

ВІДГУК

Офіційного опонента та дисертаційну роботу

Шевченка Максима Віталійовича на тему:

«*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*:

**поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична
характеристика та антибіотикорезистентність»**

поданої на здобуття ступеня доктора філософії

у галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» за спеціальність

211 «Ветеринарна медицина»

Актуальність теми дисертації. Поширення стафілококових інфекцій серед тварин є актуальною проблемою сучасної ветеринарної медицини. Стафілококи видів *Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus* визнані важливими збудниками, які уражають собак, котів та велику рогату худобу. Наявні дані свідчать про їхню здатність до колонізації організму тварин, участь у розвитку інфекційних процесів та наявність потенціалу до міжвидової передачі. Тому вкрай важливо визначити рівень поширеності цих бактерій серед різних видів тварин в Україні.

Стрімке зростання антибіотикорезистентності, зокрема поява метицилінрезистентних штамів стафілококів, створює серйозні перешкоди для успішного лікування інфекцій. Різні штами стафілококів також можуть відрізнятися наявністю генів, що кодують фактори патогенності, та здатністю до утворення біоплівки, що безпосередньо впливає на їхній патогенний потенціал та ризики міжвидової передачі інфекцій. Отже, комплексна характеристика циркулюючих штамів стафілококів має неабияке значення для належної оцінки ризиків та розробки ефективних заходів контролю.

Своєчасну діагностику інфекцій викликаних коагулазопозитивними стафілококами ускладнює подібність культуральних властивостей різних видів цих бактерій. Тому гостро необхідним є вдосконалення діагностичних підходів, зокрема із залученням молекулярно-генетичних методів, для точної ідентифікації видів та правильного вибору антибактеріальної терапії. Результати таких досліджень сприятимуть покращенню профілактики та лікування стафілококових інфекцій у ветеринарній практиці.

Зв'язок роботи з державними (галузевими) програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у межах програми з підготовки доктора філософії та є складовою науково-дослідної роботи “Молекулярна діагностика та генотипування збудників інфекційних хвороб тварин” № держреєстрації 0121U110290 та “Вивчення ролі умовно патогенних мікроорганізмів в етіології та патогенезі хвороб тварин” № держреєстрації 0121U110291.

Ступінь вірогідності та обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації Ступінь вірогідності та обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій,

сформульованих у дисертаційній роботі Шевченко Максима Віталійовича, не викликає жодних сумнівів. Матеріали та методи досліджень, обрані дисертантом, відповідають меті роботи та надали змогу повноцінно виконати всі поставлені завдання. Обрані методики досліджень є сучасними та відповідають загальноприйнятим стандартам у відповідній науковій галузі.

Результати, представлені дисертантом, опрацьовані статистичними методами, систематизовані у вигляді таблиць та ілюстративних рисунків. Висновки та рекомендації, сформульовані автором, є логічними та переконливо обґрунтованими на основі проведених досліджень.

Загалом, дисертаційна робота Шевченко Максима Віталійовича характеризується високим науковим рівнем, новизною отриманих результатів та їх вагомим теоретичним і практичним значенням для розвитку відповідної галузі знань.

Наукова новизна отриманих результатів дисертації. Визначено рівень колонізації клінічно здорових собак бактеріальними видами *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus pseudintermedius*, встановлено їхню роль в інфекційних захворюваннях собак, котів та корів, а також оцінено чутливість виділених штамів до дії антибіотичних препаратів. Виявлено поширення метицилінстійких ізолятів обох видів стафілококів серед досліджених тварин. Описано культуральні характеристики росту *Staph. pseudintermedius* на поверхні хромогенних середовищ та можливість використання цих середовищ для диференціації цього збудника від *Staph. aureus*. Досліджено здатність виділених штамів до утворення біоплівки та визначено розповсюдження генів міжклітинної адгезії, лейкоцитарного та ексfolіативного токсинів в ізолятах виду *Staph. pseudintermedius*. Отримано дані щодо нуклеотидної послідовності гена термонуклеази в ізолятах *Staph. pseudintermedius*.

Теоретичне та практичне значення одержаних результатів. Представлене дослідження має важливе практичне значення, пропонуючи рекомендації щодо використання молекулярно-генетичних методів та хромогенних середовищ для ідентифікації стафілококів у ветеринарній лабораторній практиці. Воно описує культуральні особливості росту *Staphylococcus pseudintermedius* та схему ідентифікації з використанням хромогенних середовищ, а також обґрунтовує застосування отриманого ДНК і чистих культур як позитивних контролів для підвищення точності досліджень. Автор приймав участь у розробці методичних рекомендацій стосовно методів ідентифікації та диференціації стафілококів.

Апробація результатів досліджень, повнота їх викладення в опублікованих працях, достовірність і обґрунтованість наукових положень, висновків, рекомендацій. Результати дисертаційної роботи опубліковано в 19 наукових працях, зокрема: 3 статті у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних Scopus та Web of Science; 5 статей у виданнях, що належать до переліку наукових фахових видань України категорії Б.

Матеріали дисертаційної роботи доповідалися, обговорювалися і були схвалені на 10 міжнародних, державних наукових і науково-практичних конференціях: “Біобезпека, захист та благополуччя тварин” (Київ, 27 травня 2021 р.); “Сучасні досягнення та перспективи клінічної лабораторної медицини у діагностиці хвороб людини та тварин” (Харків, 17 березня 2022 р.); “Ветеринарна медицина: сучасні виклики і актуальні проблеми науки, освіти та продовольчої безпеки: матеріали” (Житомир, 9–10 червня 2022 р.); “Єдине здоров’я – 2022” (Київ, 22–24 вересня 2022 р.); “Досягнення та перспективи ветеринарної науки” (Полтава, 20 жовтня 2022 р.); “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” (Біла Церква, 20 жовтня 2022 р.); “Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 35-річчю заснування факультету ветеринарної медицини” (Житомир, 12-13 жовтня 2022 р.); “Біобезпека, захист та благополуччя тварин” (Київ, 21 листопада 2022 р.); “Актуальні аспекти розвитку науки і освіти” (Одеса, 9–10 листопада 2023 р.); “Аграрна освіта та наука: досягнення, роль, фактори росту” (Біла Церква, 20 жовтня 2023 р.).

Використання текстових запозичень без відповідних посилань на інформаційні джерела в представлених автором роботах не зафіксовано.

Особистий внесок здобувача. В дисертаційній роботі автор особисто здійснив пошук інформації, провів мікробіологічні та молекулярно-генетичні дослідження, систематизував і описав отримані дані. Постановка мети, завдань, планування експериментів, обговорення результатів та формування висновків відбувалися під керівництвом наукового керівника. Деякі дослідження проводились у співпраці з регіональною лабораторією та компанією “Експлоген”, де автор самостійно виконав біоінформаційний аналіз генетичних послідовностей. У публікаціях у співавторстві дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

Структура роботи, обґрунтованість та достовірність результатів досліджень, заключення та висновків дисертанта. Висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи належним чином обґрунтовані та узагальнені, вони логічно впливають з результатів дисертаційного дослідження.

Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділів з матеріалами та методами, результатами власних досліджень, пропозиціями виробництву, списку використаних джерел і 10 додатків. Робота викладена на 214 сторінках комп’ютерного тексту, проілюстрована 24 таблицями та 20 рисунками. Список використаних джерел налічує 273 найменування.

У розділі 1 «**Огляд літератури**» дисертант наводить інформацію щодо загальної видової структури стафілококів та коагулазопозитивних стафілококів, важливих для ветеринарної медицини. Представлено дані про фактори, що визначають патогенний та зоонозний потенціал стафілококів, інформацію про поширення цих бактерій серед людей та тварин. Описано сучасні підходи до ідентифікації та диференціації стафілококів у лабораторній

практиці, а також детально розглянуто проблему набуття стафілококами стійкості до бета-лактамних антибіотиків.

У розділі 2 «**Матеріали та методи досліджень**» автор наводить схему проведених досліджень, детально описує використані методи для досягнення поставлених завдань. Були проведені: епізоотологічні дослідження поширення стафілококів серед клінічно здорових та інфікованих котів, собак та корів, мікробіологічні дослідження культуральних властивостей стафілококів та їх стійкості до антибіотиків, молекулярно-генетичні дослідження для ідентифікації та диференціації стафілококів, визначення генів, асоційованих зі стійкістю до антибіотиків та патогенним потенціалом бактерій, статистичні методи, включно з мета-аналізом стійкості стафілококів до антибіотиків.

У розділі 3 «**Результати власних досліджень**» наведено власні результати автора щодо поширення стафілококів як колонізуючих агентів у клінічно здорових тварин та участі коагулазопозитивних стафілококів в інфекційних процесах у собак, котів та корів. Охарактеризовано мікробіологічні та молекулярно-генетичні особливості ізолятів *S. aureus* та *S. pseudintermedius*. Описано культуральні властивості цих стафілококів на поверхні мікробіологічних хромогенних середовищ. Значна частина досліджень присвячена встановленню патогенного потенціалу збудників, визначенню їх стійкості до антибіотиків та здатності формувати біоплівку. Також вивчено гени міжклітинної адгезії, лейкоцитарного та ексфоліативного токсину в ізолятів *S. pseudintermedius*. Проаналізовано нуклеотидну послідовність гена термонуклеази *nuc*, секвенованого методом Сенгера. Результати досліджень статистично оброблені.

У розділі 4 «**Аналіз і узагальнення результатів досліджень**» дисертант узагальнює отримані експериментальні дані і аргументує результати, порівнює дані стійкості власних ізолятів до антибіотиків з результатами мета-аналізу стійкості стафілококів, ізольованих у країнах Європи, розкриває тему культуральних особливостей стафілококів на поверхні хромогенних середовищ.

Дотримання принципів академічної доброчесності. У дисертації не виявлено ознак академічного плагіату, текстових запозичень чи інших порушень доброчесності автором. У роботі наявні посилання на джерела інформації у разі використання ідей, розробок, тверджень, надано достовірну інформацію про результати наукової діяльності, використані методики досліджень та інформаційні джерела.

Дискусійні положення та зауваження до дисертації.

Оцінюючи позитивно дисертаційну роботу Шевченка Максима вважаю за необхідне висловити деякі зауваження та дискусійні питання:

1. На рисунку 3.3 об'єкти позначені літерами «а» та «b», тоді як у легенді ті самі об'єкти позначені цифровими позначками «1» та «2».
2. У тексті дисертації на сторінці 86 зазначено, що досліджено 18 культур *Staphylococcus pseudintermedius* від собак, проте в таблиці 3.6

наведено дані для 22 ізолятів цього виду. В тексті перед таблицею відсутній опис 4-х культур *Staph. pseudintermedius* ізольованих від котів.

3. У розділі «Матеріали та методи», в шапці таблиці 2.2 «Інтерпретація меж затримки росту навколо дисків з антибіотиками, використаних у дослідженнях», стовпці інтерпретації зон затримки росту підписані неправильно. Більший розмір зони затримки росту вказує на чутливість до антибіотику, тоді як менший розмір зони затримки росту вказує на стійкість до антибіотику. У наведеній таблиці ці значення представлені навпаки.

4. На сторінці 49 в останньому абзаці розділу «Матеріали та методи» процедура відбору проб. молока описана не повністю. Уточніть, хто саме проводив відбір зразків та куди їх доставляли?

5. На сторінці 72, у третьому абзаці зазначено: «...У середньому зона затримки росту для цього виду стафілококів становила $15,2 \pm 0,8$ мм. ...». Поясніть який саме вид стафілококів Ви мали на увазі?

6. У розділі 3.5.4 «Поширення генів позаклітинної адгезії серед ізолятів *Staph. pseudintermedius*» не вказана загальна кількість досліджених ізолятів також. Не зрозуміло чи була виявлена кореляція між фенотиповими ознаками та наявністю генетичних маркерів біоплівкоутворення. Дайте пояснення.

7. У таблиці 3.5 на сторінці 81 використано абревіатури PPV, (%) та NPV, (%), значення яких не розшифровано в примітках. Поясніть, що означають ці абревіатури.

8. У таблиці 3.6 результати щодо стійкості *Staphylococcus aureus* до еритроміцину, триметоприму/сульфаметоксазолу та ципрофлоксацину подано парами значень (наприклад, 0 і 17% для еритроміцину), що важко сприймається. Поясніть на що саме вказують значення 0.

9. Поясніть які ви зробили висновки за результатами систематичного огляду та мета-аналізу стійкості *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius* до антибіотиків?

10. На сторінці 109 в підрозділі 3.5.3 вказано, що за допомогою ПЛР виявлено ген *mecA* у всіх ізолятів *Staph. pseudintermedius* та *Staph. aureus*. У скількох культурах *Staph. pseudintermedius* конкретно виявлено цей ген?

11. Яка загальна кількість стафілококів була ізольована від різних видів тварин (корів, собак, котів)? Зокрема, скільки ідентифіковано *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* і які інші види стафілококів виявлено? Якими методами здійснювали видову ідентифікація?

12. Яку чутливість, тобто найменшу кількість колонієутворювальних одиниць у суспензії, було встановлено та описано у підрозділі 3.3.2 для оптимізованих протоколів ПЛР з метою ідентифікації *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus pseudintermedius*?

13. Чи зазначено в інструкції до хромогенних поживних середовищ, які були досліджені у рамках дисертаційної роботи, що ці середовища призначені для ідентифікації культур стафілококів, та які саме дослідження рекомендує виробник для застосування цих середовищ? На чому ґрунтується

ваше твердження про ефективність хромогенних середовищ для диференціації *Staph. aureus* та *Staph. pseudintermedius*.

14. У дисертаційній роботі було використано метод секвенування за Сенгером для дослідження нуклеотидних послідовностей *Staphylococcus pseudintermedius*. Чи відомі вам інші методи секвенування (наприклад, технології секвенування нового покоління, NGS) і які з існуючих методів забезпечують отримання найбільш точних результатів?

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

Загальний висновок. Дисертаційна робота Шевченка Максима Віталійовича на тему: «*Staphylococcus pseudintermedius* та *Staphylococcus aureus*: поширеність у тварин, мікробіологічна і молекулярно-генетична характеристика та антибіотикорезистентність» оформлено згідно з вимогами постанови Кабінету Міністрів України від 23 березня 2016 року № 261 «Про затвердження Порядку підготовки здобувачів вищої освіти ступеня доктора філософії та доктора наук у закладах вищої освіти (наукових установах)», наказу Міністерства освіти і науки України від 12 січня 2017 р. № 40 «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», є завершеною науково-дослідною роботою, яка за актуальністю, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів відповідає вимогам Постанови Кабінету Міністрів України від 12 січня 2022 р. № 44 «Про затвердження Порядку присудження ступеня доктора філософії та скасування рішення разової спеціалізованої вченої ради закладу вищої освіти, наукової установи про присудження ступеня доктора філософії» (у редакції постанови Кабінету Міністрів України від 19 травня 2023 року № 502 «Про внесення змін до деяких постанов Кабінету Міністрів України з питань підготовки та атестації здобувачів наукових ступенів»), а її автор – Шевченко Максим Віталійович – є гідним присудження ступеня доктора філософії галузі знань 21 «Ветеринарна медицина» за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина».

Офіційний опонент, доктор ветеринарних наук,
професор, професор кафедри епізоотології,
мікробіології і вірусології
Національного університету біоресурсів і
Природокористування України

Валерій УШКАЛОВ

«30» травня 2024 р.

Підпис Валерія УШКАЛОВА засвідчую
начальник відділу кадрів
Національного університету біоресурсів і
Природокористування України



Сергій ГРИЩЕНКО