

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **ВІШОВАНА Юрія Юрійовича**
на тему: **«Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus*
та розробка засобів їх індикації»**,
подану на здобуття ступеня доктора філософії
зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина»

Актуальність теми дисертації. Одними з найбільш поширених мікроорганізмів у світі є стафілококи, для яких характерним є різноманітна локалізація – від шкірних покривів до поверхні слизової оболонки людини та тварин. Стафілококова інфекція, переважно, характеризується наявністю гнійно-запальних вогнищ та інтоксикацією макроорганізму. При цьому патогенез стафілококової інфекції залежить від екзогенного або ендогенного характеру інфікування та імунного статусу сприятливого організму.

У великої рогатої худоби, овець і кіз стафілококи уражують молочну залозу, шкіру, статеві органи, що призводить до зниження продуктивності та вибракування тварин. У птиці стафілококи викликають хвороби з гострим або хронічним перебігом, що проявляються у вигляді артрити, синовіту, дерматиту, синуситу, клоациту та запалення сережок. У собак і котів захворювання, що викликаються мікроорганізмами з роду *Staphylococcus*, проявляються ураженням шкіри і слизових оболонок у формі фурункулів, піодермії, пустул, а також отиту.

Важливим фактором поширення стафілококів та резервуаром для їх передачі слугують контаміновані продукти рослинництва, тваринництва, предмети догляду і медичні інструменти. У довкілля стафілококи потрапляють від хворих тварин і людей та клінічно-здорових носіїв. Важливою властивістю всіх стафілококів є їх здатність до утворення біоплівки, яка утворюється на внутрішніх стінках молокопроводів і формує постійне джерело бактеріального обсіменіння молока.

Досліджуючи стійкість до сучасних антимікробних речовин у стафілококів гостро постає питання профілю їх резистентності. Для дослідження основних властивостей золотистого стафілококу застосовують цілий арсенал молекулярно-діагностичних методів досліджень, які потребують постійного удосконалення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Матеріали дисертації 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 зоонозів» (номер державної реєстрації 0122U001762, 2022–2023 рр.).

Наукова новизна роботи полягає в отриманні нових даних щодо культурально-морфологічних, ферментативних та біохімічних властивостей бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з молока хворих на мастит корів, від свиней, котів, собак та людей. Вивчено чутливість виділених стафілококів до 21 антибіотика представника 9 груп. Охарактеризовано за показником оптичної щільності здатність до утворення біоплівок дослідженими ізолятами стафілококів. Автором встановлено, що незалежно від джерела виділення представники як коагулазопозитивних, так і коагулазонегативних стафілококів, проявляють стійкість

до антибіотиків та утворення біоплівки, а також є носіями генетичних детермінант патогенності, зокрема генів: носія стійкості до метициліну та інших β -лактамних антибіотиків *mec A* та гену *fem B* що сприяє підвищенню стійкості, та генів утворення біоплівки (*ica A*, *ica D*, *ica AB*). Експериментально обґрунтовано застосування культуральних середовищ серцево-мозковий бульйон та триптон-соевий бульйон для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів полягає у поглибленні сучасних знань про культурально-морфологічні, ферментативні властивості, здатності до коагуляції плазми, гемолізу еритроцитів та утворення біоплівки, а також поширення феномену антибіотикорезистентності серед мікроорганізмів роду *Staphylococcus*, виділених з різних біологічних ніш, що сприятиме розробленню ефективних засобів діагностики та схем терапії і профілактики інфекційних захворювань тварин і людини.

На підставі проведеного вивчення біологічних властивостей ізолятів мікроорганізмів роду *Staphylococcus* 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-контрольного інститут 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 розроблення проекту 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 при викладанні дисциплін епізоотологія та ветеринарна мікробіологія в Одеському державному аграрному університеті, а також в науково-дослідну роботу щодо діагностики бактеріальних зоонозів в Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Структура роботи, обґрунтованість та достовірність результатів досліджень, заключень та висновків дисертанта. 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, ілюстровано 21 таблицею та 15 рисунками.

У розділі 1 «Огляд літератури» в логічній послідовності викладено науковий матеріал, який присвячено інформації щодо біологічних властивостей *Staphylococcus* spp., комплексу хвороб стафілокової етіології у тварин і людини, чутливості до антибіотиків у мікроорганізмів роду *Staphylococcus*, токсигенних властивостей стафілококів, феномену формування біоплівки у стафілококів, молекулярно-генетичних засобів дослідження стафілококів.

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

Розділ 2 «Матеріали і методи досліджень» здобувач розділив на декілька підрозділів, у яких окремо наведено детальну інформацію щодо матеріалів досліджень, а також методів досліджень, які містять інформацію щодо загальновизнаних методик проведення бактеріологічних (культурально-морфологічні, ферментативні, біохімічні, визначення чутливості до антибактеріальних препаратів, вивчення здатності до формування біоплівки) та молекулярно-генетичних (підтвердження наявності дослідних генів *mec A*; *fem B*; *ica A*; *ica D*; *ica AB* методом полімеразної ланцюгової реакції) досліджень.

Розділ 3 «Результати власних досліджень». Даний розділ можна розділити на шість основних частин.

У першій частині наведено дані щодо аналізу поширення стафілококів у світі. Обґрунтовано, що частота виділення патогенних і стійких до антибіотиків стафілококів представляє серйозну загрозу цього патогена для тварин і людей.

У другій частині детально представлено результати щодо бактеріологічних досліджень виділених культур стафілококів. Так, вивчено культурально-морфологічні, ферментативні та біохімічні властивості бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з молока хворих на мастит корів, свиней, тварин-компаньйонів та людей. В результаті проведення дослідження культуральних та ферментативних властивостей з'ясовано, що виділені ізоляти мікроорганізмів володіли типовими для представників роду *Staphylococcus* культурально-морфологічними властивостями і проявляли свої специфічні властивості (коагуляція плазми, гемоліз). Результатом проведення культурально-морфологічних досліджень стафілококів, виділених від людей, стало виявлення того факту, що більше половини (57,9 %) володіють здатністю до коагуляції плазми та гемолізу. Це, в свою чергу, свідчить про їх високий патогенний потенціал в можливій комбінації з антибіотикорезистентністю та утворенням біоплівки в етіології гнійно-запальних захворювань у людей і тварин.

У третій частині даного розділу наведено результати з визначення чутливості до антибактеріальних речовин мікроорганізмів роду *Staphylococcus* виділених з різних об'єктів. Аналіз проведених досліджень чутливості до антибіотиків засвідчив, що серед досліджених культур виділених стафілококів значна їх частина припадає на резистентні до двох і більше антибіотиків. Отримані дані свідчать про високий рівень стійкості даних стафілококів до досліджуваних антимікробних речовин.

В четвертій частині розділу представлено результати вивчення здатності до біоплівкоутворення у *Staphylococcus spp.*, виділених з різних об'єктів. Аналіз одержаних результатів дослідження фенотипового (тобто за використанням бактеріологічного способу визначення) прояву біоплівкоутворення показав, що виділені і досліджені стафілококи з різних об'єктів володіють різними рівнями щільності формування біоплівки. В даному випадку найбільшим відсотком здатності до формування щільної біоплівки володіють стафілококи, виділені від свиней, тварин-компаньйонів та від людей.

П'ята частина дисертації присвячена молекулярно-генетичним дослідженням бактерій роду *Staphylococcus*, виділених з різних об'єктів. Отримані при цьому результати засвідчили різну кількість наявності дослідних генів серед різних стафілококів, виділених з досліджуваних об'єктів. Найбільшою наявністю дослідних генів володіли стафілококи, виділені від людей, потім стафілококи, виділені від корів і тварин компаньйонів.

У шостій частині даної дисертації описано дослідження ефективності культуральних середовищ для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення їх біомаси з метою виготовлення стандартних антигенів. Отримані результати вказують на те, що за однократного пересіву на різних культуральних середовищах було отримано біомаси досліджуваних культур у вихідному титрі $\times 10^9$. Найбільш високу продуктивність

у відновлених культур було отримано за застосування Серцево-мозкового бульйону ВНІ Broth, (HiMedia, India) (концентрацію живих мікробних клітин у дослідних культур реєстрували $6,4 \times 10^9$ КУО/см³). Продуктивність культури *Staphylococcus aureus* за застосування МПБ з 5 % сироватки крові коня та 0,5 % глюкози, МПБ з 5 % сироватки крові великої рогатої худоби та 0,5 % глюкози, ТСБ була нижчою на 64 %, 69 та 36 % відповідно.

Результати досліджень стали науковим підґрунтям для розроблення проекту 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».

В розділі 4 «Аналізу і узагальнення результатів досліджень» автор змістовно, послідовно, 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 положення дисертації було обговорено й схвалено 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, 2019 р.); 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» (США, 2021 р.); II «Міжнародному симпозиуму зі зменшення біологічної загрози (IBTRS)» (м. Київ, 2022 р.).

Основний зміст дисертації опубліковано в 13 наукових працях, з яких 4 статті у наукових фахових виданнях України, 2 статті у наукових виданнях інших держав, 2 патенти України на корисні моделі, методичні рекомендації та 4 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 узагальнено у семи висновках.

Дисертація написана державною мовою, грамотно, логічно, оформлена згідно чинних вимог, висновки відповідають отриманим даним.

Оцінюючи позитивно дисертацію Ю. Ю. Вішована вважаємо за необхідне висловити деякі ***зауваження та дискусійні питання***:

1. Чим аргументований Ваш вибір антимікробних препаратів, до яких Ви визначали чутливість виділених мікроорганізмів?

2. Підрозділ 3.1 «Аналіз поширення стафілококів потенційних патогенів – збудників зооантропонозів» містить інформацію, яку необхідно наводити у розділі 1 «Огляд літератури».

3. Поясніть механізм набуття антибіотикорезистентності у стафілококів.

4. Чому виділені і досліджені стафілококи з різних об'єктів володіють різними рівнями щільності формування біоплівки?

5. Чи встановлено Вами різницю у кількості виділених стафілококів з молока корів, хворих на мастит, залежно від характеру перебігу патології?

6. Які ще мікроорганізми Ви виділяли поряд зі стафілококами, яка їх відсоткова складова?

7. Чим можна пояснити різну кількість дослідних генів серед виділених стафілококів?

8. Яка економічна ефективність застосування культуральних середовищ (серцево-мозковий бульйон та триптон-соевий бульйон) для відновлення ліофілізованих стафілококів та накопичення бактеріальної біомаси при виготовленні стандартних антигенів?

9. Конкретизуйте, для яких потреб лабораторної діагностики та біотехнології можливим є використання штаму *Staphylococcus aureus* № St 2017/1.

10. На Ваш погляд, які конкретно заходи необхідно вживати для запобігання формування антибіотикорезистентності у мікроорганізмів?

11. За текстом дисертації зустрічаються помилки, невдалі вирази тощо.

Відзначені недоліки жодним чином не знижують загальної позитивної оцінки дисертації, а поставлені запитання носять уточнюючий та дискусійний характер.

Висновок. Дисертація на тему: «Біологічні властивості бактерій роду *Staphylococcus* та розробка засобів їх індикації» є завершеною науково-дослідною роботою, яка за оформленням, актуальністю, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 року № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації» та Порядку 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 Вішован Юрій Юрійович заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина».

Офіційний опонент
завідувач лабораторії ветеринарної санітарії,
паразитології та вивчення хвороб бджіл
Національного наукового центру
«Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини»,
доктор ветеринарних наук, професор

Анатолій ПАЛІЙ

Підпис А. П. Палія засвідчую:
Вчений секретар ННЦ «ЛЕКВМ»,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник



Лариса КОВАЛЕНКО