

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертаційну роботу **Вішована Юрія Юрійовича** на тему: **«Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* та розробка засобів їх індикації»** подану на здобуття ступеня доктора філософії з галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» та спеціальності 211 «Ветеринарна медицина»

Актуальність теми дисертації. У вивченні стафілококів постають вагомі питання набуття ними широкої стійкості до антимікробних речовин. У коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів виділених від різних тварин зустрічається феномен полірезистентності до антибіотиків різних груп. Резистентні стафілококи виділені зі слизових оболонок та шкіри різних видів диких і особливо домашніх тварин (собак і котів) несуть у собі загрозу можливості їх передачі до інших тварин та людей. Вагомим фактором формування стійкості до антимікробних речовин у стафілококів є захисний механізм утворення біоплівки. Біоплівка захищає їх як від дії антибіотиків так і від дії дезінфектантів і мийних засобів. Утворення біоплівки зумовлює бактеріальне обсіменіння молокопроводів, катетерів, та ендопротезів.

Матеріали дисертаційної роботи є складовою частиною науково-дослідних робіт Української лабораторії якості та безпеки продукції АПК Національного університету біоресурсів і природокористування України: «Науково-експериментальне обґрунтування моніторингу антибіотикорезистентності у мікроорганізмів – контамінантів продукції АПК в межах концепції «Глобальне здоров'я» (номер державної реєстрації 0117U000511, 2017–2018 рр.); «Науково-експериментальне обґрунтування молекулярно-генетичного скринінгу збудників, які передаються з продуктами харчування (*Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*)» (номер державної реєстрації 0118U002547, 2018–2020 рр.), «Вивчення феномену біоплівкоутворення та антибіотикорезистентності у мікроорганізмів для розробки молекулярно-генетичних засобів діагностики емерджентних зооозів» (номер державної реєстрації 0122U001762, 2022–2023 рр.).

Наукова новизна роботи полягає в отриманні нових даних про представників коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів, які володіють здатністю до утворення біоплівок, будучи носіями генів утворення біоплівки (*ica A*, *ica D*, *ica AB*), а також за відсутності даних генів. До того ж дані стафілококи володіють в різній мірі генами, які є носіями стійкості до метициліну та інших β-лактамних антибіотиків (*mec A* та гену *fet B*), що сприяє підвищенню антибіотикостійкості.

Експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соєвий бульйон для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Наукова новизна підтверджена деклараційними патентами на корисні моделі № 141004 та № 141068.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів полягає у поглибленні сучасних знань про утворення біоплівки, а також поширення феномену антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів роду *Staphylococcus*, виділених з різних біологічних ніш, яке має на меті сприяти подальшій розробці і впровадженню нових і більш дієвих засобів діагностики та схем терапії і профілактики інфекційних захворювань тварин і людини.

У результаті дослідження мікроорганізмів роду *Staphylococcus*, було задепоновано штам *Staphylococcus aureus*, що володіє здатністю до утворення біоплівки та стійкістю до метициліну № St 2017/1 (Свідоцтво про первинне депонування штаму мікроорганізму № «767» в Депозитарії Державного науково-дослідного контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів від 16.12.2020 р.), що дозволяє використовувати цей штам для потреб лабораторної діагностики та біотехнології.

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розробки проєкту нормативних документів (реєстраційного досьє) для реєстрації в Україні: «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР», для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції» (схвалено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК протокол № 14 від 14.12.2020 р.) та методичних рекомендацій «Спосіб виготовлення стандартних зразків антигенів збудників харчових зоонозів» (Затверджено Вченою радою Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК, протокол № 13 від 27.11.2019 р.). Результати роботи було впроваджено в навчальному процесі за спеціальністю 211 «ветеринарна медицина» при викладанні дисциплін епізоотологія та ветеринарна мікробіологія в Одеському державному аграрному університеті кафедри епізоотології, а також впроваджені в науково-дослідну роботу щодо діагностики бактеріальних зоонозів в Державному науково-дослідному контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Структура роботи, обґрунтованість та достовірність результатів досліджень, заключень та висновків дисертанта. Проаналізувавши матеріал дисертації, необхідно відмітити наступне: наукові положення, висновки та рекомендації дисертації обґрунтовані й узагальнені, впливають з результатів досліджень. Дисертація складається з анотації, вступу, огляду

літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу і узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, що включає 239 джерел, з них 208 латиницею та додатків. Дисертацію викладено на 186 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстровано 21 таблицею та 15 рисунками.

У розділі 1 «Огляд літератури» відображено науковий пошук дисертанта, автор на основі опрацьованих ним джерел літератури виклав науковий матеріал, щодо інформації про біологічні властивості *Staphylococcus* spp., та молекулярно-генетичні засоби дослідження стафілококів.

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» дає уявлення про загальну схему досліду, здобувач розділив даний розділ на декілька підрозділів у яких окремо наведено детальну інформацію щодо матеріалів досліджень, зокрема вивчення здатності до формування біоплівки та молекулярно-генетичних досліджень.

Розділ 3 «Результати власних досліджень». Даний розділ здобувачем розділено на шість частин.

У першій частині автором наведені дані щодо аналізу поширення стафілококів у світі, клінічного прояву хвороб стафілокової етіології у різних видів тварин і людини що пов'язано з частотою виділення стафілококів з множинною стійкістю до антибіотиків і здатністю до формування біоплівки, як загрози поширення їх серед тварин і людей.

У другій частині детально представлено результати щодо бактеріологічних досліджень виділених культур стафілококів. Так, в результаті проведення дослідження культуральних та біохімічних властивостей з'ясовано, що виділені ізоляти мікроорганізмів володіли типовими для представників роду *Staphylococcus* культурально-морфологічними властивостями і проявляли свої специфічні властивості (коагуляція плазми, гемоліз).

Отримані результати дають підстави стверджувати про високий патогенний потенціал стафілококів в етіології гнійно-запальних захворювань у тварин і людей.

У третій частині даного розділу наведений автором аналіз чутливості до антибіотиків засвідчує, що серед досліджених стафілококів значна їх частина припадає на резистентні до двох і більше антибіотиків. Що в свою чергу показує високий рівень стійкості даних стафілококів до досліджуваних антимікробних речовин.

У четвертій частині наведено аналіз одержаних результатів дослідження фенотипового (тобто за використанням бактеріологічного способу визначення) прояву біоплівкоутворення. Результати дослідження

показали, що виділені і досліджені стафілококи з різних об'єктів володіють різними рівнями щільності формування біоплівки. У даному випадку найбільшим відсотком здатності до формування щільної біоплівки володіють стафілококи виділені від свиней, тварин-компаньйонів та від людей.

П'ята частина дисертаційної роботи присвячена молекулярно-генетичним дослідженням бактерій роду *Staphylococcus* виділених з різних об'єктів. Отримані при цьому результати засвідчили, що найбільшою наявністю дослідних генів володіли стафілококи виділені від людей; потім стафілококи виділені від корів і тварин компаньйонів. У перелік дослідних генів входять, як гени які беруть участь у формуванні біоплівки, так й ті, які відповідають за стійкість до β -лактамних антибіотиків.

У шостій частині здобувач описує порівняння різних поживних середовищ для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів. Доведено ефективність застосування серцево-мозкового бульйону BHI Broth, (HiMedia, India) (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³).

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розробки проєкту нормативних документів (реєстраційного досьє) для реєстрації в Україні «Набору діагностичного «STAPHYLOCOCCUS AUREUS-ПЛР» для виявлення здатності до утворення біоплівки та стійкості до метициліну бактерій виду *Staphylococcus aureus* методом полімеразної ланцюгової реакції».

У розділі 4 «Аналізу і узагальнення результатів досліджень» дисертант узагальнює одержані результати експериментальних досліджень і аргументує отримані ним результати, порівнюючи їх з результатами досліджень інших науковців.

Апробація результатів досліджень, повнота їх викладення в опублікованих працях, достовірність і обґрунтованість наукових положень, висновків, рекомендацій. Основні положення дисертації були обговорені й схвалені на науково-практичній конференції молодих дослідників «Молодь і сучасні проблеми мікробіології і вірусології» (м. Київ, 2019 р.); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2019р); Науково-практичній конференції «COVID-19 та інші інфекційні захворювання у дітей та дорослих. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2020 р.); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні інфекційні захворювання. Сучасні аспекти клініки, діагностики, лікування та профілактики» (м. Київ, 2020 р.); Міжнародній науково-практичній

конференції «World Microbe Forum» (USA, 2021 р.); 2-ому «Міжнародному симпозіуму зі зменшення біологічної загрози (IBTRS)» (м. Київ, 2022 р.).

Основний зміст дисертаційної роботи опубліковано в 13 наукових працях, у тому числі 6 статей, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у періодичних наукових виданнях інших держав; 2 патенти на корисну модель; 1 методичні рекомендації та 4 тези та матеріали наукових конференцій.

Під час ознайомлення з текстом дисертації порушень академічної доброчесності не виявлено. Використання текстових запозичень без відповідних посилань на інформаційні джерела не зафіксовано.

Дискусійні положення й зауваження до дисертації. Оцінюючи позитивно дисертаційну роботу Вішвана Ю.Ю. вважаємо за необхідне висловити деякі зауваження та дискусійні питання:

1. Чим аргументований Вами вибір об'єктів досліджень (молоко, собаки коти, свині, людина)?
2. Чи враховувався Вами відсоток виділення стафілококів з доїльного обладнання, яку величину він становив?
3. Як Ви можете пояснити різницю між високою оптичною щільністю утворення біоплівки у стафілококів виділених з різних об'єктів і наявністю дослідних генів?
4. Який відсоток складали стійкі до інших антибіотиків окрім β -лактамних стафілококи виділені з різних об'єктів?
5. Які фактори, що сприяють утворенню біоплівки Ви можете навести?
6. Які конкретно засоби і кроки Ви можете запропонувати для покращення подальших досліджень?
7. У чому на Вашу думку полягає профілактика інфекцій стафілококової етіології серед тварин і людей?
8. Які ще мікроорганізми були виділені паралельно з стафілококами і чи володіли вони стійкістю до антимікробних речовин і здатністю до утворення біоплівки?
9. Які механізми стійкості до антибіотиків у стафілококів Вам відомі?
10. Чи проводилися Вами дослідження дії мийних і дезінфікуючих засобів на біоплівки?
11. Як Ви можете пояснити високий відсоток стійких до різних антибіотиків стафілококів виділених від свиней?
12. У тексті роботи зустрічаються невдалі вирази, помилки, які очевидно пов'язані з комп'ютерним набором тексту.

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

Висновок

Дисертаційна робота Вішована Юрія Юрійовича «Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* та розробка засобів їх індикації» оформлена згідно з наказом Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», є завершеною науково-дослідною роботою, яка за актуальністю, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів повністю відповідає вимогам, що передбачені Порядком присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України № 44 від 12 січня 2022 року, а її автор є гідним присудження освітньо-наукового ступеня доктора філософії галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Офіційний опонент:

виконуючий обов'язки
завідувача кафедри харчової
біотехнології і хімії
Тернопільського
національного технічного
університету імені І. Пулюя,
д.вет.н., професор



Микола КУХТИН

Підпис Миколи
КУХТИНА засвідчую:
проректор з наукової роботи
Тернопільського
національного технічного
університету імені І. Пулюя,
д.тех.н., професор



Павло МАРУЩАК