

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 висококонтагіозне вірусне захворювання, яке у гострій формі може спричинити 100 % смертність серед домашніх і диких свиней. Хвороба поширена в Африці, Європі, Азії та Океанії. В Україні перший спалах був зафіксований ще у 1977 році, а з 2012 року, відколи було підтверджено перший випадок за часів незалежності, зареєстровано 723 випадки у 24 областях. Через відсутність зареєстрованих засобів профілактики та лікування захворювання, єдиними методами контролю над АЧС залишаються оперативна діагностика та запровадження жорстких карантинних заходів.

У цьому контексті особливої уваги заслуговують дикі свині, які відіграють роль у природному збереженні та еволюції вірусу. У регіонах тривалого циркулювання збудника часті випадки виявлення антитіл до АЧС у диких свиней свідчать про наявність штамів із помірною або низькою вірулентністю. Такі тварини можуть виживати після зараження та залишатися носіями вірусу протягом життя. Водночас в Україні серологічний моніторинг серед диких свиней не здійснюється, тому інформація про наявність подібних штамів відсутня. У зв'язку з цим особливої актуальності набуває вдосконалення діагностики АЧС, зокрема шляхом розвитку молекулярно-генетичних і серологічних методів та проведення досліджень прижиттєвих зразків від диких тварин. Таким чином, обрана тема дисертації відповідає сучасним потребам ветеринарної медицини, а також має фундаментальне та прикладне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконувалася як частина наукових досліджень лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ» 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.).

Новизна основних наукових положень та висновків проведених наукових досліджень та одержаних результатів. Вперше в Україні було розроблено та експериментально підтверджено ефективність використання рекомбінантних аналогів білків р32 і р54 вірусу африканської чуми свиней (АЧС) для виявлення антитіл до збудника АЧС у сироватці крові свиней за допомогою методу ІФА. Крім того, створено методику виявлення ДНК вірусу АЧС з використанням петльової ізотермічної ампліфікації, розроблено і валідовано застосування рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-діагностики, а також розроблено тест-систему для детекції ДНК збудника шляхом ПЛР у режимі реального часу. Було здійснено відбір прижиттєвих зразків ротової рідини від диких свиней у природних умовах, і доведено можливість виявлення у цих зразках як генетичних маркерів виду *Sus scrofa*, так і ДНК вірусу АЧС із застосуванням розроблених методів на основі петльової ізотермічної ампліфікації. За результатами досліджень встановлено факт присутності збудника 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, обговорення та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Загальний обсяг дисертації викладено на 184 сторінках. Список використаної літератури налічує 207 джерел і включає публікації авторів, які працювали у цьому напрямі досліджень, що якісно доповнює зміст роботи.

Вступ (с. 19–24) містить логічно обґрунтовану актуальність теми наукової роботи та необхідність вирішення проблеми. У даному підрозділі визначено мету і завдання дослідження, показано наукову новизну та практичне значення отриманих результатів дисертації, вказано особистий внесок здобувачки, подано місця апробацій та публікацій.

Розділ 1. Огляд літератури (с. 25–62) складається з 6 підрозділів (разом із висновками до розділу 1), у яких авторка аналізує дані літератури щодо загальної характеристики вірусу АЧС, його епізоотологічних особливостей, епізоотичної ситуації ситуації щодо АЧС в Україні та у світі, лабораторної діагностики та специфічної профілактики захворювання. Значну увагу приділено даним щодо генетичних та антигенних особливостей вірусу АЧС та їх використанню в лабораторній діагностиці.

Цей розділ змістовний, добре написаний, повністю відображає сучасний стан дослідження проблеми за кордоном та в Україні. Виклад матеріалу цього розділу загалом логічний та послідовний і є досить інформативним.

Розділ 2. Матеріали та методи виконання роботи (с. 63–82). Дисертацію виконано впродовж 2017–2025 років у лабораторії молекулярної діагностики Національного наукового

центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини». Частину експериментальних даних було отримано на базі Інституту мікробіології Бундесверу (Мюнхен, Німеччина).

Розділ включає описані методи відбору зразків ротової рідини від диких свиней, дизайну праймерів, проведення ампліфікації нуклеїнових кислот, молекулярного клонування, очищення білків, проведення ІФА, а також оптимізований дисертанткою спосіб солюбілізації білків з тілець включення за допомогою детергентів. Застосування методів та методик, як загальноприйнятих, так і спеціально розроблених, надало можливість успішно вирішити поставлені завдання.

Розділ 3. Результати власних дослідження (с. 83–123) складається з 5 підрозділів. У першому підрозділі представлено результати розробки рекомбінантних антигенів вірусу АЧС та протоколу проведення ІФА для серологічної діагностики захворювання. Автором проведено молекулярне клонування 6 рекомбінантних вірусних білків в експресуючій системі *E. coli* Lemo21(DE3). Наведено протоколи очищення отриманих білків за фізіологічних та денатуруючих умов, а також за протоколом, що включає солюбілізацію білків за допомогою детергентів. Повністю критеріям специфічності та стабільності з усіх розроблених антигенів відповідав білок р32. Встановлено оптимальні концентрації антигену, розведення досліджуваних сироваток та вторинних антитіл для проведення ІФА з використанням розробленого білка р32. Наведено результати його випробування в ІФА з використанням позитивних та негативних щодо АЧС сироваток крові від свиней. Обчислено внутрішньо- та зовнішньосистемний коефіцієнт варіативності отриманих результатів ІФА. Результати даного підрозділу є важливими для діагностики АЧС після того, як захворювання стає ендемічним, що наразі є актуальним для України.

У другому підрозділі показано результати розробки рекомбінантного позитивного контрольного зразка для ПЛР-детекції вірусу АЧС. Описано результати проведення молекулярного клонування плазмідного контролю, його квантифікацію та використання при проведенні класичної ПЛР та ПЛР у режимі реального часу. Р

У третьому підрозділі наведено результати розробки тест-системи для детекції ДНК вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу. При цьому в якості позитивного контролю в тест-системі було використано рекомбінантну плазмиду, розробка якої описана в другому підрозділі. Для тест-системи встановлено специфічність, ліміт детекції та внутрішньосистемний коефіцієнт варіативності. Тест-система для детекції вірусу АЧС методом ПЛР у режимі реального часу «Sui DNA test ASF virus» пройшла державні комісійні випробування на базі Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів та є зареєстрованим в Україні ветеринарним імунобіологічним препаратом.

У четвертому підрозділі представлено дані щодо розробки способу детекції ДНК вірусу АЧС за допомогою петльової ізотермічної ампліфікації (LAMP). Описано оптимізацію протоколу проведення реакції, дослідження чутливості та специфічності розробленого способу. Крім того, показано можливість реєстрації результатів аналізу як у режимі реального часу, так і після закінчення реакції шляхом гель-електрофорезу або візуалізації продукту реакції безпосередньо у пробірці. Розроблений спосіб детекції ДНК вірусу АЧС є швидким, дешевим і може бути використаний в лабораторіях з обмеженими ресурсами, а також в польових умовах.

У п'ятому підрозділі описано результати удосконалення методу відбору зразків ротової рідини від диких свиней в польових умовах та скринінгу генетичного матеріалу збудника АЧС у цих зразках. Прижиттєво відібрані зразки ротової рідини були досліджені щодо наявності генетичних маркерів свині та вірусу АЧС. Показано присутність збудника захворювання в популяції диких свиней на території Чугуївського р-ну Харківської області.

Отже, результати, отримані дисертанткою, повною мірою розкривають мету роботи та окреслюють її ключові положення. Грамотний виклад експериментальних даних із глибокою інтерпретацією вказує на наукову освіченість здобувачки, якою опрацьовано достатню кількість наукової літератури з питань, які розглядаються в роботі. Аналізований розділ містить достатню кількість якісних ілюстративних матеріалів, що підтверджує достовірність отриманих результатів.

Розділ 4. Обговорення та узагальнення результатів досліджень (с. 124–142). У даному розділі авторка змістовно, послідовно, об'єктивно аргументує накопичені нею експериментальні та наукові факти, порівнюючи їх із результатами досліджень інших науковців.

Висновки (с. 143–144). У цьому розділі наведено 7 висновків, що відповідають поставленим завданням та відображають основний зміст дисертації.

Пропозиції виробництву (с. 145) викладено у чотирьох пунктах, спрямованих на роботу лікарів ветеринарної медицини, працівників лабораторій та на використання в навчальному процесі.

Список використаних джерел (с. 146–174) налічує 207 літературних джерел. Значна частина першоджерел, використаних у дисертації, опублікована протягом останнього десятиріччя.

Додатки (с. 175–184) містять патент на розроблену тест-систему (додаток А), карту зворотного зв'язку та акти впровадження результатів дисертації у навчальний процес та у виробництво (додаток Б), список публікацій дисертантки (додаток В).

Практичне значення результатів полягає у вдосконаленні діагностики африканської чуми свиней шляхом розробки ефективних серологічних та молекулярно-генетичних

методів. Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо виготовлення та застосування ПЛР-тест-системи «Sui DNA test ASF virus» для виявлення ДНК вірусу АЧС у режимі реального часу (патент України № 133163). Підготовлено й подано до реєстрації патент на корисну модель щодо способу отримання рекомбінантного антигену р32 для ІФА-діагностики АЧС.

Також розроблено та затверджено методичні рекомендації з детекції ДНК вірусу АЧС методом петльової ізотермічної ампліфікації й отримання рекомбінантного антигену р32 (затверджено на засіданнях методичної комісії ННЦ «ІЕКВМ», протоколи № 3 від 03.11.2021 та № 8 від 23.10.2024). Удосконалено серологічні (ІФА) та молекулярно-генетичні (ПЛР, LAMP) методи діагностики АЧС, оптимізовано відбір і дослідження ротової рідини від диких свиней. Результати рекомендовані до впровадження у ветеринарну практику, освітній процес і наукові дослідження у сфері ветеринарної медицини, біології та біотехнології.

Апробація результатів досліджень, повнота їх викладення в опублікованих працях. Основні результати досліджень дисертації попередньо апробовано на: 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. Дисертантка особисто провела основний обсяг пошукових та експериментальних досліджень, аналіз, трактування та узагальнення отриманих результатів, статистичний аналіз даних, формулювання висновків, а також оформлення рукопису дисертації.

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

1. У серологічному розділі зазначено, що білок р54ΔTM позитивно реагує як з позитивною, так і з негативною сироваткою. Чи не варто було б дослідити вплив видалення

трансмембранного домену на експозицію неспецифічних епітопів за допомогою *in silico* моделювання або додаткових специфікаційних тестів?

2. Розроблена LAMP-методика показала високу специфічність у лабораторних умовах. Чи порівнювалися результати LAMP-ампліфікації та ПЛР безпосередньо на польових зразках без очистки, щоб оцінити практичну надійність методу?

3. Розробка тест-системи базується на ділянці гена b646l. Чи проводився *in silico* аналіз консервативності сайту гібридизації праймерів серед повногеномних послідовностей штамів з різних регіонів, зокрема новіших із країн Азії?

4. У дослідженні ротової рідини не зазначено, чи враховано повторні контакти однієї особи з різними приманками. Це могло вплинути на частоту виявлення і варто було б уточнити у методології відбору.

Усі зазначені зауваження мають дискусійний характер і не знижують загального високого наукового та практичного рівня дисертаційної роботи та цінності одержаних результатів та методичного рівня виконаної дисертації.

Висновок. Дисертанткою 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 авторка Кіт Марина Юріївна заслуговує на присудження ступеня доктора філософії зі спеціальності 091 «Біологія та біохімія» галузі знань 09 «Біологія».

Офіційний опонент

завідувач лабораторії імунобіології

Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна Національної академії наук України,

доктор біологічних наук, професор

член-кор. НАН України

Денис КОЛИБО

