальмонел до антибактеріальних препаратів. Дисертантом було визначено чутливість до антибактеріальних препаратів класу β-лактамів, аміноглікозидів, інгібіторів дигідрофолатредуктази, феніколів та хінолонів.

П'ята частина містить інформацію про індукцію помірних фагів з використанням Мітоміцину С. В результаті проведених досліджень було ідентифіковано гени помірних бактеріофагів, які кодують фактори колонізації: *gipA*, *sopE*, *sodC1*.

У шостій частині наведено результати розробки системи діагностики сальмонельозу методом полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Дисертантом розроблено мультиплексну систему для ідентифікації роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium*, що має високу специфічність та аналітичну чутливість.

У розділі 4 «АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ» автор змістовно та об'єктивно аргументує накопичені ним експериментальні та наукові факти, порівнюючи їх з результатами досліджень інших науковців.

Апробація результатів досліджень, повнота їх викладення в опублікованих працях, достовірність і обґрунтованість наукових положень, висновків, рекомендацій. Основні матеріали дисертації доповідались, обговорювалися та отримали позитивну оцінку на науковому симпозиумі в межах концепції «Єдине здоров'я» (м. Київ 2016, 2017 рр.), на науково-практичній конференції «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Біла Церква, 2019 р.).

Основні положення дисертаційної роботи опубліковано у 10 наукових працях, з яких 6 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, 1 методичні рекомендації, 3 тези наукових доповідей.

Наукові положення, висновки викладені у дисертації співставленні з даними літературних джерел і базуються на результатах власних досліджень, які виконані на достатньому експериментальному матеріалі з використанням сучасних методів досліджень. Отримані дані оброблені статистично і їх достовірність не викликає сумніву.

Результати досліджень узагальнені у десяти висновках.

Дисертація та автореферат написані державною мовою, грамотно, логічно, оформлені згідно чинних вимог. Зміст автореферату і основні положення дисертації є ідентичними та відображають основні положення роботи, висновки ідентичні та відповідають отриманим даним.

Оцінюючи позитивно дисертаційну роботу Рубленко Наталії Михайлівни вважаю за необхідне висловити деякі зауваження та дискусійні питання, а також вказати на виявлені окремі недоліки:

1. Вами наведені дані що в Україні впродовж 2006–2019 рр. відбулося поступове зниження частоти виявлення сальмонел серед свійських тварин, зокрема птиці. Які на Вашу думку основні причини цього?

2. Вами під час ідентифікації генів факторів патогенності та факторів, що можуть підвищувати вірулентність у сальмонел, виділених від свійської птиці та колекції Національного центру штамів ДНКІБШМ, було ідентифіковано ген резистентності до тетрацикліну – *tetG* та ген резистентності до сульфаніламідів – *sulI*, чи визначались Вами гени резистентності до інших груп антибіотиків?

3. Поясніть чому під час проведення індукції помірних бактеріофагів Ви використовували саме «Мітоміцин С»?

4. За результатами досліджень Вами встановлено, що впродовж 2017–2019 років у серологічній структурі сальмонел домінували серовари *Enteritidis*, *Typhimurium* та *Gallinarum*. Чому Вами розроблено мультиплексну систему для ідентифікації роду *Salmonella* та сероварів *Enteritidis* і *Typhimurium*, без змоги ідентифікації серовару *Gallinarum*, адже він також є домінуючим у структурі збудників сальмонельозу?

5. Чи планується Вами реєстрація створеної ПЛР тест-системи?

Відзначені недоліки в жодному разі не знижують загальної позитивної оцінки дисертації, а поставлені запитання носять уточнюючий та дискусійний характер.

Висновок

Дисертаційна робота **Рубленко Наталії Михайлівни** на тему «Детекція факторів патогенності у бактерій *Salmonella spp.* в полімеразній ланцюговій реакції» являє собою завершену наукову працю і за своїм рівнем та практичною цінністю, змістом і оформленням повністю відповідає вимогам Порядку присудження наукових ступенів, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 567 від 24 липня 2013 року (зі змінами та доповненнями), щодо дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія».

На підставі цього вважаю, що **Рубленко Наталія Михайлівна** заслуговує присудження наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – «Ветеринарна мікробіологія, епізоотологія, інфекційні хвороби та імунологія».

Офіційний опонент:

**доктор ветеринарних наук, професор,
старший науковий співробітник
науково-дослідного епізоотологічного
відділу ДНДІЛДВСЕ**

В. В. Уховський

**Підпис старшого наукового співробітника науково-дослідного
епізоотологічного відділу ДНДІЛДВСЕ Уховського В.В. засвідчую:**

Начальник відділу кадрів

Мороз Л.В.

05.04.2021

