

Андрій Завгородній, доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН України, завідувач відділу вивчення туберкульозу та бруцельозу ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0000-0003-3563-0478,
email: andrii.i.zavgorodnii@gmail.com

Віктор Білушко, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0000-0002-5689-6745
email: bw.pochta@gmail.com

Світлана Позмогова, кандидат ветеринарних наук, провідний науковий співробітник лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0000-0002-7228-8811
email: svetlanapozmogova@gmail.com

Артем Ушкалов, кандидат ветеринарних наук, старший науковий співробітник лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0000-0001-8317-7909
vetdocman@gmail.com

Анатолій Палій, доктор ветеринарних наук, професор, директор ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0000-0002-9193-3548
email: paliy.dok@gmail.com

Каріна Свірідова, аспірант, лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків, Україна

ORCID ID: 0009-0000-0600-2224
email: karinasviridova12@gmail.com

ПЕРЕДПОСІВНА ОБРОБКА БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

Мета. Розробити оптимальний спосіб передпосівної обробки патологічного матеріалу при дослідженні на туберкульоз, який максимально забезпечує збереження життєздатності мікобактерій і високу їх висіваємість на поживному середовищі, а також стерильність висівів. **Методи.** Культуральний, бактеріологічний, патологоанатомічний. **Результати.** На підставі проведених досліджень було встановлено, що при використанні в якості деконтамінуючої речовини розчину мурашиної кислоти в концентрації 0,25 % за експозиції 15 хвилин виявляли ріст культур в 100 % висіяних пробірок за відсутності росту нецільової мікрофлори. Чистоту виділених культур було підтверджено шляхом мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Циля-Нільсена. За меншої концентрації мурашиної кислоти (0,2 %) при передпосівній обробці патологічного матеріалу у 10-50 % пробірок спостерігали контамінацію посівів. Збільшення концентрації мурашиної кислоти до 0,5 % суттєво пригнічувало ріст культур мікобактерій за відсутності контамінації висівів секундарною мікрофлорою. **Практична цінність.** Запропонований спосіб передпосівної обробки патологічного матеріалу може бути використаний у практиці ветеринарних лабораторій для підвищення ефективності бактеріологічної діагностики туберкульозу. Його застосування забезпечує отримання чистих культур мікобактерій у коротші терміни, підвищує достовірність результатів досліджень, зменшує ризик контамінації посівів та дозволяє своєчасно встановлювати діагноз і проводити оздоровчі заходи у тваринницьких господарствах. **Висновки.** Результати проведених досліджень свідчать, що використання запропонованого способу передпосівної обробки патологічного матеріалу 0,25 % розчином мурашиної кислоти за експозиції 15 хвилин забезпечує стовідсоткову висіваємість культур мікобактерій на поживному середовищі за відсутності росту нецільової мікрофлори.

Ключові слова: туберкульоз, *M. avium*, *M. bovis*, діагностика, патологічний матеріал, спосіб, мурашина кислота.

Туберкульоз належить до особливо небезпечних інфекційних захворювань і є одним із найбільш значущих бактеріальних зоонозів, що становить серйозну загрозу здоров'ю людей і тварин. Інфекційні хвороби заразної етіології, зокрема туберкульоз, завдають суттєвих збитків спеціалізованим тваринницьким господарствам, негативно впливаючи як на епізоотичну ситуацію, так і на економіку держави загалом. Економічні втрати зумовлені вимушеним забоєм тварин і зниженням їх племінної цінності, недоотриманням продукції та приплоду, а також значними витратами на проведення діагностичних, профілактичних і ветеринарно-санітарних заходів. [1-5].

З метою своєчасного з'ясування епізоотичної ситуації та контролю благополуччя стад в господарствах у плановому порядку проводять діагностичні дослідження ВРХ на туберкульоз.

Кількість господарств в Україні, де виявляють тварин з параалергічними реакціями на туберкулін, невпинно зростає, а це, в свою чергу, значно ускладнює життєву діагностику туберкульозу [6, 7]. Тому вивчення етіологічних чинників виникнення таких неспецифічних реакцій та удосконалення системи діагностики в цілому є надзвичайно актуальними питаннями сьогодення [8].

Під час постановки діагнозу на туберкульоз, коли у забитих тварин не виявляють патологоанатомічних змін, характерних для цього захворювання або якщо ці зміни не чітко виражені, проводять бактеріологічне дослідження, яке є одним з найважливіших складових діагностичного процесу, а результати цього дослідження, в свою чергу, ґрунтуються на ефективності методу і способів

передпосівної обробки біологічного матеріалу, відібраного від тварин, забитих з діагностичною метою [9, 10].

Результативність культурального дослідження багато в чому залежить від правильного відбору, транспортування і обробки біоматеріалу, якості поживного середовища, яке використовується для культурального дослідження, а також кількості життєздатних мікобактерій в біологічному матеріалі.

Оскільки зразки біологічного матеріалу, які надходять для бактеріологічного дослідження, містять певну кількість супутньої мікрофлори, при культивуванні збудника туберкульозу на живильному середовищі вони досить швидко розмножуються, чим інгібують ріст і розвиток мікобактерій [11]. Тому досліджувані зразки біоматеріалу піддаються спеціальній передпосівній обробці, яка включає подрібнення біологічного матеріалу для вивільнення мікобактерій із тканин і клітин та деконтамінацію від нецільової мікрофлори.

Препарати, які використовуються на сьогодні для очищення діагностичного матеріалу, проявляють достатньо агресивну дію на мікобактерії та є досить токсичними для них, тому необхідно використовувати такі методи обробки, які б, з одного боку, дозволяли зберегти максимальну кількість життєздатних мікобактерій в біологічному матеріалі, а з іншого – забезпечили б достатню бактерицидну дію на контамінуючу секундарну мікрофлору [12].

В ветеринарній медицині широко поширений спосіб передпосівної обробки біологічного матеріалу за методом А.П. Алікаєвої. Недоліком цього методу є недостатня бактерицидна дія сірчаної кислоти, яка використовується, на сапрофітну мікрофлору, що призводить до контамінації посівів і негативно впливає на достовірність результатів дослідження.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Ефективність бактеріологічної діагностики туберкульозу у людини та тварин значною мірою залежить від якості передпосівної обробки дослідного матеріалу, що зумовлює необхідність постійного вдосконалення методів деконтамінації та підготовки зразків. Сучасні наукові дослідження спрямовані на пошук оптимального співвідношення між пригніченням супутньої мікрофлори та збереженням життєздатності мікобактерій.

У роботі Correa-Valencia N.M. [13] узагальнено сучасні підходи до деконтамінації фекальних та екологічних зразків великої рогатої худоби при дослідженні на *M. avium subsp. paratuberculosis*. Автором встановлено, що використання агресивних хімічних реагентів негативно впливає на життєздатність збудника, що призводить до зниження його висіваємості. Підкреслено, що оптимізація концентрації деконтамінуючих речовин і тривалості експозиції є ключовим чинником підвищення ефективності культуральної діагностики.

Аналогічної думки дотримуються Dane H. et. al. [14], які у своєму огляді зазначають, що передпосівна обробка є одним із критичних етапів культивування *M. avium subsp. paratuberculosis*. Автори наголошують, що вибір методу підготовки матеріалу повинен враховувати тип досліджуваного зразка (тканини,

фекалії, молоко), а також рівень його контамінації, оскільки універсального підходу не існує.

У дослідженні Prajwal P. et. al. [15] показано, що стандартні методи деконтамінації, які широко застосовуються в лабораторній практиці, можуть призводити до значної втрати мікобактеріальної ДНК. Це негативно впливає не лише на культуральні дослідження, але й на чутливість молекулярних методів діагностики. Автори підкреслюють необхідність розробки більш щадних методів передпосівної обробки матеріалу.

Результати досліджень Bruczyńska M. et. al. [16], присвячених мікобактеріозам у тварин, у тому числі птиці, підтверджують важливість правильно підібраної деконтамінації фекальних зразків. Встановлено, що ефективність виділення *M. avium* безпосередньо залежить від якості попередньої обробки матеріалу, що впливає на точність діагностики у популяціях тварин.

У роботі Lienhard J. et. al. [17] детально описано підходи до підготовки тканинних зразків, зокрема лімфатичних вузлів, при діагностиці туберкульозу у тварин. Показано, що поєднання ефективною гомогенізації матеріалу з оптимальною деконтамінацією дозволяє суттєво знизити рівень контамінації посівів та підвищити вихід чистих культур мікобактерій.

Важливу роль у підвищенні ефективності культурального методу відіграють також фізичні методи обробки матеріалу. Зокрема, Chaula G.T. et. al. [18] встановили, що оптимізація режимів центрифугування сприяє більш ефективному осадженню мікобактерій та підвищує їх відновлення при посіві, що позитивно впливає на чутливість діагностики.

Перспективним напрямом є використання комбінованих методів обробки. Так, у дослідженні Wang J. et. al. [19] запропоновано застосування ультразвукової обробки біологічного матеріалу, що сприяє кращому вивільненню мікобактерій із тканин і підвищує їх висіваємість при культуральному дослідженні.

Таким чином, аналіз сучасних наукових публікацій свідчить, що ключовою проблемою передпосівної обробки матеріалу при бактеріологічній діагностиці туберкульозу є необхідність досягнення балансу між ефективною деконтамінацією та збереженням життєздатності мікобактерій. Незважаючи на значну кількість запропонованих методів, питання оптимізації складу деконтамінуючих розчинів і режимів їх застосування залишається актуальним, що обґрунтовує доцільність проведення подальших досліджень у цьому напрямі.

Мета. Розробити та експериментально обґрунтувати оптимальний спосіб передпосівної обробки патологічного матеріалу при бактеріологічному дослідженні на туберкульоз, який забезпечує максимальне збереження життєздатності мікобактерій, їх високу висіваємість на поживних середовищах і ефективну деконтамінацію супутньої мікрофлори. Визначити вплив різних концентрацій мурашиної кислоти та тривалості експозиції на ріст референтних штамів мікобактерій і результати культивування з патологічного матеріалу різного походження, а також провести порівняльну оцінку запропонованого

способу з традиційними методами передпосівної обробки за показниками ефективності, стерильності висівів і термінів отримання первинних культур.

Виклад основного матеріалу дослідження. Першим етапом дослідження було визначення впливу 0,2 %, 0,25 % та 0,5 % розчину мурашиної кислоти за експозиції 10, 15, 20 і 30 хв. на життєздатність референтних штамів мікобактерій *M. bovis*, *M. avium*, які зберігаються в колекції культур лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ». Для цього з бактеріальної маси, вирощеної на картопляному середовищі Павловського, готували завись культур в концентрації 1 мг/см³. Отриману гомогенну суспензію відбирали стерильною бактеріологічною піпеткою у центрифужні пробірки та центрифугували за 3000 об./хв. протягом 15 хвилин. Отриманий супернатант зливали, а до осаду окремо додавали 0,2 %, 0,25 % та 0,5 % розчин мурашиної кислоти і витримували за кімнатної температури протягом 10, 15, 20 та 30 хвилин відповідно та центрифугували при 3000 об./хв.. Після цього надосадову рідину зливали, а отриманий осад двічі відмивали від залишків кислоти стерильним 0,85 % розчином натрію хлориду шляхом центрифугування за 3000 об./хв. протягом 15 хв. Після відмивання отриманий осад ресуспендували зі стерильним 0,85 % розчином натрію хлориду, ретельно перемішуючи піпеткою, та висівали по 0,5 см³ гомогенізату на кожну пробірку для висіву на поживне яєчне середовище. Пробірки з висівами інкубували в термостаті за температури 37,5±0,5°C впродовж 90 діб. Облік росту культур мікобактерій проводили через кожні сім діб. Показники росту після дії мурашиної кислоти порівнювали з ростом культур, які не піддавали її впливу.

Наступним етапом було визначення ефективності способу передпосівної обробки проб патологічного матеріалу (лімфатичні вузли, печінка, селезінка, легені) від експериментально заражених морських свинок (*M. bovis*), ВРХ (*M. bovis*) та кролів (*M. avium*). Досліджувані зразки органів поміщали у стерильну фарфорову ступку, після чого подрібнювали ножицями на шматочки розміром 0,3-0,5 см³. До подрібненого патологічного матеріалу додавали мурашину кислоту в концентрації 0,2 %, 0,25 % та 0,5 % у співвідношенні 1:3. Ступки накривали пергаментним папером та витримували за кімнатної температури при експозиції 10, 15 і 20 хв.. Після цього мурашину кислоту зливали, а шматочки патматеріалу відмивали від залишків мурашиної кислоти стерильним фізіологічним розчином у співвідношенні 1:5 та через 10 хв. надосадову рідину зливали, а шматочки органів гомогенізували шляхом їх розтирання зі стерильним піском. До отриманого гомогенізату додавали стерильний 0,85 % розчин натрію хлориду (1:5), перемішували і залишали на 5-7 хв. для осадження піску. Після цього стерильною піпеткою відбирали 10 см³ надосадової рідини та центрифугували при 3000 об./хв. протягом 15 хвилин. Осад ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині та висівали на щільне яєчне середовище. В якості контролю патологічний матеріал обробляли за методом А.П. Алікаєвої 5,0 % сірчаною кислотою за експозиції 20 хв. Пробірки з висівами інкубували у термостаті за температури 37±0,5 °C впродовж 90 діб. Облік росту колоній проводили через кожні сім діб.

При виконанні експериментальних досліджень, приведених в роботі, всі маніпуляції з тваринами, задіяними в дослідженнях, проводили з урахуванням основних принципів біоетики відповідно до Статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження», Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (1986) та «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (2012).

На підставі проведених досліджень впливу мурашиної кислоти на референтні штами мікобактерій було встановлено, що найбільш інтенсивний ріст колоній *M. bovis* та *M. avium* спостерігали при використанні мурашиної кислоти в концентрації 0,2 % за експозиції 10, 15, 20 і 30 хв. та в концентрації 0,25 % за експозиції 10 і 15 хв., а також у контрольних пробах.

Незначну затримку росту колоній мікобактерій спостерігали при використанні 0,25 % розчину мурашиної кислоти за експозиції 20 і 30 хв. та 0,5 % розчину, в якому культура *M. bovis* витримувалась протягом 10 і 15 хв., а культура *M. avium* – протягом 10, 15 і 20 хв. Найбільший інгібуючий вплив на референтні штами культур мікобактерій виявляли при використанні розчину мурашиної кислоти в концентрації 0,5 % за експозиції 20 і 30 хв. (відносно *M. bovis*) та за експозиції 30 хв. (відносно *M. avium*). У порівнянні з ростом не оброблених детергентом музейних штамів *M. bovis* та *M. avium* (контроль), ріст після дії препарату спостерігали з різницею у три доби.

Появу перших колоній *M. bovis* у контрольних пробірках виявляли на тринадцяту добу, а після витримки культури мікобактерій у 0,2 % розчині мурашиної кислоти протягом 10 хв. – на шістнадцяту добу відповідно. Перші колонії *M. avium* у контролі виростили на десяту добу, а після дії мурашиної кислоти за мінімальних параметрів концентрації та експозиції (0,2 % протягом 10 хв.) – на тринадцяту добу.

Результати передпосівної обробки патологічного матеріалу, відібраного від експериментально заражених лабораторних тварин, мурашиною кислотою в порівнянні з методом А.П. Алікаєвої наведено в таблиці 1.

Табл. 1

Результати культурального дослідження проб патологічного матеріалу

Патологічний матеріал від	Мурашина кислота, %									H ₂ SO ₄ , %
	0,2			0,25			0,5			5,0
	Експозиція, хв.									
	10	15	20	10	15	20	10	15	20	20
Кількість пробірок з ростом мікобактерій/контамінованих, (%)										
Кролі (<i>M. avium</i>)	50/50	80/20	90/10	90/10	100/-	90/-	80/-	20/-	10/-	90/10
Морські свинки (<i>M. bovis</i>)	50/50	80/20	90/10	90/10	100/-	90/-	80/-	30/-	10/-	90/10
ВРХ (<i>M. bovis</i>)	50/50	70/30	90/10	90/10	100/-	70/-	50/-	10/-	-/-	90/10
Інтенсивність росту колоній через 30 діб										

	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	+++
Примітки. «+» - ріст від 1 до 10 колоній; «++» - 10-20 колоній; «+++» - 20-30 колоній; «-» - відсутність росту.										

Дані таблиці – результати досліджень авторів.

Як видно з матеріалів, наведених в таблиці 1, при використанні мурашиної кислоти в концентрації 0,2 % за експозиції 10 хв. ріст колоній мікобактерій спостерігали у 50 % пробірок, при цьому контамінація посівів секундарною мікрофлорою була встановлена у 50 % висіяних пробірок. За експозиції 15 хв. ріст колоній *M. bovis* та *M. avium* спостерігався у 70-80 % пробірок, а кількість контамінованих пробірок дещо знизилась (20-30 %).

Використовуючи мурашину кислоту в концентрації 0,2 % за експозиції 20 хв. та в концентрації 0,25 % за експозиції 10 хв., ріст колоній мікобактерій виявляли у 90 % пробірок, а контамінація посівів складала 10 % висіяних пробірок.

При збільшенні концентрації мурашиної кислоти до 0,5 % росту сторонньої мікрофлори не спостерігали, а ріст колоній мікобактерій дещо пригнічувався: за експозиції 10 хв. колонії *M. bovis* з патматеріалу від морських свинок та колонії *M. avium* з патматеріалу від кролів виростили у 80 % пробірок, а колонії *M. bovis* з патматеріалу, одержаного від ВРХ – у 50 %. За експозиції 15 хв. ріст колоній *M. bovis* (морські свинки), *M. avium* (кролі), *M. bovis* (ВРХ) виявляли у 30 %, 20 % та 10 % пробірок відповідно. За експозиції 20 хв. ріст культур мікобактерій, виділених з патматеріалу від морських свинок та кролів, спостерігався лише у 10 % пробірок, а росту колоній *M. bovis* з патматеріалу, одержаного від ВРХ взагалі не було.

Враховуючи вищезазначене, встановлено, що оптимальні параметри (концентрація і експозиція) для передпосівної обробки патологічного матеріалу мав 0,25 % розчин мурашиної кислоти за експозиції 15 хвилин. При цьому ріст первинних колоній *M. bovis* на поживному середовищі відмічали на 18-21 добу, а *M. avium* – на 15-19 день, а за експозиції 10 хв. спостерігали контамінацію посівів (10 % пробірок), тоді як за експозиції 15-20 хв. росту нецільової мікрофлори виявлено не було.

Після обробки патматеріалу за методом А.П. Алікаєвої первинний ріст колоній *M. bovis* відмічали на 25-28 добу, а *M. avium* – на 16-20 добу. Ріст банальної мікрофлори відмічали у 10% пробірок. Чистоту виділених культур було підтверджено шляхом проведення мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Ціль-Нільсена.

Висновки. У результаті проведених експериментальних досліджень встановлено, що ефективність бактеріологічної діагностики туберкульозу значною мірою залежить від способу передпосівної обробки патологічного матеріалу, який повинен поєднувати достатню деконтамінуючу дію щодо супутньої мікрофлори з мінімальним впливом на життєздатність мікобактерій. Доведено, що застосування мурашиної кислоти як деконтамінуючого агента має виражений дозо- та часовозалежний ефект.

Встановлено, що використання 0,2 % розчину мурашиної кислоти не забезпечує належної деконтамінації патологічного матеріалу, що проявляється контамінацією посівів у 10–50 % випадків. Підвищення концентрації до 0,5 % повністю пригнічує ріст сторонньої мікрофлори, проте супроводжується суттєвим інгібуванням росту культур мікобактерій, що знижує їх висіваємість. Оптимальними параметрами передпосівної обробки визначено використання 0,25 % розчину мурашиної кислоти за експозиції 15 хвилин, що забезпечує ріст мікобактерій у 100 % висіяних пробірок за повної відсутності контамінації.

Показано, що за зазначених умов забезпечується отримання первинних колоній у більш ранні терміни порівняно з традиційним методом обробки за А.П. Алікаєвою, а також досягається висока інтенсивність росту культур і їх морфологічна чистота, підтверджена мікроскопією мазків, пофарбованих за методом Циля–Нільсена.

Отримані результати свідчать, що запропонований спосіб передпосівної обробки патологічного матеріалу є ефективним, технологічно доступним і може бути рекомендований для впровадження у практику ветеринарних лабораторій з метою підвищення достовірності та оперативності бактеріологічної діагностики туберкульозу тварин.

Список використаної літератури

1. Завгородній А. І., Білушко В. В., Позмогова С. А., Калашник М. В., Бусол В. О. Проблеми діагностики туберкульозу великої рогатої худоби. *Ветеринарна медицина*. 2023. Вип. 109. С. 15–18. DOI: <https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-3>.
2. Ушкалов А. В. Поширення бактеріозів тварин в Харківській області у 2019–2022 роках. *Науковий вісник ветеринарної медицини*. 2023. № 2. С. 111–123. DOI: <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2023-184-2-111-123>.
3. Gombo T. R., Shrestha A., Ranjit E., Gautam B., Ale K., Shrestha S., Bhatta D. D. Risk factors of tuberculosis in human and its association with cattle tuberculosis in Nepal: a One Health approach. *One Health*. 2020. Vol. 10. P. 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100156>.
4. Youngkong S., Kamolwat P., Wongrot P., Thavorncharoensap M., Chaikledkaew U., Nateniyom S., Pungrassami P., Praditsitthikorn N., Mahasirimongkol S., Jittikoon J., Nishikiori N., Baena I. G., Yamanaka T. Catastrophic costs incurred by tuberculosis affected households from Thailand's first national tuberculosis patient cost survey. *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14(1). Article 11205. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56594-1>.
5. Borham M., Oreiby A., El-Gedawy A., Hegazy Y., Khalifa H. O., Al-Gaabary M., Matsumoto T. Review on bovine tuberculosis: an emerging disease associated with multidrug-resistant Mycobacterium species. *Pathogens*. 2022. Vol. 11(7). Article 715. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>.
6. Busol V., Boiko P., Bednarski M., Shevchuk V., Mazur V. Pathomorphological changes in the organs of the peripheral immune system in mycobacteriosis of cattle. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*. 2023. Vol. 14(2). P. 9–27. DOI: <https://doi.org/10.31548/veterinary2.2023.09>.
7. Kurtjak B. M., Shevchuk V. M., Suchomlin K. B., Vishchur O. I., Solovei L. M., Romanovich M. S., Rudenko O. P. Peculiarities of epizootological surveillance and control of

mycobacteriosis in productive animals in dairy farms of Ukraine. *Biolohtia tvarun*. 2024. Vol. 26(1). P. 17–23. DOI: <https://doi.org/10.15407/animbiol26.01.017>.

8. Дяченко Г. М., Кравченко Н. О. Досягнення і проблеми у діагностиці туберкульозу сільськогосподарських тварин. *Сільськогосподарська мікробіологія*. 2005. Т. 3. С. 81–92. DOI: <https://doi.org/10.35868/1997-3004.3.81-92>.

9. Хронічні інфекційні хвороби тварин: монографія / Л. Є. Корнієнко та ін.; за ред. Л. Є. Корнієнко. Біла Церква, 2008. 348 с.

10. Панівська О., Шевчук В. Порівняльна характеристика методів передпосівної обробки досліджуваного матеріалу з метою виділення мікобактерій. *Věda a perspektivy*. 2024. № 7(38). С. 267–278. DOI: [https://doi.org/10.52058/2695-1592-2024-7\(38\)-267-278](https://doi.org/10.52058/2695-1592-2024-7(38)-267-278).

11. Інструкція з мікробіологічної діагностики туберкульозу: затв. наказом Міністерства охорони здоров'я України від 27.06.2019 № 1462; зареєстр. у Міністерстві юстиції України 08.08.2019 за № 886/33857.

12. Журило О. А., Барбова А. І., Глушкевич Т. Г., Третьякова Л. В. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України: навч. посіб. Київ, 2012. 188 с.

13. Correa-Valencia N. M. Current approaches to decontamination of fecal and environmental samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Dairy and Veterinary Sciences Journal*. 2023. Vol. 15(3). DOI: <https://doi.org/10.19080/JDVS.2023.15.555917>.

14. Dane H., Stewart L. D., Grant I. R. Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: challenges, limitations and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*. 2023. Vol. 134(1). Article 1xac017. DOI: <https://doi.org/10.1093/jambio/1xac017>.

15. Prajwal P., Neary T., Rohrbach K., Bittel P., Göller P. C., Buch T., Dümcke S., Keller P. M. Optimizing mycobacteria molecular diagnostics: no decontamination, human DNA depletion, greener storage at 4 °C. *Frontiers in Microbiology*. 2023. Vol. 14. Article 1104752. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1104752>.

16. Bruczyńska M., Didkowska A., Brzezińska S., Nowak M., Filip-Hutsch K., Kalicki M., Augustynowicz-Kopeć E., Anusz K. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in asymptomatic zoo herbivores in Poland. *Animals*. 2023. Vol. 13(6). Article 1022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13061022>.

17. Lienhard J., Friedel U., Paganini C., Hilbe M., Scherrer S., Schmitt S. Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other non-tuberculous mycobacteria from head lymph nodes of wild ruminants and badgers in Switzerland. *Frontiers in Veterinary Science*. 2024. Vol. 10. Article 1321106. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1321106>.

18. Chaula G. T., Namkinga L., Mahadhy A., Sabiiti W., Ntinginya N. E., Mtafya B. High centrifugation speed improves recovery of *Mycobacterium tuberculosis* and yield of culture. *Tuberculosis*. 2025. Vol. 152. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2025.102633>.

19. Wang J. L., Zhang Z. J., Wang F., Chen M. K., Tian P., Wang X. F. A prospective study on enhanced recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children's stool using novel power ultrasound decontamination. *Scientific Reports*. 2025. Vol. 15(1). Article 13309. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98037-5>.

Andrii Zavorodnii, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Corresponding Member of the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Head of the Department for the Study of Tuberculosis and Brucellosis, National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0003-3563-0478

Viktor Bilushko, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher, Head of the Laboratory for the Study of Tuberculosis, National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-5689-6745
email: bw.pochta@gmail.com

Svitlana Pozmogova, Candidate of Veterinary Sciences, Leading Researcher of the Laboratory for the Study of Tuberculosis, National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-7228-8811
email: svetlanapozmogova@gmail.com

Artem Ushkalov, Candidate of Veterinary Sciences, Senior Researcher of the Laboratory for the Study of Tuberculosis, National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0001-8317-7909
email: vetdocman@gmail.com

Anatoliy Paliy, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Director of the National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0000-0002-9193-3548
email: paliy.dok@gmail.com

Karina Sviridova, Postgraduate Student of the Laboratory for the Study of Tuberculosis, National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine
ORCID ID: 0009-0000-0600-2224
email: karinasviridova12@gmail.com

PRE-CULTURING TREATMENT OF BIOLOGICAL MATERIAL IN TUBERCULOSIS TESTING

Abstract.

Objective. To develop an optimal method for pre-culturing treatment of pathological material in tuberculosis diagnostics that maximizes the preservation of mycobacterial viability and ensures high inoculation efficiency on nutrient media, as well as sterility of cultures. Methods. Cultural, bacteriological, and pathological. Results. Based on the conducted studies, it was established that using a 0.25% formic acid solution as a decontaminating agent with an exposure time of 15 minutes resulted in the growth of cultures in 100% of inoculated tubes with no growth of non-target microflora. The purity of the isolated cultures was confirmed by microscopy of smears stained by the Ziehl–Neelsen method. At a lower concentration of formic acid (0.2%), contamination of cultures was observed in 10–50% of tubes during pre-culturing treatment of pathological material. Increasing

the concentration of formic acid to 0.5% significantly inhibited the growth of mycobacterial cultures while preventing contamination by secondary microflora.

Practical value. The proposed method of pre-culturing treatment of pathological material can be used in veterinary laboratories to improve the efficiency of bacteriological diagnosis of tuberculosis. Its application ensures the isolation of pure mycobacterial cultures in shorter time, increases the reliability of diagnostic results, reduces the risk of contamination, and enables timely diagnosis and implementation of control measures in livestock farms.

Conclusions. The results of the study indicate that the use of a 0.25% formic acid solution with an exposure time of 15 minutes ensures 100% inoculation efficiency of mycobacterial cultures on nutrient media in the absence of non-target microflora growth.

Keywords: tuberculosis, *M. avium*, *M. bovis*, diagnostics, pathological material, method, formic acid.

References

1. Zavhorodnii, A. I., Bilushko, V. V., Pozmogova, S. A., Kalashnyk, M. V., & Busol, V. O. (2023). Problems of diagnosis of bovine tuberculosis [Problemy diahnostryky tuberkulezu velykoi rohatoi khudoby]. *Veterinarna Medytsyna*, 109, 15–18. <https://doi.org/10.36016/VM-2023-109-3>
2. Ushkalov, A. V. (2023). Spread of animal bacterioses in Kharkiv region in 2019–2022 [Poshyrennia bakterioziv tvaryn u Kharkivskii oblasti u 2019–2022 rokakh]. *Nauk. Visnyk Veterinarnoi Medytsyny*, 2, 111–123. <https://doi.org/10.33245/2310-4902-2023-184-2-111-123>
3. Gompo, T. R., Shrestha, A., Ranjit, E., Gautam, B., Ale, K., Shrestha, S., & Bhatta, D. D. (2020). Risk factors of tuberculosis in human and its association with cattle tuberculosis in Nepal: A One Health approach. *One Health*, 10, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100156>
4. Youngkong, S., Kamolwat, P., Wongrot, P., Thavorncharoensap, M., Chaikledkaew, U., Nateniyom, S., ... Yamanaka, T. (2024). Catastrophic costs incurred by tuberculosis affected households from Thailand's first national tuberculosis patient cost survey. *Scientific Reports*, 14(1), 11205. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56594-1>
5. Borham, M., Oreiby, A., El-Gedawy, A., Hegazy, Y., Khalifa, H. O., Al-Gaabary, M., & Matsumoto, T. (2022). Review on bovine tuberculosis: An emerging disease associated with multidrug-resistant *Mycobacterium* species. *Pathogens*, 11(7), 715. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070715>
6. Busol, V., Boiko, P., Bednarski, M., Shevchuk, V., & Mazur, V. (2023). Pathomorphological changes in the organs of the peripheral immune system in mycobacteriosis of cattle. *Ukrainian Journal of Veterinary Sciences*, 14(2), 9–27. <https://doi.org/10.31548/veterinary2.2023.09>
7. Kurtjak, B. M., Shevchuk, V. M., Suchomlin, K. B., Vishchur, O. I., Solovei, L. M., Romanovich, M. S., & Rudenko, O. P. (2024). Peculiarities of epizootological surveillance and control of mycobacteriosis in productive animals in dairy farms of Ukraine. *Bioloheia Tvaryn*, 26(1), 17–23. <https://doi.org/10.15407/animbiol26.01.017>
8. Dyachenko, H. M., & Kravchenko, N. O. (2005). Achievements and problems in the diagnosis of tuberculosis in agricultural animals [Dosiahnennia i problemy u diahnostryti tuberkulezu silskohospodarskykh tvaryn]. *Silskohospodarska Mikrobioloheia*, 3, 81–92. <https://doi.org/10.35868/1997-3004.3.81-92>
9. Korniienko, L. E., et al. (2008). Chronic infectious diseases of animals [Khronichni infektsiini khvoroby tvaryn]. *Bila Tserkva*: [s.n.].
10. Panivska, O., & Shevchuk, V. (2024). Comparative characteristics of methods of pre-sowing treatment of the studied material to isolate mycobacteria [Porivnialna kharakterystyka

metodiv peredposivnoi obrobky doslidzhuvanoho materialu z metoiu vydilennia mikobakterii]. *Věda a Perspektivy*, 7(38), 267–278. [https://doi.org/10.52058/2695-1592-2024-7\(38\)-267-278](https://doi.org/10.52058/2695-1592-2024-7(38)-267-278)

11. Ministry of Health of Ukraine. (2019). Instruction for microbiological diagnosis of tuberculosis [Instruktsiia z mikrobiolohichnoi diahnostyky tuberkulezu]. Order No. 1462, 27.06.2019, registered in the Ministry of Justice of Ukraine 08.08.2019, No. 886/33857.

12. Zhurilo, O. A., Barbova, A. I., Glushkevych, T. H., & Tretiakova, L. V. (2012). Standards of bacteriological diagnosis of tuberculosis in laboratories of anti-tuberculosis institutions of Ukraine [Standarty bakteriologichnoi diahnostyky tuberkulezu v laboratoriiakh protytuberkuleznykh zakladiv Ukrainy]. Kyiv: [s.n.].

13. Correa-Valencia, N. M. (2023). Current approaches to decontamination of fecal and environmental samples for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Dairy and Veterinary Sciences Journal*, 15(3). <https://doi.org/10.19080/JDVS.2023.15.555917>

14. Dane, H., Stewart, L. D., & Grant, I. R. (2023). Culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Challenges, limitations and future prospects. *Journal of Applied Microbiology*, 134(1), lxac017. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac017>

15. Prajwal, P., Neary, T., Rohrbach, K., Bittel, P., Göller, P. C., Buch, T., ... Keller, P. M. (2023). Optimizing mycobacteria molecular diagnostics: No decontamination, human DNA depletion, greener storage at 4 °C. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1104752. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1104752>

16. Bruczyńska, M., Didkowska, A., Brzezińska, S., Nowak, M., Filip-Hutsch, K., Kalicki, M., ... Anusz, K. (2023). *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in asymptomatic zoo herbivores in Poland. *Animals*, 13(6), 1022. <https://doi.org/10.3390/ani13061022>

17. Lienhard, J., Friedel, U., Paganini, C., Hilbe, M., Scherrer, S., & Schmitt, S. (2024). Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other non-tuberculous mycobacteria from head lymph nodes of wild ruminants and badgers in Switzerland. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1321106. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1321106>

18. Chaula, G. T., Namkinga, L., Mahadhy, A., Sabiiti, W., Ntinginya, N. E., & Mtafya, B. (2025). High centrifugation speed improves recovery of *Mycobacterium tuberculosis* and yield of culture. *Tuberculosis*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2025.102633>

19. Wang, J. L., Zhang, Z. J., Wang, F., Chen, M. K., Tian, P., & Wang, X. F. (2025). A prospective study on enhanced recovery of *Mycobacterium tuberculosis* from children's stool using novel power ultrasound decontamination. *Scientific Reports*, 15(1), 13309. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-98037-5>

Стаття надійшла до редакції 27.03.2026

Стаття пройшла рецензування 29.04.2026

Стаття опублікована 29.05.2026