

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
cmac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2021.

Содержание

Болезни и возбудители

- Сацук А.В., Солопова Г.Г., Чурилова Н.С., Власенко Н.В., Панасюк Я.В., Плоскирева А.А., Акимкин В.Г.
- 340** Вирусный гепатит С у иммунокомпрометированных пациентов педиатрического профиля: эпидемиологический анализ данных центра детской гематологии, онкологии и иммунологии
- Баранова И.Б., Яременко А.И., Зубарева А.А., Карпищенко С.А., Попова М.О., Курусь А.А., Портнов Г.В., Пинегина О.Н., Лукина О.В., Маляревская М.В., Калакуцкий И.Н., Илюхина М.О., Клишко Н.Н.
- 347** Мукормикоз костей лицевого черепа, полости носа и околоносовых пазух у пациентов, перенесших COVID-19
- Степин А.В.
- 359** Структура возбудителей и основные проблемы антибиотикорезистентности при инфекции области хирургического вмешательства в кардиохирургии

Антимикробные препараты

- Сычев И.Н., Федина Л.В., Сычев Д.А.
- 367** Антибактериальная терапия в условиях полипрагмазии: курс на безопасность

Антибиотикорезистентность

- Гостев В.В., Пунченко О.Е., Сидоренко С.В.
- 375** Современные представления об устойчивости *Staphylococcus aureus* к бета-лактамам антибиотикам
- Садеева З.З., Новикова И.Е., Шакирзянова Р.А., Алябьева Н.М., Лазарева А.В., Мелков М.С., Карасева О.В., Вершинина М.Г., Фисенко А.П.
- 388** Молекулярно-генетическая характеристика механизмов антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных из крови и ликвора у детей

Опыт работы

- Лёдов В.А.
- 400** Определение функциональных и антиген-специфических антител в сыворотке у мышей после иммунизации кандидатной вакциной против *Shigella flexneri* 1b, 2a, 3a, 6, Y
- Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В.
- 404** Разработка технологии длительного хранения культур микобактерий туберкулеза

Разработка технологии длительного хранения культур микобактерий туберкулеза

Умпелева Т.В., Еремеева Н.И., Вахрушева Д.В.

Уральский НИИ фтизиопульмонологии – филиал ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, Екатеринбург, Россия

Контактный адрес:

Татьяна Валерьевна Умпелева
Эл. почта: tumpeleva@ya.ru

Ключевые слова: *Mycobacterium tuberculosis*, коллекция, культура, хранение.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать технологию замораживания и длительного хранения культур микобактерий и определить ее место в технологическом процессе работы микробиологической лаборатории.

Материалы и методы. В ходе работы была произведена оценка пригодности двух сред для замораживания микобактерий – 0,9% раствора NaCl и среды Миддлбрука 7H9, с добавлением в обе среды глицерина в различных концентрациях (0%, 4,0%, 20,0%, 50,0% по конечному объему). Для заморозки суспензий культур применяли два способа: один – с использованием криозамораживателя (скорость понижения температуры – 1°C/мин), второй – прямое помещение в морозильную камеру при температуре -80°C. Работа проводилась с использованием суспензии музейной культуры *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Эффективность выбранного способа хранения оценивали по доле живых клеток, полученных после размораживания суспензий (общее количество клеток по данным количественной ПЦР/количество КОЕ на среде Левенштейна – Йенсена).

Результаты. После хранения культур при различных условиях жизнеспособными оставались от 1,2% до 16,9% клеток микобактерий. Наибольший процент жизнеспособных клеток – 16,9% (95% ДИ 8,6–42,4%) – достигался при хранении в морозильной камере при температуре -80°C без использования криозамораживателя в среде, состоящей из раствора 0,9% NaCl с добавлением глицерина (20,0% объемная доля). Однако статистически значимых различий в доле жизнеспособных клеток не было выявлено и при использовании среды, содержащей 0,9% раствор NaCl с добавлением 4,0%, 50,0% глицерина, а также среды Миддлбрука 7H9 с глицерином и без него.

Выводы. Разработана технология длительного хранения культур микобактерий, основанная на заморозке суспензии клеток при температуре -80°C в среде, состоящей из раствора 0,9% NaCl с добавлением глицерина (20,0% объемная доля), которая обеспечивает высокую степень сохранения жизнеспособности клеток, не требует больших затрат, и может быть легко внедрена в рутинную практику микробиологической лаборатории.

Original Article

Development of technology for long-term storage of *Mycobacterium tuberculosis* cultures

Umpelava T.V., Eremeeva N.I., Vakhrusheva D.V.

Ural Research Institute for Phthisiopulmonology, Yekaterinburg, Russia

Contacts:

Tatiana V. Umpelava
E-mail: tumpeleva@ya.ru

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, collection, culture, storage.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Objective. To develop a technology for freezing and long-term storage of mycobacteria cultures and implement into a microbiological laboratory routine practice.

Materials and methods. For comparison between different condition, the media for freezing mycobacteria containing 0.9% NaCl or Middlebrook's 7H9 medium with the addition of glycerol at various concentrations: 0%, 4.0%, 20.0%, 50.0% (by final volume) was evaluated. To freeze suspensions of cultures, two methods were used: one – using a cryo-freezer (cooling rate of 1°C/min), the second – direct placement in a deep freeze at a temperature of -80°C. Suspension of a museum strain of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was used for preparing suspension. The efficiency of the chosen storage method was assessed by the proportion of viable cells obtained after thawing the suspensions (total number of cells according to quantitative PCR data/number of CFU in Lowenstein-Jensen medium).

Results. After storage under various conditions, from 1.2% to 16.9% of mycobacterial cells remained viable. The maximum percentage of viable cells of 16.9% (95% CI 8.6–42.4%) reached when stored in a freezer at a temperature of -80°C without using a cryo-freezer in a medium consisting of 0.9% NaCl with glycerol (20.0% by final volume). However, no statistically significant differences in viable cells were found in the medium containing 0.9% NaCl solution with the addition of 4.0%, 50.0% glycerol, as well as Middlebrook's 7H9 medium with and without glycerol.

Conclusions. A technology for long-term storage of mycobacterial cultures has been developed, based on freezing a cell suspension at a temperature of -80°C in a medium consisting of a 0.9% NaCl solution with the glycerol (20.0% volume fraction), which provides a high degree of cell viability preservation, is low-cost and can be easily integrated into the routine work of a microbiological laboratory.

Умпелева Т.В. и соавт.

Введение

В последние годы в России наблюдается тенденция к снижению заболеваемости населения туберкулезом (с 85,1 на 100 тыс. в 2008 г. до 48,3 на 100 тыс. в 2017 г.) [1]. Однако процент больных туберкулезом с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (т.е. с устойчивостью по меньшей мере к двум противотуберкулезным препаратам – рифампицину и изониазиду) является одним из самых высоких в мире (35% в 2019 г.) [2]. Кроме того, появление вариантов возбудителя, устойчивых к новым противотуберкулезным препаратам, и влияние ассоциированных с туберкулезом инфекций на показатели заболеваемости создают новые вызовы и требуют постоянного совершенствования организации фтизиатрической помощи, в том числе лабораторной диагностики. Одним из аспектов этой работы является создание и ведение биобанков или коллекций микобактерий туберкулеза (МБТ), которые необходимы как для обеспечения нужд рутинной работы микробиологической лаборатории, так и для мониторинга инфекции и разработки новых подходов по борьбе с ней. Создание коллекций возбудителей с разным спектром антимикробной резистентности названо в числе приоритетов в «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации до 2030 г.» [3], что подчеркивает актуальность этого вопроса для России. Необходимое условие создания биобанка – стандартизация всех этапов: сбора, транспортировки, обработки и хранения образцов, что позволит обеспечить их высокое качество. При создании коллекций принципиально важным аспектом является формирование паспорта каждого образца, в котором должны содержаться сведения как о возбудителе инфекции (генотип, спектр лекарственной устойчивости и т.п.), так и о доноре образца (особенности течения инфекции, эпидемиологические данные и т.п.).

Наиболее распространенным способом хранения бактериальных культур является их заморозка. Согласно данным литературы, разные виды микроорганизмов могут отличаться по своей способности переносить замораживание. Основные факторы, которые могут оказать негативное воздействие на жизнеспособность клетки при ее заморозке – это температурный (холодовой) шок, концентрирование веществ во внешней среде клеток (во время замерзания воды происходит дегидратация клеток и увеличение концентрации внутриклеточных веществ, оказывающих на клетку токсическое влияние); образование кристаллов льда (как внутриклеточных, так и внеклеточных) ведет к механическим повреждениям мембран клеток [4–6]. Для снижения негативных воздействий заморозки на клетки в суспензию перед криоконсервацией рекомендуется добавлять вещества, минимизирующие ее повреждающее воздействие и стабилизирующие липидные мембраны [7].

В настоящее время не существует единого подхода для криоконсервации и хранения культур МБТ. Исследователи предлагают различные варианты состава

сред для заморозки, температурные режимы хранения и варианты скорости заморозки клеток МБТ [8–10].

Цель исследования – разработать технологию замораживания и длительного хранения культур МБТ, которая позволит максимально сохранить жизнеспособность клеток, и определить ее место в технологическом процессе работы микробиологической лаборатории.

Материалы и методы

Работа была проведена в научном отделе микробиологии и доклинических исследований Уральского НИИ фтизиопульмонологии – филиала ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России. Для определения оптимальных условий хранения культур МБТ был поставлен эксперимент, схема которого приведена на Рисунке 1. Из музейной культуры *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv TMC#102 ГНИИ им. Тарасевича, выращенной в течение трех недель на плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена, была приготовлена суспензия с концентрацией микробных тел (м.т.) $1,5 \times 10^8$ /мл (0,5 по МакФарланд). Одну часть суспензии готовили с использованием 0,9% раствора NaCl, вторую часть – с использованием жидкой питательной среды Миддлбрука 7H9. Контроль фактического количества живых клеток в приготовленных суспензиях оценивали путем посева 100 мкл суспензии из разведения с концентрацией 10^3 м.т./мл на плотную питательную среду Левенштейна – Йенсена в трех повторах. Через 21 день производили подсчет числа выросших колоний. Приготовленную суспензию вносили в криопробирки объемом до 1 мл, содержащие 0,9% раствор NaCl или среду Миддлбрука 7H9 соответственно, с добавлением глицерина в различных концентрациях (0%, 4,0%, 20,0%, 50,0% по конечному объему). Конечный объем суспензии в каждой криопробирке составлял 0,8 мл. Всего было приготовлено по 6 пробирок с каждым вариантом состава среды. По 3 пробирки с каждым вариантом состава среды помещали в криозамораживатель CoolCell, который загружали в морозильную камеру MDF-U53V, Sanyo при температуре -80°C , обеспечивая постепенную скорость заморозки $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Оставшиеся пробирки помещали в ту же морозильную камеру в обычном штативе.

Через 10 мес. хранения все пробирки были извлечены из морозильной камеры и разморожены при комнатной температуре. Из каждой пробирки были приготовлены серии десятикратных разведений и произведен посев на питательную среду Левенштейна – Йенсена по 100 мкл суспензии МБТ без разведения (с концентрацией МБТ до заморозки 10^8 м.т./мл) и трех ее разведений в 4–6 раз, что соответствовало концентрациям МБТ до заморозки 10^2 , 10^3 , 10^4 м.т./мл (посевная доза 10^7 , 10^3 , 10^2 и 10^1 м.т./пробирка) в трех повторах для каждой криопробирки. Посевы инкубировали при 37°C в течение 21 дня, после чего производили подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ).

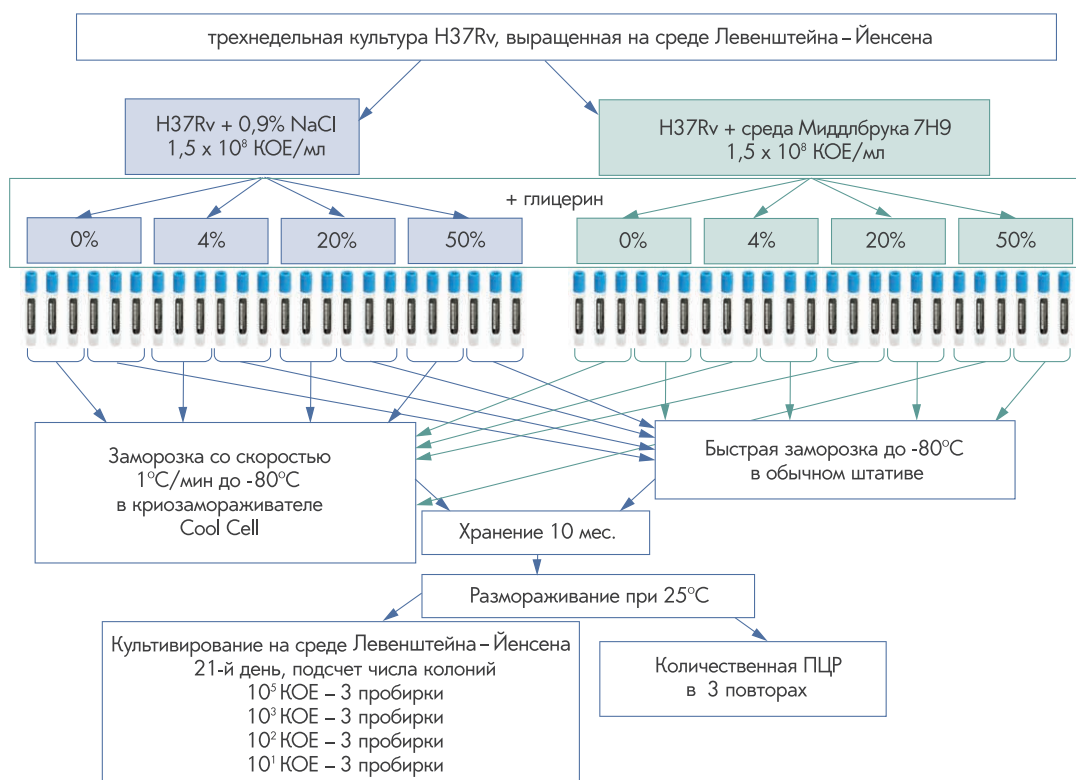


Рисунок 1. Схема эксперимента по подбору оптимальных условий для длительного хранения культур МБТ

Оставшиеся части клеточных суспензий из криопроби-рок с концентрацией 10^4 были использованы для выделения ДНК *M. tuberculosis* (по 100 мкл суспензии, три повтора) и проведения количественной ПЦР с использованием набора «Амплитуб-РВ» («Синтол», Россия), с предварительной инкубацией при комнатной температуре в растворе «Амплитуб-Преб» («Синтол», Россия) в течение 1 ч.

Эффективность выбранного способа хранения оценивали по доле живых клеток, оставшихся после размораживания суспензий (общее количество клеток по данным ПЦР/количество КОЕ на среде Левенштейна – Йенсена). Для оценки статистической значимости различий рассчитывали 95% доверительный интервал для доли, при перекрывании доверительных интервалов различия между группами считали статистически незначимыми.

Результаты

Оценка интенсивности роста МБТ на плотной питательной среде Левенштейна – Йенсена показала, что до заморозки концентрация МБТ в исходной суспензии соответствовала расчетному значению 7×10^8 м.т./мл. После размораживания при посеве исходной суспензии с максимальной концентрацией МБТ (до заморозки – 7×10^8 м.т./мл) наблюдался сплошной рост МБТ во всех пробирках, независимо от условий заморозки и хранения. Подсчет КОЕ удалось произвести при посевной дозе 10^2 – 10^3 м.т./пробирка. Чтобы сопоставить результаты и произвести расчет доли жизнеспособных клеток, количественная ПЦР была проведена только из пробирок с разведениями 10^4 м.т./мл, что соответствовало дозе 10^3 м.т./пробирка. Полученные результаты показали, что после хранения культур при различных усло-

Таблица 1. Результаты оценки жизнеспособности клеток МБТ при разных условиях заморозки

Среда	Доля жизнеспособных клеток в % (95% ДИ)							
	0,9% NaCl				Миддлбрука 7H9			
Концентрация глицерина	0%	4,0%	20,0%	50,0%	0%	4,0%	20,0%	50,0%
Заморозка быстрая -80°C	2,8 (0,45–5,5)	6,8 (3,5–14,7)	16,9 (8,6–42,4)	4,5 (1,2–12,7)	2,9 (1,3–18)	2,4 (1,2–6,9)	9,8 (5,9–17,8)	4,7 (2,4–12)
Криозамораживатель -80°C, 1°C/мин	8,7 (2,1–21,2)	5,6 (2,7–11,4)	4,2 (2,6–7,5)	1,6 (0,97–3,2)	1,8 (0,08–3,7)	2,8 (1,3–9,3)	1,2 (0,77–2,3)	1,5 (0,8–2,8)

виях жизнеспособными остаются от 1,2% до 16,9% клеток МБТ (Таблица 1). Наибольший процент живых клеток МБТ – 16,9% (95% ДИ 8,6–42,4%) – был выявлен в условиях заморозки без криозамораживателя в 0,9% растворе NaCl с добавлением глицерина (20,0% объемная доля). Однако статистически значимых различий этого показателя не было выявлено и при использовании среды, содержащей 0,9% раствор NaCl с добавлением 4,0% или 50,0% глицерина, а также среды Миддлбрука 7Н9 с глицерином и без него. Использование криозамораживателя значимо снижало жизнеспособность клеток в средах, содержащих высокие концентрации глицерина.

Обсуждение

Согласно Федеральным клиническим рекомендациям [11], основными методами выделения МБТ является культивирование на плотной (среда Левенштейна – Йенсена) и жидкой (среда Миддлбрука 7Н9 с использованием анализатора BACTEC MGIT 960/320) питательных средах с последующим определением лекарственной чувствительности выделенной культуры методом абсолютных концентраций (плотные среды) и/или методом пропорций (жидкие среды). На наш взгляд, процедура отбора образцов для хранения должна быть встроена в процесс рутинной работы лаборатории с учетом ее особенностей. Анализируя результаты, полученные в эксперименте по заморозке и хранению культур, можно заключить, что несколько вариантов условий будут иметь одинаковый результат. Для надежного сохранения образца необходимо обеспечить исходно высокую концентрацию клеток. Таким образом, для заморозки и хранения культур МБТ, выращенных на плотной питательной среде, оптимальным вариантом является среда, состоящая из 0,9% раствора NaCl с добавлением глицерина

(20,0% объемная доля), поскольку этот способ не требует дорогостоящих компонентов (среды Миддлбрука), при этом обеспечивая достаточно высокий уровень сохранения жизнеспособности культуры. Пробирки следует помещать в морозильную камеру при температуре -80°C без использования криозамораживателя. При использовании метода абсолютных концентраций отбор суспензии клеток МБТ наиболее рационально производить во время проведения теста лекарственной чувствительности, при этом для заморозки следует использовать готовую суспензию МБТ, имеющую наибольшую концентрацию возбудителя и оставшуюся после определения его лекарственной чувствительности.

В случае получения культуры МБТ из клинического образца на жидкой питательной среде необходимо оставить пробирку в термостате еще на 2 недели для получения более массивного роста, после чего следует произвести отбор осадка (центрифугирование в течение 15 мин. при 1500 об/мин) в криопробирку с 0,9% NaCl с добавлением глицерина (20,0% объемная доля).

Использование криопробирок объемом до 1 мл позволяет сохранить достаточное количество культуры, при этом экономится место в морозильной камере по сравнению с использованием стандартных криопробирок до 2 мл.

Для заполнения паспорта замороженной культуры необходимо иметь данные о спектре ее лекарственной устойчивости. Выявление в ДНК МБТ мутаций, ассоциированных с устойчивостью к антимикробным препаратам, в случае достаточного количества ДНК в пробе можно осуществить непосредственно из клинического материала. Если из клинического образца генетические исследования на предыдущих этапах не были проведены по причине недостаточной бактериальной нагрузки в пробе, то при отборе культуры для хранения в биобанке также необходимо провести отбор части суспензии для

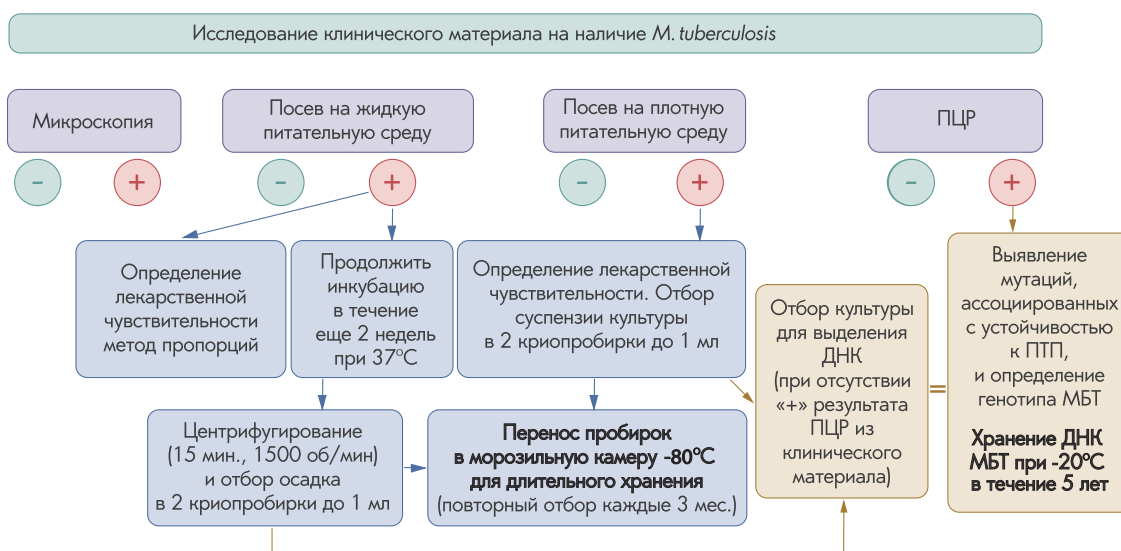


Рисунок 2. Алгоритм работы с клиническими изолятами МБТ для определения их лекарственной чувствительности и хранения в биобанке

выделения ДНК и проведения необходимых генетических исследований. Повторный отбор культур для хранения в биобанке необходимо производить каждые 3 месяца в случае сохраняющегося бактериовыделения или в случае получения от одного пациента изолятов из разных локализаций туберкулезного процесса, вне зависимости от времени их выделения. Описанный алгоритм отбора и хранения образцов представлен на Рисунке 2.

Заключение

Для проведения текущих и будущих исследований во фтизиатрии необходимо создание и поддержание коллекции культур МБТ, полученных от пациентов, больных туберкулезом. В ходе настоящей работы были опреде-

лены оптимальные условия для хранения культур МБТ: среда для заморозки и хранения клеток МБТ, состоящая из 0,9% раствора NaCl с добавлением 20,0% глицерина (объемная доля) и заморозка при -80°C без использования криоамортизатора. Сохранение культуры *M. tuberculosis* должно стать обязательным этапом рутинной работы микробиологической лаборатории фтизиатрической службы.

Исследование выполнено в рамках государственного задания на выполнение НИР «Создание биобанка микобактерий туберкулеза (культур, ДНК) и образцов тканей пациентов, больных туберкулезом и коинфекцией ВИЧ/туберкулез», регистрационный № НИОКТРАААА-А18-118072390015-9.

Литература

1. Nechaeva O. B. Tb situation in Russia. *Tuberc Lung Dis.* 2018;96(8):15-24. Russian. (Нечаева О.Б. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в России. Туберкулез и болезни легких. 2018;96(8):15-24.) DOI: 10.21292/2075-1230-2018-96-8-15-24
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf> Accessed July 01, 2021.
3. Government of the Russian Federation. Order dated September 25, 2017 No. 2045-R, p. 13, 2017 Available at: <http://static.government.ru/media/files/uQZdLRkPLAdEVdaBsQrk505szCcl4PA.pdf> Accessed July 01, 2021. Russian. (Правительство Российской Федерации. Распоряжение от 25 сентября 2017 г. № 2045-Р, 2017. Доступно по адресу: <http://static.government.ru/media/files/uQZdLRkPLAdEVdaBsQrk505szCcl4PA.pdf> Ссылка активна на 01 июля 2021 г.)
4. Calcott P.H., Rose A.H. Freeze-thaw and cold-shock resistance of *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma membrane lipid composition. *J Gen Microbiol.* 1982;128(3):549-555. DOI: 10.1099/00221287-128-3-549
5. Bhat S. N., Sharma A., Bhat S. V. Vitrification and glass transition of water: Insights from spin probe ESR. *Phys Rev Lett.* 2005;95(23):235702. DOI: 10.1103/PhysRevLett.95.235702
6. Lewis J. G., Learmonth R. P., Watson K. Role of growth phase and ethanol in freeze-thaw stress resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 1993;59(4):1065-1071. DOI: 10.1128/aem.59.4.1065-1071.1993
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. Available at: www.fao.org/3/i3017e/i3017e00.htm. Accessed July 01, 2021.
8. Huang T.S., Chen Y.S., Lee S.S.J., Tu H.Z., Liu Y.C. Preservation of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* complex directly from MGIT culture tubes. *Ann Clin Lab Sci.* 2005;35(4):455-458. PMID: 16254265
9. Kim T.H., Kubica G.P. Long-term preservation and storage of mycobacteria. *Appl Microbiol.* 1972;24(3):311-317. DOI: 10.1128/aem.24.3.311-317.1972
10. Shu Z., Weigel K. M., Soelberg S.D., Lakey A., Cangelosi G.A., Lee K-H., et al. Cryopreservation of *Mycobacterium tuberculosis* complex cells. *J Clin Microbiol.* 2012;50(11):3575-3580. DOI: 10.1128/JCM.00896-12
11. Federal clinical guidelines for the organization and conduct of microbiological and molecular genetic diagnostics of tuberculosis. 2014. Available at: http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/rec8.pdf. Accessed July 01, 2021. Russian. (Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза 2014. Доступно по адресу: http://roftb.ru/netcat_files/doks2015/rec8.pdf. Ссылка активна на 01 июля 2021 г.)