Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна
Національної академії наук України
16 БЕР 2021
№ 111/03-07
Карлова Н.П.

ВІДГУК ОФІЦІЙНОГО ОПОНЕНТА

на дисертацію Зленко Оксани Борисівни «Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і генотипування збудника», подану до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки) до спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна МОН України.

Актуальність обраної теми дисертації.

Туляремія - це зоонозна природно-осередкова інфекція, що викликається грам-негативною, неспоровою бактерією *Francisella tularensis*. Природні осередки туляремії є дуже стійкими, вони можуть існувати століттями. У деяких країнах існують ендемічні регіони, де виникають спалахи захворювання, поряд з регіонами, де туляремія ніколи не виникала. Особливої уваги слід приділяти збуднику туляремії також через те, що він може бути використаний як біологічна зброя. Так само туляремія відноситься до розряду професійних ризиків для працівників сільського та лісового господарств.

Перші офіційні випадки туляремії в Україні було зареєстровано в 40х роках XX сторіччя. Вони були пов'язані з професійним інфікуванням працівників хутряних та цукрових виробництв. У 1948-1949 р. смертельні випадки від туляремії були зареєстровані на території всіх областей країни. В 1960 р. захворюваність на туляремію різко знизилася в результаті виявлення природних осередків і проведення в них спеціальних заходів органів охорони здоров'я, а саме: вакцинації людей, що проживають у природних вогнищах, та зменшення популяцій щурів. Таким чином, правильна і швидка діагностика туляремії, а також постійний моніторинг стану природних осередків є ключовим засобом запобігання виникнення нових масштабних спалахів.

Наразі бракує вітчизняних тест-систем для ідентифікації збудника туляремії, тож розробка та вдосконалення методів діагностики на основі

полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу є перспективним напрямком досліджень.

Дисертаційна робота Зленко Оксани Борисівни «Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і генотипування збудника» присвячена розробці методу ІФА для діагностики туляремії на основі рекомбінантних антигенів шляхом дослідження сироваток крові від кабанів та людини, конструюванню позитивного контролю для проведення ПЛР щодо наявності генетичного матеріалу збудника туляремії у клінічних зразках і зразках середовища, проведенню молекулярно-генетичного скринінгу та серомоніторингу епідеміологічного з туляремії в Україні, а також філогенетичним дослідженням ізолятів *F.tularensis*, виділених на території України.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано у відділі молекулярної діагностики і епізоотології ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» відповідно до аспірантського плану наукових досліджень, затвердженого Національною академією наук України, та у рамках завдання 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), а також за підтримки Інституту Мікробіології Бундесверу та GIZ Gmbh у рамках проекту «Україно-німецька ініціатива «Біологічна безпека з управління зоонозними ризиками на територіях, розташованих біля зовнішніх кордонів країн-членів Європейського союзу» (2016-2019 рр., номер держреєстрації 16.9072.6-007.04.)

Наукова новизна дослідження та отриманих результатів. Наукові положення, висновки та рекомендації, сформульовані в дисертації, збагачують рівень знань щодо використання рекомбінантних біотехнологій,

перспективних для біотехнологічних виробництв, а також щодо епідеміологічної ситуації і філогенетичного з туляремії на території України.

Уперше в Україні розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантних антигенів на основі протеїнів GroEl, SucB, FTT0975 для ідентифікації антитіл проти збудника туляремії у сироватках крові від свині та людини методом ІФА, а також розроблено і доведено ефективність використання рекомбінантного позитивного контролю для ідентифікації генетичного матеріалу *F.tularensis* методом ПЛР. Новизна зазначених розробок підтверджена 3 патентами України на корисну модель.

Вперше на території України був проведений серомоніторинг щодо туляремійної інфекції серед диких кабанів (*Suc scrofa*), у ході якого було встановлено наявність антитіл до *F.tularensis* серед диких кабанів в 12 областях України. Найбільший відсоток позитивності до *F.tularensis* було виявлено в Чернівецькій (50%), Хмельницькій (41,2%), Чернігівській (33,3%) і Харківській (21%) областях України.

Отримані нові дані з епізоотологічного стану щодо туляремії на територіях Харківської, Дніпропетровської і Миколаївської областей у результаті проведення епізоотичного скринінгу з використанням молекулярно-генетичних методів і з відбором різноманітного польового матеріалу (зразки від гризунів, кліщі та об'єкти середовища). Було підтверджено циркуляцію *F.tularensis* на територіях Харківської (23% зразків було позитивними), Дніпропетровської (1,9% зразки було позитивними) і Миколаївської областей (0,4% зразки було позитивними). Встановлено, що частота виявлення генетичного матеріалу *F. tularensis* найвища серед зразків кліщів родини *Ixodidae*.

Вперше при використанні методу MLVA проведено генотипування 20 українських ізолятів *F.tularensis* за 12 локусами, внаслідок чого визначені їх генотипи та спорідненість з іншими генетично подібними популяціями. Встановлено генотип *F.tularensis*, що був віднесений до «європейського» кластеру, який превалював впродовж 10 років у більшості областей України.

Практичне значення отриманих результатів.

Отримані результати розширюють і поглиблюють існуючі знання щодо серологічної та молекулярно-генетичної діагностики туляремії.

Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо способу отримання рекомбінантних протеїнів, деклараційний патент України на корисну модель № UA 143739 «Спосіб отримання рекомбінантних антигенів GroElFTT, FTT0975, SucBFTT для діагностики туляремії за допомогою ІФА», а також виготовлення, контролювання та застосування ПЛР-тест-системи з рекомбінантним позитивним контролем для виявлення ДНК збудника туляремії, деклараційний патент України на корисну модель № UA 135803 «Рекомбінантний контрольний зразок для виявлення ДНК збудника туляремії методом полімеразної ланцюгової реакції pTZ57R/T_FTFP» і №UA 133254 «Тест-система для виявлення ДНК збудника туляремії за допомогою полімеразної ланцюгової реакції "Tul-DNA-test"».

Результати роботи покладені у «Методичні рекомендації щодо лабораторної діагностики туляремії методами полімеразної ланцюгової реакції та імуноферментного аналізу», розглянуті та схвалені методкомісією ННЦ «ІЕКВМ», протокол № 3 від 6.11.2019 р., та затверджені Науково-методичною радою Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів (протокол № 1 від 11.04.2020 р.).

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

В роботі використані сучасні методи досліджень, адекватні до поставлених завдань.

Статистичну обробку та порівняння отриманих результатів проводили за допомогою сучасних інформативних методів математичної статистики. Було використано методи описової статистики (стандартне відхилення, коефіцієнти варіативності) регресійного аналізу (лінійна модель), аналізу

відповідностей та кластерного аналізу (метод невиваженого попарного середнього).

Результати дослідження добре аргументовані, фактичні дані зведені у порівняльних таблицях та рисунках. Висновки відображають всі закономірності, які виявлені в процесі проведеного статистичного аналізу. Отримані нові дані, які мають наукову та практичну значимість, тому дана дисертаційна робота заслуговує позитивної оцінки.

Оцінка дисертації щодо її змісту та оформлення. Дисертаційна робота О. Б. Зленко оформлена стандартним чином згідно з традиційними принципами та відповідає вимогам до дисертацій.

Дисертація викладена на 131 сторінці комп'ютерного тексту та ілюстровано 12 таблицями і 32 рисунками. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів та їх обговорення, висновків, списку джерел літератури, який містить 130 найменувань, та додатків.

Текст дисертації, як за змістом, так і редакційно викладено і оформлено здобувачем якісно, назва роботи повністю відповідає меті та основному змісту дисертаційної роботи. Викладення основних положень роботи за стилем та термінологією заслуговує високої оцінки. Фактичний матеріал таблиць і графіків вміщує достатню кількість інформації.

У вступі достатньо переконливо визначена актуальність проблеми, обґрунтовано доцільність власних досліджень, вказано їх зв'язок з плановими НДР. Зазначено особистий внесок здобувача. Наведено відомості щодо апробації результатів дисертаційного дослідження та їх публікації, які свідчать про достатній рівень обговорення матеріалів роботи.

В **огляді літератури** описано загальну характеристику збудника туляремії, таксономічне положення, генетичні і епідеміологічні властивості, поширеність в Україні і світі, а також порівняно основні методи діагностики туляремії, наведено їх переваги і недоліки.

У другому розділі (матеріали і методи дослідження) автором ретельно описані використані в роботі методи дослідження, які відповідають поставленим завданням.

Слід підкреслити, що викладення цього розділу роботи свідчить про самостійне оволодіння дисертанткою всіма необхідними для здійснення даної роботи методами експериментального дослідження.

У третьому розділі Зленко Оксаною Борисівною викладаються результати власних досліджень, які складалися з п'яти етапів.

На першому етапі експерименту розробляли 3 рекомбінантні антигени для визначення антитіл щодо збудника туляремії у сироватках крові від свиней та від людей методом ІФА.

Дисертанткою було підтверджено ефективність використання рекомбінантних протеїнів GroEl і SucB у якості антигенів в ІФА щодо антитіл проти збудника туляремії у сироватках від свиней (чутливість обох методів становила 100%, специфічність 75,5% для ІФА, заснованого на протеїні SucB і 75% для ІФА, заснованого на протеїні GroEl), підтверджено їх антигенні властивості при дослідженні сироваток від людей, а також визначено оптимальні концентрації антигенів і сироваток для проведення досліджень. Протеїн FTT0975 було рекомендовано використовувати як антиген при проведенні непрямого ІФА для диференціації підтипів *F. tularensis*.

На другому етапі роботи було сконструйовано позитивний контрольний зразок на основі плазмідного вектору pTZ57F_R_FTFP зі вставкою гена *F.tularensis tul4.*

Дисертанткою було доведено можливість використання вектору в якості позитивного контрольного зразку для визначення генетичного матеріалу збудника туляремії методом ПЛР. Аналітична чутливість реакції становила одну копію в мікролітрі (п'ять копій на реакцію).

На третьому етапі роботи було проведено ПЛР-дослідження наявності генетичного матеріалу збудника туляремії у зразках від гризунів, кліщів та середовища.

Зленко О. Б. було встановлено, що в Харківській області 23% відібраних зразків були позитивними, у Дніпропетровській області 1,9%, і в Миколаївській області 0,4%. За результатами аналізу відповідностей, найчастіше збудника туляремії виявляли у кліщах *D. reticulatus* та *I. ricinus* (*Ixodidae*) (74,2% і 29,3% відповідно).

Четвертий етап роботи був присвячений серологічним дослідженням диких кабанів України щодо анти-туляремійних антитіл.

Дисертанткою було виявлено 87 (12,3 %) серопозитивних тварин з 701 досліджених. Основна кількість позитивних зразків припала на Чернівецьку (33,9 %) та Хмельницьку (30,6 %) області.

П'ятим, і останнім етапом роботи було MLVA-типування 20 ізолятів *F. tularensis*, зібраних на території України впродовж 1997-2016 р.

Дисертанткою було встановлено, що всі вони належать до голарктичного підтипу. Було виявлено 3 підтипи, із яких провідним був підтип, що циркулює на всій території України впродовж 10 років, до нього належало 14 ізолятів.

У **четвертому розділі** Зленко О. Б. послідовно викладені обговорення результатів всіх п'яти етапів дисертаційної роботи. В обговореннях дисертантка порівнює отримані результати з результатами Вітчизняних та зарубіжних дослідників та наводить їх авторське трактування.

Робота логічно завершується 6 висновками, які повністю відображають одержані результати проведених досліджень.

Повнота викладу матеріалів дисертації в опублікованих наукових працях та авторефераті.

Основні наукові положення, висновки та одержані результати досліджень опубліковано у 17 наукових працях, із яких 5 – у фахових виданнях України, одна – у зарубіжному фаховому виданні (Скопус), одні

методичні рекомендації а також 3 описи до деклараційних патентів України на корисну модель. Опубліковані роботи відповідають вимогам до публікацій результатів дисертацій на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук.

Апробацію результатів дисертаційної роботи здійснено у формі доповідей і тез на низці міжнародних науково-практичних конференцій.

Автореферат має всі необхідні розділи та за змістом повністю відповідає основним положенням і висновкам, наведеним у дисертації.

Недоліки дисертації та автореферату щодо їх змісту та оформлення.

Принципових зауважень до змісту та оформлення дисертації та автореферату немає, хоча вони й не позбавлені окремих технічних недоліків.

1. У літературному огляді та авторефераті допущена невелика кількість друкарських помилок.

2. У дисертації вказано, що серологічні дослідження проводили із використанням сироваток свиней та диких кабанів. Не зрозуміло, чи є між цими сироватками принципова різниця.

3. У дисертації вказано, що використання вектору pET26b+ не дозволило отримати протеїни достатньої чистоти, придатної для подальшого проведення непрямого ІФА, але не наведено конкретних значень.

4. Частину інформації, наведену у розділі «Результати досліджень», а саме опис схеми відбору оптимальних концентрацій при проведенні ІФА з рекомбінантними антигенами, необхідно було перенести у розділ «Матеріали і методи»

Після ознайомлення з дисертацією та аналізу результатів досліджень виникли наступні запитання, які слід обговорити під час прилюдного захисту:

1. Чим можна пояснити, що розроблені протеїни мали різні антигенні властивості при дослідженні сироваток від свиней та від людей?

Вказані запитання є суто дискусійними і аж ніяк не зменшують високу оцінку дисертації та значимість отриманих результатів, а напроти, відбивають цікавість роботи.

Висновок про відповідність дисертації встановленим вимогам. Дисертаційна робота Зленко Оксани Борисівни «Лабораторна діагностика туляремії (імуноферментний аналіз та полімеразна ланцюгова реакція), епізоотологічний моніторинг і генотипування збудника», є самостійною, завершеною науково-дослідною працею, що містить нові науково обґрунтовані результати проведених особисто здобувачем досліджень, які розв'язують важливу наукову проблему: дослідження поширення *F.tularensis* на території України та вдосконалення методів її лабораторної діагностики.

Таким чином, дисертація повністю відповідає вимогам «Порядку присудження наукових ступенів», затвердженого Постановою Кабінету Міністрів України від 24. 07. 2013 року, № 567, зі змінами відповідно до постанови Кабінету Міністрів України № 656 від 19 серпня 2015 р. та наказу Міністерства освіти і науки України № 40 від 12. 01. 2017 року, рекомендувати її до захисту на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія (біологічні науки).

Офіційний опонент:

професор кафедри органічного синтезу і нанотехнологій
Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут» МОН України
доктор біологічних наук Кричковська Л.В.