

РЕЦЕНЗІЯ

на дисертаційну роботу Кіт Марини Юріївни
«Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за
допомогою молекулярно-генетичних методів»,
представлену на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань
09 — Біологія за спеціальністю 091 — Біологія та біохімія

Актуальність теми дисертації. Африканська чума свиней (АЧС) є надзвичайно контагіозною геморагічною хворобою, що спричиняється великим ДНК-вмісним вірусом (ASFV) і характеризується високою смертністю, яка в окремих випадках досягає 100 %. Захворювання охоплює як домашніх свиней, так і диких кабанів, поширюється на значні території та завдає відчутної шкоди національним економікам і глобальному ринку тваринницької продукції, спричиняючи серйозні економічні втрати та створюючи загрозу продовольчій безпеці.

Складність контролю АЧС обумовлюють, зокрема, складна структура вірусу, його здатність до уникнення імунної відповіді та варіабельність клінічних форм захворювання, зокрема вірусоносійства, залежно від штаму та резистентності тварин, а також відсутність ефективних вакцин. Через ці чинники, раннє, точне і надійне виявлення збудника або інфікованих тварин є критично важливим для контролю, обмеження поширення та ліквідації осередку захворювання.

У цьому контексті розробка вітчизняних діагностичних засобів набуває особливої актуальності з кількох причин:

1. Епізоотична ситуація в Україні та суміжних країнах залишається напруженою. Постійна загроза інтродукції вірусу з дикої фауни або з країн-сусідів обумовлює потребу у швидкому та ефективному діагностичному реагуванні.

2. Чинні, рекомендовані ВООЗТ методи діагностики, такі як ПЛР та ІФА, які застосовуються в Україні, хоч і мають високу аналітичну чутливість і специфічність, все ж базуються на застосуванні реактивів іноземного виробництва або живого вірусу як антигену, що потребує лабораторій III рівня біобезпеки, доступ до яких у нашій державі є обмеженим.

3. Ізотермічні методи ампліфікації, зокрема LAMP, мають високий потенціал для використання в польових умовах завдяки простоті застосування, відсутності потреби у складному обладнанні та можливості швидкого отримання результатів. Вітчизняна розробка таких тестів дозволить адаптувати методи до умов українських лабораторій та польових діагностичних пунктів.

4. Серологічна діагностика вірусу АЧС також потребує вдосконалення. Використання рекомбінантних вірусних білків замість живого вірусу дає змогу створити безпечні, економічно доцільні та стандартизовані тести, які можуть бути локалізовані на виробництві та використанні в межах країни без загрози біобезпеці.

5. Залежність від імпорتنих тест-систем у сучасних умовах є стратегічно вразливою. Розробка та впровадження вітчизняних засобів діагностики сприятиме зміцненню національної біобезпеки, зменшенню витрат на закупівлю діагностичних наборів і підвищенню готовності до швидкого реагування на спалахи АЧС.

Ураховуючи зазначене, створення та подальше впровадження вітчизняних молекулярно-біологічних і серологічних тест-систем на основі рекомбінантних антигенів і сучасних технологій ампліфікації нуклеїнових кислот є не лише актуальним, а й стратегічно важливим напрямом для ветеринарної науки та практики України.

Все вищезначене підтверджує актуальність дисертаційної роботи Кіт Марини Юріївни на тему «Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів», яка присвячена вирішенню саме цих питань.

Зв'язок з науковою тематикою. Дисертаційне дослідження проведене здобувачкою впродовж 2017–2025 рр. у відповідності до планів наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», у рамках виконання Програм наукових досліджень Національної академії аграрних наук України за 3 завданнями: 38.01.01.02 Ф «Встановити видо- та родоспецифічні генетичні маркери збудників емерджентних інфекційних захворювань ВРХ, свиней, птиці та розробити методологію їх моніторингу і діагностики на основі молекулярно-генетичних технологій» (2016–2019 рр., номер держреєстрації 0116U000237), 39.00.03.16 Ф (Пш) «Розробити методику виявлення ДНК вірусу АЧС на основі ізотермічної полімеразної реакції» (2019 р., номер держреєстрації 0119U100134), 34.02.01.02 Ф «Створення методології розробки рекомбінантних контрольних зразків нуклеїнових кислот і протеїнів збудників інфекційних хвороб для використання у лабораторній ветеринарній діагностиці» (2021–2025 рр., номер держреєстрації 0121U108358); а також за співпраці з Інститутом мікробіології Бундесверу та GIZ GmbH у рамках проекту «Українсько-німецька ініціатива «Біологічна безпека для управління ризиками зоонозів на територіях, які розташовані біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу» (2020–2022 рр.).

Наукова новизна та теоретичне значення дисертації. Представлені результати свідчать про високий рівень оригінальності проведених досліджень та їх внесок розвиток біологічної науки. Основні аспекти новизни та теоретичного значення:

1. Вперше в Україні розроблено та апробовано застосування рекомбінантних протеїнів р32 та р54 для серологічної діагностики АЧС, що значно підвищує специфічність та безпеку ІФА-тестів.

2. Створено методику петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP) для детекції ДНК ASFV — це один із найбільш перспективних напрямів молекулярної діагностики, особливо для польових умов.

3. Розроблено методику та отримано рекомбінантний позитивний контрольний зразок для ПЛР-діагностики АЧС, що забезпечує стабільність, відтворюваність і безпечність тестування.

4. Розроблено тест-систему для ПЛР-діагностики АЧС у режимі реального часу, що відповідає сучасним вимогам до високочутливої діагностики.

5. Уперше в Україні здійснено прижиттєвий відбір ротової рідини від диких свиней з подальшим молекулярним аналізом, що є інноваційним підходом у моніторингу дикої фауни.

6. Проведено молекулярно-генетичні дослідження дикої популяції *Sus scrofa* в умовах Харківської області щодо детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС із застосуванням молекулярних методів, що надало нові дані щодо циркуляції вірусу у природному середовищі.

Отримані результати також мають очевидну прикладну цінність:

1. Розроблено нормативну документацію та подано патенти на ключові компоненти діагностики (тест-системи, рекомбінантні білки).

2. Методичні рекомендації, затверджені провідною науковою установою — ННЦ «ІЕКВМ», є свідченням офіційного визнання та готовності до широкого впровадження.

3. Отримані дані вже використовуються у професійній ветеринарній практиці, що забезпечує оперативне виявлення та контроль АЧС.

4. Робота має навчальну цінність, оскільки її результати включено до освітніх програм для здобувачів вищої освіти з ветеринарної медицини, біології та біотехнології.

5. Адаптація методик до доступних ресурсів українських лабораторій робить їх зручними для масового впровадження без потреби в вартісному устаткуванні.

Робота поєднує фундаментальну новизну із чітко вираженим прикладним потенціалом. Вона робить внесок у підвищення ефективності моніторингу, діагностики та контролю АЧС в Україні, що надзвичайно актуально у контексті сучасної епізоотичної ситуації. Її результати мають значення як для біологічної науки, так і для практичної ветеринарної медицини, сприяючи зменшенню ризиків поширення АЧС та зміцненню біобезпеки в Україні.

Головні результати, отримані особисто автором. Як свідчать матеріали дисертаційної роботи Кіт М.Ю. самостійно виконала основну частину пошукових та експериментальних досліджень, провела аналіз, інтерпретацію й узагальнення отриманих результатів, статистичну обробку даних, сформулювала висновки та підготувала текст дисертаційної роботи. Роботи з отримання рекомбінантних білків та розробки протоколу імуноферментного аналізу були проведені на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Німеччина) у співпраці з доктором Ю. Шварц та доктором К. Попп, а у обговорення результатів цієї частини дослідження здійснювалося спільно з доктором Х. фон Бутлером. Польовий відбір зразків для скринінгових досліджень здобувачка виконувала спільно зі старшим науковим співробітником ННЦ «ІЕКВМ», кандидатом біологічних наук О.Б. Зленко. Розробку карти місць відбору зразків диких свиней здійснено разом зі старшим викладачем ХНУ ім. В. Н. Каразіна В. В. Гарькавенком.

Планування напрямів досліджень, обговорення результатів і структури дисертації проводилося у співпраці з доктором ветеринарних наук, професором, членом-кореспондентом НААН А.П. Геріловичем і науковим керівником, доктором ветеринарних наук, професором А. П. Палієм.

Під час оцінки автентичності дисертації був проведений аналіз звіту перевірки роботи на плагіат, наявність текстових запозичень (програма UNICHECK), на підставі якого було зроблено висновок, що дисертаційна робота Кіт Марини Юріївни на тему «Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів», є результатом самостійних досліджень здобувачки, висновки, рекомендації та пропозиції, що характеризують наукову новизну дисертаційного дослідження, одержані автором особисто. Дисертація не містить елементів академічного плагіату та запозичень з урахуванням п. 9. Постанови КМУ від 12.01.2022 № 44. Використані ідеї, результати й тексти інших авторів мають посилання на відповідне джерело. Це дає підґрунтя зробити висновок про дотримання здобувачкою вимог академічної доброчесності.

Повнота викладення матеріалів дослідження в опублікованих працях та апробація результатів. Результати досліджень, проведених М.Ю. Кіт, висвітлені нею в дисертації, а також у 14 опублікованих наукових працях, у тому числі в одному розділі в колективній монографії, виданій за кордоном, одній статті у науковому фаховому виданні України категорії «А» та 3 статтях категорії «Б», 6 тезах доповідей на наукових конференціях, у одному описі до патенту України на корисну модель і 2 методичних рекомендаціях.

Як свідчать матеріали рецензованої дисертації, основні її результати й положення були представлені, обговорені та отримали позитивну оцінку на звітних сесіях Вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2018–2021 та 2024 рр., а також на 7 міжнародних наукових конференціях, з яких 3 закордонних: 3rd Annual BTRP Ukraine Regional One Health Research Symposium (Київ, Україна, 2018), Biosafety and Biosecurity Symposium “One Health — One Vision” (Тбілісі, Грузія, 2019), 2021 International BioThreat Reduction Symposium (Київ, Україна, 2021), 17th Medical Biodefence Conference (Мюнхен, Німеччина, 2021), International Online Science Symposium “Know Your Pathogens — Eurasian Symposium on Biological Health Hazards”, проведеної Інститутом мікробіології Бундесферу (Мюнхен, Німеччина, 2021), онлайн-конференції аспірантів і молодих вчених у сфері Єдиного здоров'я та біотехнології “VetBioConnect” (Харків, Україна, 2024), II міжнародній науково-практичній конференції науково-педагогічних працівників та молодих науковців «Актуальні аспекти розвитку ветеринарної медицини в умовах євроінтеграції» (Одеса, Україна, 2024).

Аналіз стилю викладення результатів та структури дисертації.

Дисертаційне дослідження М.Ю. Кіт викладене державною мовою та відповідає чинним вимогам щодо оформлення наукових праць. Основні наукові положення обґрунтовані, логічно пов'язані з результатами досліджень і підтверджуються експериментальними даними, аналізом наукової літератури та результатами статистичної обробки. Сформульовані у роботі висновки

повністю відповідають поставленим завданням і базуються на отриманих результатах. Дисертація складається з анотації, змістк, вступ, чотири розділи, висновки, пропозиції виробництву, список використаних джерел і 3 додатки. Дисертація включає 14 таблиць та 22 рисунки. Загальний обсяг роботи – 183 сторінки.

Зауваження та побажання до змісту дисертації. У процесі рецензування дисертаційної роботи виникло декілька запитань:

1. яке загальнобіологічне значення ваших досліджень та отриманих результатів;
2. яку сироватку кроля було використано при проведенні досліджень з використанням непрямого методу ІФА;
3. у роботі вказується, що умови очищення вірусних білків після їх клонування у клітинах *E. coli* були фізіологічними. Що малось на увазі?
4. за якими критеріями обирали локації для відбору ротової рідини від диких свиней?
5. за результатами проведених досліджень, частка зразків ротової рідини диких свиней, що містили генетичний матеріал вірусу АЧС, становить близько 27%, що вказує на перебіг інфекційного процесу в тварин. Яке епізоотологічне та біологічне значення має такий рівень інфікування тварин збудником АЧС у популяції диких свиней?;

а також зауваження та побажання:

1. для підвищення інформативності ілюстративного матеріалу на фото результатів вестерн-блоту (рис. 3.1, 3.4, 3.7, 3.9) бажано було б стрілками вказати на особливості, згадані у тексті;
2. потребують уточнення назва табл. 3.1 та пояснення до рис. 3.21;
3. у розділі 4 «Обговорення та узагальнення результатів досліджень» бажано було більш детально охарактеризувати результати власних досліджень як у порівняльному аспекті, так і щодо їх науково-теоретичної та практичної значущості.

Також зустрічалась незначна кількість невдалих виразів, а саме: використання «сироватки крові свині як первинних антитіл» (ст. 81); «планшет блокували блокуючим розчином» (ст. 82); проводили «концентрацію білків» (ст. 127); до переваг саркозилю «можна віднести неденатуруючу дію» (ст. 128); «...у білкових дослідженнях...» (ст. 128).

Проте, перелічені недоліки не є принциповими та не впливають на наукову суть дисертаційного дослідження, а питання та зауваження не знижують його високої оцінки, а також загального позитивного враження від рецензування дисертаційної роботи М.Ю. Кіт. Сподіваюсь, що висловлені зауваження та побажання сприятимуть подальшому розвитку здобувачки як науковця.

Загальний висновок. Дисертаційна робота Кіт Марини Юріївни на тему «Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів», подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії, є актуальною, самостійною та завершеною кваліфікаційною науковою працею, виконана з використанням сучасних

загальнобологічних методів дослідження, а зміст та логіка викладу матеріалу відповідають обраній темі дослідження та профілю спеціальності 09 — Біологія за спеціальністю 091 — Біологія та біохімія.

За своїми науково-теоретичним рівнем, основними науково-обґрунтованими результатами та положеннями, рівнем презентації у фахових виданнях, новизною та практичним значенням відповідає вимогам Дисертація відповідає вимогам наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «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.

Тому вважаю, що здобувач Кіт Марина Юріївна заслуговує на присудження їй наукового ступеня доктора філософії з галузі знань 09 — Біологія за спеціальністю 091 — Біологія та біохімія.

Рецензент:

В.о. заступника директора з наукової роботи
Національного наукового центру
«Інститут експериментальної і
клінічної ветеринарної медицини»,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник

Лариса КОВАЛЕНКО

