

2. ВЕТЕРИНАРНА ВІРУСОЛОГІЯ ТА МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 619:616-078:57.083.13:579.873.21:636.22/28

DOI 10.36016/VM-2022-108-2

СПОСІБ ПЕРЕДПОСІВНОЇ ОБРОБКИ БІОМАТЕРІАЛУ ПРИ ДОСЛІДЖЕННІ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

**Завгородній А. І., Калашник М. В., Білушко В. В., Калашник Н. В.,
Позмогова С. А., Кіптенко А. В., Бусол В. О.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної
ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: nick.v.kalashnik@gmail.com

Поступний В. А.

ТОВ «АТОМ НТЦ», Харків, Україна

У статті представлені результати культуральних досліджень щодо вивчення чутливості культури *M. fortuitum* до дії 0,5–1,0 %-х розчинів азотної кислоти, 1,0–3,0 %-х розчинів трихлороцтової кислоти за експозиції 30, 60, 180 хв, а також 5,0, 8,0, 10,0 %-х розчинів щавлевої кислоти за експозиції 30 і 60 хв. Проведено передпосівну обробку біологічного матеріалу від мурчаків, кролів, курей і великої рогатої худоби із застосуванням 0,5, 1,0, 1,5 %-х розчинів азотної, 1,0 %-го трихлороцтової кислот за експозиції 30, 60 хв, 5,0 %-го щавлевої кислоти — 30 хв у порівнянні з контрольним методом передпосівної обробки за А. П. Алікаєвою. У результаті проведених досліджень було встановлено, що спосіб передпосівної обробки біологічного матеріалу із застосуванням 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв є більш інформативним, що дозволяє виділяти культури мікобактерій із біологічного матеріалу від різних видів тварин раніше на 5–10 діб, а також перешкоджає росту банальної мікрофлори на поживному середовищі

Ключові слова: мікобактерії, контамінація, азотна кислота, поживне середовище

Діагноз на туберкульоз у сільськогосподарських тварин встановлюють за наявності в органах і тканинах специфічних туберкульозних уражень. При цьому також необхідно зазначити, що термін розвитку специфічних туберкульозних гранулом в організмі інфікованих тварин залежить від біологічних властивостей збудника, форми, стадії розвитку інфекційного туберкульозного процесу, а також імунної резистентності макроорганізму. Крім цього туберкульозна інфекція в організмі сприйнятливих тварин може перебігати і в латентній формі без прояву клінічних ознак, патологоанатомічних уражень внутрішніх органів і лімфатичних вузлів. Такі тварини є бактеріоносіями та можуть бути джерелом збудника туберкульозу [1–3].

За відсутності характерних для цього захворювання уражень від забитих з діагностичною метою тварин відбирають проби біоматеріалу для культурального дослідження на туберкульоз з метою виділення чистої культури збудника. Однак не у всіх випадках вдається ізолювати чисті культури мікобактерій із патологічного матеріалу, в якому відсутні властиві туберкульозу ураження. Ефективність культурального методу дослідження залежить від кількості відібраного для дослідження біоматеріалу, умов його транспортування та зберігання, наявності життєздатних мікобактеріальних клітин у ньому, способу передпосівної обробки та терміну його висіву, а також елективності поживних середовищ, які застосовуються для індикації та культивування мікобактерій [1, 4, 5]. Разом з цим необхідно зазначити, що при відборі проб біоматеріалу для культурального дослідження від підозрілих в інфікуванні тварин, забитих з діагностичною метою, відбувається його контамінація секундарною мікрофлорою. Цей фактор впливає на достовірність отриманих результатів і має суттєве значення для встановлення заключного діагнозу або його спростування [6, 7].

Для передпосівної обробки проб мокротиння в різні роки в медичній практиці застосовували розчини 2–3-заміщеного фосфорнокислого натрію, 4,0 %-й розчин гідроксиду натрію, 0,5–1,0 %-й розчин етонію, Однак застосування перелічених розчинів для деконтамінації

проб біоматеріалу, відібраного від тварин, не набуло широкого застосування у ветеринарній медицині через значний рівень контамінації (проросту) поживних середовищ супутньою мікрофлорою [8–10].

У ветеринарній практиці для передпосівної обробки патологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин у різні роки були запропоновані 3,0, 5,0 %-ві розчини сірчаної та соляної кислот, 5,0–15,0 %-ві щавлевої кислоти, 0,05–0,1 %-ві хлоргексидинбіглюконіуму, 1,0 %-й етонію і катаміну, розчин діоциду в розведенні 1:500 у композиції з 1,0 %-м розчином їдкового натру [11–15]. Не дивлячись на велику кількість запропонованих хімічних сполук для передпосівної обробки патологічного матеріалу від тварин, більшість з них не знайшли широкого застосування у ветеринарній медицині.

У ветеринарній практиці для передпосівної обробки біоматеріалу від тварин і птиці частіше всього використовують метод Гона (Гона-Левенштейна-Суміоші) і метод А. П. Алікаєвої [16]. Однак вищезазначені методи мають також деякі недоліки.

Так, при обробці патологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін ВРХ, у якій при діагностичному забої в органах і тканинах були відсутні характерні для туберкульозу ураження, тільки в 40,0–45,0 % випадків виділяють культури збудника туберкульозу. При цьому ріст банальної мікрофлори на поживних середовищах відмічають у 12,0–30,0 % випадків [8–10]. Разом з цим слід зазначити, що обробка патологічного матеріалу розчинами 8,0–15,0 % сірчаної, щавлевої кислот та лугів суттєво впливає на життєздатність, швидкість та інтенсивність росту мікобактерій на поживному середовищі.

Наведені дані свідчать про те, що універсального хімічного препарату для обробки діагностичного матеріалу і дотепер не розроблено. Тому питання щодо удосконалення існуючих і розробки нових способів, а також пошуку хімічних сполук для передпосівної обробки є актуальним та потребує подальших досліджень з метою підвищення ефективності культурального методу діагностики туберкульозу.

Метою даної роботи було проведення дослідження щодо пошуку більш інформативного способу передпосівної обробки біоматеріалу від тварин при культуральному дослідженні на туберкульоз.

Матеріали та методи. Для проведення досліджень визначали чутливість культури атипичних мікобактерій виду *M. fortuitum* до дії 0,5–1,0 % азотної (HNO_3) та 1,0–3,0 % трихлороцтової кислот (CCl_3COOH) за експозиції 30, 60, 180 хв, а також 5,0, 8,0, 10,0 % щавлевої кислоти ($(\text{COOH})_2$) за експозиції 30, 60 хв. Облік зростання колоній *M. fortuitum* проводили впродовж 20 діб.

Проби біологічного матеріалу відбирали від різних видів тварин (велика рогата худоба, морські свинки, кролі, кури), транспортували до лабораторії вивчення туберкульозу Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» у свіжому вигляді. Бактеріологічним методом на туберкульоз було досліджено 23 проби біоматеріалу від реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби з благополучних господарств різних областей України, 5 проб біоматеріалу від зоопаркових курей з державного зоопарку, 12 проб біоматеріалу від мурчаків та 4 проби від кролів.

Для постановки біологічної проби нами були відібрані клінічно здорові мурчаки живою вагою 250,0–300,0 г, а також кролі живою вагою до 2 кг, які до початку експерименту не реагували на туберкулін та алерген з атипичних мікобактерій (ААМ). Дослідним мурчакам вводили суспензію культури *M. bovis* (шт. Vallee) підшкірно в область стегна з медіального боку, а кролям — у крайову вену вуха в дозі $1,0 \text{ см}^3$ у концентрації бактеріальних клітин $1,0 \text{ мг/см}^3$ фізіологічного розчину. Загиблих у процесі експерименту лабораторних тварин, а також евтаназованих через 90 діб піддавали патологоанатомічному дослідженню та відбирали проби біоматеріалу.

Перед посівом біологічного матеріалу на поживне середовище проводили його попередню обробку. Для цього з кожного зразка біологічного матеріалу (лімфатичні вузли, шматочки печінки, селезінки, легень) вирізали ділянки з ознаками гіперемії та гіперплазії розміром $0,3\text{--}0,5 \text{ см}^3$ у стерильному бактеріологічному боксі. Загальна вага кожної проби, що окремо досліджується, становила 20,0–30,0 г. Після цього шматочки кожної проби досліджуваного матеріалу окремо поміщали у стерильні фарфорові ступки, подрібнювали та вносили розчини кислот: 3,0, 5,0 % сірчаної кислоти на 20, 30 хв, 0,5, 1,0, 1,5 % азотної кислоти на 30, 60 хв,

5,0 % щавлевої кислоти на 30 хв, 1,0 % трихлороцтової кислоти на 30, 60 хв. Ступки накривали стерильним пергаментним папером і залишали на зазначений термін експозиції.

Після цього розчини кислот зливали в колбу, а шматочки тканин промивали двічі стерильним фізіологічним розчином з інтервалом 10–15 хв. Після другого промивання фізіологічний розчин зливали, а шматочки тканин розтирали зі стерильним склом або кварцовим піском до одержання гомогенної маси.

До гомогенізату тканини додавали 20,0–25,0 см³ стерильного фізіологічного розчину, змішували стерильною скляною паличкою. Отриману суспензію висівали на поживне середовище для індикації та культивування мікобактерій. Пробірки з посівами розташовували в термостаті за температури 37 °С на 2–3 доби у скошеному положенні. Після цього ватно-марлеві пробки парафінували, а пробірки розміщували в бактеріологічні штативи та культивували в термостаті за температури 37 °С. Облік зростання колоній на поживному середовищі проводили через 5–7 діб впродовж 90 діб. При цьому враховували термін появи первинного росту колоній, їх консистенцію, тинкторіальні властивості.

Для контролю дослідів передпосівну обробку біологічного матеріалу проводили 5,0 %-м розчином сірчаної кислоти за методом А. П. Алікаєвої [16].

Результати досліджень. При визначенні чутливості культури *M. fortuitum* до дії різних концентрацій кислот у певних експозиціях було встановлено, що культура атипкових мікобактерій виду *M. fortuitum* стійка до дослідних концентрацій розчинів діючих речовин у більшості випадків. Результати досліджень щодо визначення чутливості атипкових мікобактерій *M. fortuitum* до дії розчинів кислот наведено в табл. 1.

Таблиця 1 — Чутливість культури *M. fortuitum* до дії розчинів кислот

Діюча речовина	Концентрація розчину, %	Експозиція, хв	Ріст колоній мікобактерій (через діб)										
			2	3	4	5	6	7	10	14	15	20	
HNO ₃	0,5	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		60	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		60	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		180	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
		Контроль	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CCl ₃ COOH	1	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		60	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	3	60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		180	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
(COOH) ₂	5	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		60	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	8	30	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		60	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
	10	30	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		60	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	

Примітки: «-» — відсутність росту колоній, «+» — наявність росту колоній.

Наведені в табл. 1 дані свідчать про те, що при дії 0,5 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв первинний ріст колоній культури *M. fortuitum* на поживному середовищі відзначали на другу добу після висіву, за експозиції 60 хв — на третю добу культивування. Під дією 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 та 60 хв зростання первинних колоній мікобактерій відзначали на третю добу, а за експозиції 180 хв — на п'яту добу.

У разі використання 1,0 %-го розчину трихлороцтової кислоти за експозиції 30 хв ріст колоній відмічали на третю добу, за експозиції 60 хв — на п'яту добу культивування. Розчин 3,0 %-ї трихлороцтової кислоти за експозиції 60 і 180 хв повністю пригнічував ріст *M. fortuitum* на поживному середовищі.

Зростання колоній мікобактерій також відзначали при дії 5,0 %-го розчину щавлевої кислоти за експозиції 30 і 60 хв, 8,0 %-го розчину щавлевої кислоти — 30 хв на третю добу

культивування. Надалі, при обробці культури мікобактерій 8,0 %-м, 10,0 %-м розчином щавлевої кислоти за експозиції 30, 60 хв зростання колоній відзначали на п'яту добу. Однак розчин 10,0 %-ї щавлевої кислоти за 60 хв експозиції пригнічував ріст мікобактерій. Первинний зростання колоній у цьому випадку спостерігали лише на сьому добу.

Інтенсивність росту мікобактерій пропорційно збільшувалася до 20 діб культивування та становила у кількісному відношенні від 20 до 50 колоній у кожній пробірці. Зростання культури *M. fortuitum*, яку не піддавали впливу хімічних сполук (контроль) спостерігався на другу добу культивування.

Після цього було проведено бактеріологічне дослідження щодо передпосівної обробки проб біоматеріалу від реагуючої на туберкулін великої рогатої худоби із благополучних щодо туберкульозу господарств різних областей України. В експерименті застосували 0,5 %-й розчин азотної кислоти, 1,0 %-й розчин трихлороцтової кислоти за експозиції 30, 60 хв. У якості контролю обробку біоматеріалу проводили за методом А. П. Алікаєвої. Результати бактеріологічного дослідження представлені у табл. 2.

Таблиця 2 — Результати бактеріологічного дослідження проб біологічного матеріалу від великої рогатої худоби на туберкульоз із застосуванням розчинів кислот

Діюча речовина	Досліджено зразків	Концентрація розчину, %	Експозиція, хв	Вісяно пробірок, шт.	Ріст колоній у пробірках, шт.	Ріст колоній у пробірках, %	Виділено культур	Виділено культур, %	Мікроскопія	Ріст сторонньої мікрофлори, %
HNO ₃	8	0,5	30	40	34	85,0	5	62,5	+	7,5
		0,5	60	40	37	92,5	5	62,5	+	5,0
CCl ₃ COOH	8	1,0	30	40	32	80,0	3	37,5	+	12,5
		1,0	60	40	30	75,0	2	25,0	+	7,5
H ₂ SO ₄	8	5,0	20	40	34	85,0	3	37,5	+	12,5

Наведені в табл. 2 дані свідчать, що за застосування 0,5 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30–60 хв було виділено 5 культур мікобактерій. За застосування 1,0 %-го розчину трихлороцтової кислоти за експозиції 30 хв було виділено 3 культури, а за експозиції 60 хв — 2 культури мікобактерій. При обробці біоматеріалу за методом А. П. Алікаєвої із застосуванням 3,0 %-го розчину H₂SO₄ виділено 3 культури мікобактерій. Зростання сторонньої мікрофлори (12,5 %) на поживному середовищі спостерігали при обробці проб 5,0 %-м розчином сірчаної кислоти (експозиція 20 хв) та 1,0 %-м розчином трихлороцтової кислоти (експозиція 30 хв).

Надалі було проведено бактеріологічне дослідження 15 проб біоматеріалу від великої рогатої худоби, яка реагувала на туберкулін з благополучних щодо туберкульозу господарств, 5 зоопаркових курей, а також 12 мурчаків і 4 кролів, заражених культурою *M. bovis* шт. Vallee. Попередню обробку біоматеріалу проводили з використанням 0,5 %-го, 1,0 %-го, 1,5 %-го розчинів азотної кислоти за експозиції 30 хв у порівнянні з контрольним методом А. П. Алікаєвої. Результати цих досліджень наведено у табл. 3.

Із матеріалів, наведених у табл. 3 видно, що при обробці 15 проб біоматеріалу від великої рогатої худоби, 5 проб від курей, 12 проб від мурчаків та 4 проби від кролів 0,5 %-м розчином азотної кислоти було ізольовано 22 культури мікобактерій, а також у 25,0 % випадків відмічали ріст сторонньої мікрофлори. При використанні 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв із проб біоматеріалу було виділено 33 культури мікобактерій, а із застосуванням 1,5 %-го розчину даної хімічної речовини у тій самій експозиції ріст колоній мікобактерій спостерігали у 21 випадку. Наявності росту банальної мікрофлори не відмічали. При цьому потрібно зазначити, що 1,5 %-й розчин азотної кислоти знижував інтенсивність росту епізоотичних культур мікобактерій на поживному середовищі.

При обробці патологічного матеріалу 3,0 %-м розчином сірчаної кислоти ріст мікобактерій на поживному середовищі відмічали у 22 пробірках (ізольовано 22 культури), що на 11 культур менше, ніж у разі використання 1,0 %-го розчину азотної кислоти.

Таблиця 3 — Результати бактеріологічного дослідження проб біоматеріалу від різних видів тварин із застосуванням азотної та сірчаної кислоти

Проби від тварин	Кількість проб	Ізольовано культур при обробці				Ріст сторонньої мікрофлори при обробці			
		HNO ₃			H ₂ SO ₄	HNO ₃			H ₂ SO ₄
		0,5 %	1,0 %	1,5 %	5,0 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	5,0 %
ВРХ	15	9	13	8	9	3	-	-	4
Кури	5	2	5	3	3	2	-	-	4
Мурчаки	12	9	12	8	8	2	-	-	2
Кролі	4	2	3	2	2	2	-	-	2
Всього	36	22	33	21	22	9	-	-	12
%		61,1	91,6	58,3	61,1	25,0	0,0	0,0	33,3

Примітка. «-» — відсутність росту сторонньої мікрофлори при обробці.

При цьому у 33,3 % дослідних проб відмічали ріст супутньої мікрофлори. Застосування 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв для передпосівної обробки проб біоматеріалу дозволило підвищити виділення культур мікобактерій на 30,5 %. При цьому була забезпечена стерильність посівів на поживному середовищі для індикації та культивування мікобактерій.

Крім цього бактеріологічним методом було досліджено проби біоматеріалу від 8 мурчаків, заражених культурою *M. bovis* шт. Vallee. Передпосівну обробку біоматеріалу проводили з використанням розчинів 1,0 %-ї азотної, 5,0 %-ї щавлевої кислот. Поряд з перерахованими вище кислотами також використовували метод А. П. Алікаєвої. Результати цих досліджень наведено у табл. 4.

Таблиця 4 — Бактеріологічне дослідження біоматеріалу на туберкульоз від мурчаків після передпосівної обробки

Досліджено проб	Діюча речовина	Концентрація, %	Експозиція, хв	Кількість пробірок	Ріст колоній (через діб)					Ріст колоній у пробірках		Ріст сторонньої мікрофлори	
					10	15	20	30	40	проби-рок	%	проби-рок	%
8	HNO ₃	1	30	80	-	-	14,8±0,22	60,01±0,38	89,5±0,31	70	87,5	-	-
8	(COOH) ₂	5	30	80	-	-	8,22±0,18	23,04±0,28	51,22±0,24	58	72,5	6	7,5
8	H ₂ SO ₄	5	30	80	-	-	-	12,83±0,45	65,03±0,25	56	70,0	4	5

Примітка. «-» – відсутність росту колоній мікобактерій.

Із матеріалів табл. 4 видно, що при використанні 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв первинний ріст колоній мікобактерій на поживному середовищі спостерігали на 20-ту добу. При обробці 5,0 %-м розчином щавлевої кислоти впродовж 30 хв. поодинокі колонії виростили на 20-ту добу, а при застосуванні 5,0 %-го розчину сірчаної кислоти за експозиції 30 хв — на 30-ту добу культивування.

Суцільний ріст колоній було зафіксовано у всіх випадках на 39–42-гу доби культивування. Якщо враховувати загальну кількість пробірок, в яких було відмічено наявність колоній мікобактерій, то при обробці азотною кислотою наявність росту колоній було встановлено у 70 пробірках, при застосуванні щавлевої кислоти — у 58 пробірках, при обробці сірчаною кислотою — у 56 пробірках, що становило 87,5, 72,5 та 70,0 % відповідно.

Зростання сторонньої мікрофлори при обробці біоматеріалу 5,0 %-м розчином сірчаної кислоти спостерігали у 4 пробірках (5,0 %), а при обробці 5,0 %-м розчином щавлевої кислоти — у 6 пробірках (7,5 %). Ріст сторонньої мікрофлори був відсутній на поживному середовищі у всіх пробірках із застосуванням 1,0 %-го розчину азотної кислоти за відповідної експозиції.

Висновки. 1. Результати проведених досліджень свідчать про те, що застосування способу передпосівної обробки проб біоматеріалу з використанням 1,0 %-го розчину азотної кислоти за експозиції 30 хв є більш інформативним, дозволяє на 5–10 діб раніше та на 17,5–30,5 % більше виділити культур мікобактерій з патологічного матеріалу від тварин.

2. Розроблений спосіб забезпечує стерильність посівів від проросту секундарною мікрофлорою та може бути використаний у ветеринарній практиці при бактеріологічному дослідженні на туберкульоз.

Список літератури

1. OIE. Chapter 3.4.6. Bovine tuberculosis. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 6th ed. Paris : OIE, 2018. URL : https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.04.06_BOVINE_TB.pdf. (Дата звернення: 28.05.2022).
2. Allen A. R., Skuce R. A., Byrne A. W. Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland – A Perfect Storm? the Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Controlling a Chronic Infectious Disease. *Front. Vet. Sci.* 2018. Vol. 5. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00109>.
3. Thomas J. et al. Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Vet. Res.* 2021. Vol. 52. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00881-y>.
4. Buddle B. M. et al. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *New Zealand veterinary journal.* 2015. Vol. 63. P. 19–27. DOI: <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.929518>.
5. Schiller I. et al. Bovine Tuberculosis: A Review of Current and Emerging Diagnostic Techniques in View of their Relevance for Disease Control and Eradication. *Transboundary and emerging diseases.* 2010. Vol. 57. P. 205–220. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01148.x>.
6. WHO. Chapter 3. Tuberculosis – diagnosis. *Tuberculosis laboratory biosafety manual*. Geneva : WHO, 2012. URL : https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77949/9789241504638_eng.pdf;jsessionid=1C356C0878F2A28536C1F702117B383D?sequence=1. (Дата звернення: 27.05.2022).
7. Kuria J. K. N. Diseases Caused by Bacteria in Cattle: Tuberculosis. *Bacterial Cattle Diseases.* 2019. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82051>.
8. Drobniowski F. A. et al. A national audit of the laboratory diagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases within the United Kingdom. *Journal of clinical pathology.* 1999. Vol. 52, No 5. P. 334–337. DOI: <https://doi.org/10.1136/jcp.52.5.334>.
9. Ratnam S., Stead F. A., Howes M. Simplified acetylcysteine-alkali digestion-decontamination procedure for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology.* 1987. Vol. 25, No. 8. P. 1428–1432. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.25.8.1428-1432.1987>.
10. Нуратинов Р. А. и др. Метод предпосевной обработки биоматериала для выделения микобактерий. *Проблемы туберкулёза и болезней лёгких.* 2006. № 9. С. 48–50.
11. Lipiec M. *Gruźlica bydła w Polsce* : monografia. Puławy : Państwowy Instytut Weterynaryjny - Państwowy Instytut Badawczy, 2008. 68 p.
12. Кассич Ю. Я., Борзяк А. Т., Кочмарский А. Ф. Туберкулёз животных и меры борьбы с ним. Киев : Урожай, 1990. 304 с.
13. Щуревский В. Е., Косенко В. И., Тажгалиев Н. М. Использование различных химических веществ для обработки патологического материала и их влияние на высеваемость микобактерий. *Бюллетень ВИЭВ.* 1987. № 64. С. 15–19.
14. Аликаева А. П. Методика исследования кормов, фекалий, почвы и другого материала из внешней среды для выявления микобактерий. *Бюллетень ВИЭВ.* 1979. № 34. С. 41–45.
15. Финн Э. Р., Машенцева Н. Н. Упрощённый метод обработки мокроты для посева на микобактерии туберкулёза. *Лабораторное дело.* 1980. № 12. С. 752–754.
16. Настанова по діагностиці туберкульозу тварин та птиці : затв. 26.06.94. Київ, 1994. 39 с.

METHOD OF PRELIMINARY TREATMENT OF BIOMATERIAL AT DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS

**Zavgorodniy A. I., Kalashnyk M. V., Bilushko V. V., Kalashnyk N. V.,
Pozmogova S. A., Kiptenko A. V., Busol V. O.**

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Postupnyi V. A.

"ATOM STC" Ltd, Kharkiv, Ukraine

*The contamination by secondary microflora complicates the isolation of mycobacterial cultures and their inoculation on the nutrient media. The contamination often occurs at the selection of biological material from slaughtered animals with diagnostic purposes. The chemical agents that are used for preliminary treatment partially inhibit accompanied microflora. It leads to the decrease in the growth rate of mycobacteria cultures. The aim of the study was to develop a more informative method of preliminary treatment of biological material from animals for culture examination for tuberculosis. The sensitivity of *M. fortuitum* culture to the action 0.5–1.0% nitric acid, and 1.0–3.0% trichloroacetic acid at the exposure for 30, 60, 180 min, and also 5.0, 8.0, 10.0% oxalic*

acid at the exposure for 30, 60 min has been studied. The samples of biomaterial were collected from the cattle with the positive reaction to tuberculin, guinea pigs, rabbits, chicken. The above samples have been examined for tuberculosis by bacteriological method. Preliminary treatment of freshly collected biological material was performed with the use of 0.5, 1.0, 1.5% nitric acid solution, 1.0% trichloroacetic acid solution at the exposure for 30 and 60 minutes with the use of solution of 5.0% oxalic acid during 30 min exposure in comparison with standard method by A. P. Alikaeva. The best indication of the primary growth and the growth rate of mycobacteria colonies have been observed at the action of 0.5% nitric acid solution on the atypical mycobacterial culture. The growth of mycobacterial colonies have been observed in the test tubes on a nutrient medium in 87.5%, 72.5%, 75.0%, 70.0% of cases according to the preliminary treatment of biomaterial with the use of 1.0% nitric acid solution, 5.0% oxalic acid solution, 1.0% trichloroacetic solution and 5.0% sulfuric acid solution. At the same time the growth of secondary microflora was also detected in the cultures from biological samples, when the samples of biomaterial were treated by only 0.5% solution of nitric acid was 5.0–25.0% oxalic acid — 7.5%, trichloroacetic acid — 7.5–12.5% and a sulfuric acid solution — 5.0–33.0%. By the results of the studies it was found that the biomaterial preliminary treatment method with the use of 1.0% nitric acid solution at the 30 min exposure is the most informative. This method allows to get mycobacterial isolates from the biological material of animals 5–10 days earlier and it inhibits the growth of secondary microflora on the nutrient medium. This method can be used for cultural examination for tuberculosis in veterinary laboratories

Keywords: mycobacteria, contamination, nitric acid, nutrient medium

УДК 619:616.98:578.891:578.2'21:636.4:599.731.1

DOI 10.36016/VM-2022-108-3

ПОРІВНЯННЯ НАБОРІВ ПРАЙМЕРІВ ТА ЗОНДІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ Е ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Рудова Н. Г., Солодянкін О. С., Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rudovanatawa@ukr.net

На основі комп'ютерного аналізу консервативних фрагментів відкритих рамок зчитування, що перекриваються, ORF2/ORF3 генома вірусу гепатиту Е (ВГЕ) охарактеризовано набори праймерів і зондів, наведених у наукових публікаціях, для детекції генотипів 1–4 ВГЕ за допомогою ПЛР у реальному часі. Один з наборів перевірено на стандарті ВООЗ, а на другий є багато посилань у наукових публікаціях з ПЛР детекції ВГЕ в базі біомедицинської літератури PubMed. Визначено, що по 38 ізолятів ВГЕ для зазначених вище обох наборів праймерів і зондів мають один–два некомплементарні нуклеотиди у комплексі праймер (зонд)–однонитковий продукт ПЛР для проаналізованих 108 ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4, для яких основними природними резервуарами є свині та дикі кабани

Ключові слова: свині, дикі кабани

Гепатит Е — хвороба печінки — є однією з п'яти відомих форм гепатиту людини [1]. Унаслідок широкого поширення в усьому світі, високого рівня захворюваності, можливості розвинення гострого гепатиту та значної кількості летальних випадків (близько 70 000 щорічно) ВООЗ вважає гепатит Е значною проблемою охорони здоров'я, яка потребує постійної уваги [2].

Збудником гепатиту Е є високоваріабельний безоболонковий вірус, геном якого представлений позитивною одноланцюговою молекулою РНК довжиною приблизно 7 200 нуклеотидів (н) [3]. На основі поверхової подібності морфології та організації генома вірус гепатиту Е (ВГЕ, HEV, *hepatitis E virus*) спочатку було віднесено до сімейства Caliciviridae [4]. Проте, у подальшому за результатами досліджень структури генома ВГЕ таксономію вірусу було офіційно змінено, і, згідно зі сучасною класифікацією, ВГЕ належить до сімейства Hepadnaviridae, який містить два роди: *Orthohepevirus* (до складу якого входять 4 види — *Orthohepevirus A, B, C, D*) та *Piscihepevirus* [5]. ВГЕ, який інфікує людину та деяких ссавців [6], належить до одного з найбільш вивчених видів *Orthohepevirus A* та має 8 генотипів — HEV1–HEV8, з яких HEV1–HEV4 є збудниками захворювання на гепатит Е у людини, HEV5–HEV6 детектовано тільки у диких кабанів у Японії [7], HEV7–HEV8 — у верблюдів [8, 9].