

ВІДГУК

офіційного опонента на дисертацію **Кіт Марини Юріївни**

на тему: **«Удосконалення експрес-діагностики**

африканської чуми свиней за допомогою

молекулярно-генетичних методів»,

поданої на здобуття ступеня доктора філософії

за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» галузі знань 09 «Біологія»

Актуальність теми дисертації. Африканська чума свиней (АЧС) — це найбільш небезпечне вірусне захворювання домашніх та диких свиней від якого не існує ефективних вакцин. З 2007 року, коли АЧС була винесена з африканського континенту до Східної Європи, в тому числі і в Україну, і наразі поширена і Євроазійському регіоні та островах Карибського басейну налічується близько 70000 офіційно визнаних спалахів цього захворювання. Заходи боротьби з АЧС зводяться виключно до повного знищення свиней у вогнищі та жорсткого контролю у зонах навколо вогнища.

Оскільки ефективних вакцин у світі проти АЧС не має то з метою недопущення занесення цієї хвороби на благополучні території вживаються заходи з профілактики (біобезпека господарств, тощо) та вчасної діагностики. В Україні застосовуються комплекс діагностичних засобів, які в переважній більшості вибудовані на основі молекулярно-генетичних методів. У світі засоби діагностики, особливо ті, що основані на молекулярно-генетичних знаннях збудника АЧС постійно удосконалюються підвищуючи критерії чутливості та специфічності. Тому на сьогодні в Україні й в діагностичній роботі фахівців ветеринарної медицини є потреба у застосуванні ефективних засобів ранньої або експрес діагностиці АЧС.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалася впродовж 2017–2025 рр. згідно з планами наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», затвердженими Національною академією аграрних наук України за 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 підтримки Інституту 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.).

Ступінь обґрунтованості наукових положень, висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації. Дисертація Кіт Марини Юріївни на тему: «Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів», характеризується високим рівнем як аналітичного мислення, так і методичного забезпечення, чіткою побудовою наукових завдань та експериментального дослідження. Автором використано сучасну методологію з розробки засобів діагностики АЧС на основі полімеразної ланцюгової реакції, петльової ізотермічної ампліфікації та імуноферментного аналізу, а також проведенні молекулярно-генетичного скринінгу щодо циркуляції збудника АЧС у популяції диких свиней. Усі етапи дослідження логічно послідовні, ретельно проаналізовані, узагальнені та логічно викладені.

Висновки та рекомендації, сформульовані в дисертації, базуються на аналізі фактичного матеріалу, отриманого в результаті власних експериментальних досліджень. Висновки показують високий рівень обґрунтованості, наукової новизни та практичної значущості. Об'єкт, предмет і методи дослідження повністю відповідають тематиці та науковому рівню дисертації.

Достовірність основних наукових положень, висновків проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Дисертація Кіт М. Ю. за змістом, структурою та оформленням повністю відповідає вимогам 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.

Сформульовані здобувачем у дисертаційній роботі основні наукові положення, висновки та рекомендації базуються на отриманні достовірних науково-обґрунтованих експериментальних даних, які були грамотно сплановані і проведені відповідно до поставлених наукових завдань. У роботі використано сучасні аналітичні методи, здійснено опрацювання значної та достатньої кількості наукових джерел в переважній більшості зарубіжних, автори яких визнані науковою спільнотою та багато років працювали, працюють та вивчають особливості африканської чуми у свійських та диких свиней. Для оцінки статистичної значущості результатів застосовано відповідні математичні розрахунки, які засвідчують достовірність отриманих результатів. Теоретичні положення та практичні

рекомендації, сформульовані у дисертації, є науково обґрунтованими та відображають ефективність розробок.

Отже, основні положення, висновки та результати дисертаційного дослідження Кіт М. Ю. є достовірними і заслуговують на наукове визнання.

Новизна основних наукових положень та висновків проведених наукових досліджень та одержаних результатів. За проведення наукових досліджень вперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних аналогів протеїнів р32 та р54 вірусу АЧС для детекції антитіл проти збудника АЧС у сироватках крові від свиней методом ІФА, розроблено методику детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контрольного зразка для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР, розроблено тест-систему для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у реальному часі. Уперше на території України було проведено прижиттєвий збір зразків ротової рідини від диких свиней у польових умовах та показано можливість виявлення у таких зразках генетичних маркерів *Sus scrofa* та вірусу АЧС за допомогою розроблених нами методик на основі петльової ізотермічної ампліфікації. Установлено носійство вірусу АЧС у популяції диких свиней на території Харківської області.

Оцінка структури та змісту роботи. Дисертація складається з анотацій, вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 184 сторінках. Список використаної літератури налічує 207 джерел. Список джерел літератури відповідає напрямку досліджень і включає публікації авторів, лєвова більшість яких визнані науковою спільнотою, як фахівців що працювали у цьому напрямі досліджень, що й характеризує зміст та значимість цієї дисертаційної роботи.

Вступ. У цьому розділі автор у традиційному порядку наводить основні дані про дисертаційну роботу, окреслюючи наукові та практичні результати, мету й поставлені завдання досліджень. Вважаю, що основні положення дисертації враховано у відповідних підрозділах вступу.

Розділ 1. Огляд літератури. Цей розділ складається з 6 підрозділів (разом із висновком до цього розділу), у яких автор аналізує дані літератури щодо: сучасних уявлень про загальну характеристику вірусу африканської чуми свиней; епізоотологічні особливості цього захворювання; епізоотичної ситуації щодо АЧС у світі; лабораторної діагностики та специфічної профілактики АЧС.

У розділі узагальнено та ретельно викладені літературні дані, матеріал яких подано зрозуміло, послідовно, логічно й доступно, що свідчить про обізнаність автора з науковою темою та вміння опрацьовувати наукову інформацію. Висновки до розділу є аргументованими та логічно походять із проаналізованих джерел, що дозволяє вважати огляд літератури достатньо повним і інформативним для подальшого формування завдань дослідження.

Розділ 2. Матеріали та методи виконання роботи. Цей розділ детально характеризує залучені методи для проведення наукових досліджень здобувача. Референтні зразки були отримані з Інституту Фрідріха Леффлера всесвітньо відомого вченого С. Бльоме, Увесь загал матеріалів та методології виконання наукових досліджень здобувач власноруч опрацювала. Методи, які були залучені у ході виконання експериментальних досліджень спрямовані на глибоке вивчення та удосконалення діагностики АЧС.

Цей розділ вирізняється чіткою організацією матеріалу, що дозволяє відтворити умови проведення дослідження та оцінити адекватність застосованих методів.

Загалом, методологічна база дослідження є обґрунтованою, відповідає меті та завданням дисертації, а також дозволяє забезпечити репрезентативність і практичну значущість отриманих результатів.

Розділ 3. Власні дослідження. Цей розділ складається з 5 підрозділів. У першому підрозділі представлено інформацію про розробку рекомбінантних антигенів вірусу АЧС та протоколу проведення ІФА для серологічної діагностики захворювання. У другому підрозділі представлено розробку рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-детекції вірусу АЧС. У третьому підрозділі зазначено про розробку тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу. У четвертому підрозділі наведені дані щодо розробки способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP). У п'ятому підрозділі представлено інформацію про удосконалення методу відбору зразків ротової рідини від диких свиней в польових умовах та скринінг генетичного матеріалу збудника АЧС у цих зразках.

Матеріал у цих підрозділах викладено послідовно, із чітким узагальненням отриманих результатів, що свідчить про високий рівень обґрунтованості проведеного дослідження. Результати проведених наукових досліджень у цьому розділі свідчать про те, що дисертантом розроблено методику детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації, розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контрольного зразка для детекції генетичного матеріалу вірусу АЧС методом ПЛР, розроблено тест-систему для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у

реальному часі, що має прикладне значення та може бути використаним у діагностиці цього захворювання у мережі діагностичних лабораторій ветеринарного профілю.

Загалом розділ 3 за вимогами та логічно завершується узагальнюючим висновком, що ґрунтується на результатах власних досліджень. Отже, результати, отримані дисертантом, повною мірою розкривають мету роботи та окреслюють її ключові положення. Виклад матеріалу науково обґрунтований, чітко та структурно викладений, а отримані результати достатньо повно описано та проаналізовано у відповідних таблицях та рисунках. Аналізований розділ містить достатню кількість якісних ілюстративних матеріалів, що підтверджує достовірність отриманих результатів.

Розділ 4. Аналіз та узагальнення результатів досліджень. Здобувач ретельно й послідовно проаналізував результати проведених досліджень, що дозволяє не лише ознайомитися з отриманими даними, а й зрозуміти логіку їх інтерпретації. Значна увага приділена порівнянню власних результатів із даними інших дослідників, що свідчить про глибоке пізнання зазначеної проблематики та наукову обґрунтованість висновків. Узагальнення викладені чітко, аргументовано й структуровано, що підкреслює високий рівень аналітичної роботи.

Висновки логічно відповідають поставленим завданням та відображають основний зміст дисертації.

Пропозиції виробництву. Для виробництва пропонується:

- запатентована "Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus»";
- методичні рекомендації «Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації» (затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р.);
- методичні рекомендації «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС» (затверджено на засіданні методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 8 від 23.10.2024 р.).

Результати отриманих наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю Біологія та біохімія, Ветеринарна медицина, при вивченні освітніх програм Біотехнологія та Промислова біотехнологія у закладах вищої освіти України та в наукових дослідженнях підрозділів Інституту ветеринарної медицини НААН України.

Список використаних джерел налічує 207 літературних джерел, що повністю охарактеризовують напрям та актуальність дисертаційної роботи.

Додатки містять патент, картки зворотнього зв'язку, акти впровадження результатів дисертації у навчальний процес, список публікацій здобувача та відомості про апробацію.

Практичне значення результатів полягає у розробці: нормативної документації щодо виготовлення, контролювання та застосування тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui-DNA-test-ASF virus»; методичних рекомендацій «Детекція ДНК вірусу африканської чуми свиней методом петльової ізотермічної ампліфікації» та «Отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС», розглянуті та схвалені методкомісією ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 3.11.2021 р. та протокол № 8 від 23.10. 2024 р. відповідно та призначені для фахівців діагностичних лабораторій, науковців, викладачів та студентів вищих навчальних закладів та співробітників науково-дослідних установ ветеринарного профілю.

Результати наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю Біологія та біохімія, Ветеринарна медицина, при вивченні освітніх програм Біотехнологія та Промислова біотехнологія у закладах вищої освіти України та в наукових дослідженнях.

Апробація результатів досліджень, повнота їх викладення в опублікованих працях. Основні результати досліджень дисертації попередньо апробовано на: Основні результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2018–2021 та 2024 рр., а також на таких наукових конференціях: 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” (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).

За темою дисертаційної роботи опубліковано 14 наукових праць, у тому числі 1 розділ у колективній монографії, виданій за кордоном, 1 стаття у науковому фаховому виданні України категорії «А» та 3 статті — категорії «Б», 6 тез доповідей на наукових конференціях, 1 опис до патенту України на корисну модель і 2 методичних рекомендацій.

Особистий внесок здобувача полягає в самостійному аналізі літературних джерел за темою дисертації, самостійно проведено експериментальні дослідження, статистичну

обробку отриманих даних, їх узагальнення, формування висновків та рекомендацій для практичного застосування розробок.

Дискусійні, критичні зауваження та запитання до дисертанта. У процесі рецензування дисертації Кіт М. Ю. виникли запитання до дисертанта, зокрема:

1. Наскільки у часі раніше розроблена здобувачем "Тест-система для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus»" виявляє ДНК вірусу АЧС порівняно з існуючими аналогами ?

2. Який термін придатності "Тест-системи для виявлення ДНК вірусу африканської чуми свиней за допомогою полімеразної ланцюгової реакції «Sui-DNA-test-ASF virus»" ?

3. Чи має спроможність установа в якій працює здобувач на промисловій основі забезпечити випуск цієї тест-системи для реалізації, наприклад за дежзakupівлею у мережу регіональних лабораторій ветеринарної медицини України?

4. З чим пов'язано, що лише 28 пулів з 51-го містили генетичний матеріал *S. scrofa* з екстрагованої з ротової рідини.

Виникли також деякі зауваження до дисертації, зокрема:

1. У Вступі, зокрема у пункті Практичне значення отриманих результатів є некоректний напис "Результати наукових досліджень рекомендуються до використання під час підготовки здобувачів вищої освіти за спеціальністю Біологія та біохімія, Ветеринарна медицина, при вивченні освітніх програм Біотехнологія та Промислова біотехнологія у закладах вищої освіти України та в наукових дослідженнях підрозділів Інституту ветеринарної медицини НААН України". Остання складова цього речення - "...в наукових дослідженнях підрозділів Інституту ветеринарної медицини НААН України" звучить та стосується як би лише одного інституту ІВМ НААН, а решти інститутів як би і не стосується.

2. У пункті "Методика збору польових зразків ротової рідини від диких свиней" ст. 71 чомусь не описано з яким інтервалом проводився огляд приманок та відбір зразків і скільки діє максимальний термін приманок у навколишньому середовищі, якщо їх зберігання передбачається при +4 °C та в який період чи періоди року був проведений цей дослід.

3. Чому при отриманні рекомбінантних білків вірусу АЧС р32 та р54 не проводили у панелі з сироватками не проводили дослідження специфічності з сироватками, які містили антитіла до інших сторонніх вірусів та бактерій.

Висновок. Отже, дисертантом виконано методично обґрунтовані дослідження, викладено у послідовній формі і зроблено аргументовані висновки та практичні пропозиції, що впливають з одержаних результатів. Дисертація на тему: "Удосконалення експрес-діагностики африканської чуми свиней за допомогою молекулярно-генетичних методів"

оформлена відповідно до наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12 січня 2017 року «Про затвердження Вимог до оформлення дисертації», є завершеною науково-дослідною роботою, яка за актуальністю теми, науковою новизною, теоретичним та практичним значенням отриманих результатів, рівнем і обсягом виконаних досліджень, повністю відповідає вимогам 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 Кіт Марина Юріївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності за спеціальністю 091 «Біологія та біохімія» галузі знань 09 «Біологія».

Офіційний опонент

завідувач лабораторії вірусних хвороб тварин

Інституту ветеринарної медицини НААН,

доктор ветеринарних наук,

старший науковий співробітник

Микола СИТЮК

Підпис Миколи СИТЮКА засвідчую

вчений секретар ІВМ НААН,

к. вет. наук



Тетяна УХОВСЬКА