



УДК: 005:002.5:626.074

DOI: 10.26212/2227-1937.2023.43.11.009

Получена: 10 марта 2023/ Принята: 5 апреля 2023 / Опубликовано online: 01 июля 2023

З.Е. Байкенова <https://orcid.org/0000-0002-7229-9940>О.Э. Шарипов <https://orcid.org/0009-0000-1040-8331>М.Б. Байкенова <https://orcid.org/0000-0001-5697-0370>К.К. Хакимова <https://orcid.org/0009-0002-2782-1274>*КГП «Костанайский областной центр фтизиопульмонологии» УЗКО, г. Костанай, Казахстан***КРИОКОНСЕРВАЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ M. TUBERCULOSIS В УСЛОВИЯХ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ ОБЛАСТНОГО ЦЕНТРА ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИИ**

Резюме: Цель исследования – оценить эффективность практикуемой процедуры криоконсервации бактериальных штаммов в бактериологической лаборатории Костанайского областного центра фтизиопульмонологии (КОЦФ). В статье рассмотрен показатель уровня жизнеспособности *M. tuberculosis*, выделенных из клинических образцов, в зависимости от периода криоконсервации (1-5 лет) при температуре -80°C. Обнаружена корреляция между количеством штаммов сохранивших жизнеспособность и периодом хранения. Количество жизнеспособных штаммов градиентно снижается с увеличением срока хранения. Выявлено, что клинические изоляты МТБ могут храниться при -80°C в растворе, содержащем 1% глицерин, до 4 лет без значительной потери жизнеспособности. Не обнаружено зависимости между профилем антибиотикорезистентности и восстановлением жизнеспособности после длительного хранения при -80°C.

Ключевые слова: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, консервация, архивирование бактериальных культур, множественная лекарственная устойчивость.

З.Е. Байкенов <https://orcid.org/0000-0002-7229-9940>О.Е. Шарипов <https://orcid.org/0009-0000-1040-8331>М.Б. Байкенов <https://orcid.org/0000-0001-5697-0370>Қ.Қ. Хакимов <https://orcid.org/0009-0002-2782-1274>*«Қостанай облыстық фтизиопульмонология орталығы» КМК УЗКО, Қостанай, Қазақстан***ОБЛЫСТЫҚ ФТИЗИОПУЛЬМОНОЛОГИЯ ОРТАЛЫҒЫНЫҢ БАКТЕРИОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТХАНАСЫНДА M. TUBERCULOSIS КЛИНИКАЛЫҚ ИЗОЛЯТТАРЫН КРИОКОНСЕРВАЦИЯЛАУ**

Түйін: Зерттеудің мақсаты – ҚОФО бактериологиялық зертханасында бактериялық штаммдарды криоконсервациялау процедурасының тиімділігін бағалау. Мақалада -80°C температурада криоконсервация кезеңіне (1-5 жыл) байланысты клиникалық үлгілерден оқшауланған *M. tuberculosis* өміршеңдік деңгейінің көрсеткіші қарастырылады. Өміршеңдігін сақтаған штаммдар саны мен сақтау мерзімі арасында корреляция табылды. Өміршең штаммдардың саны сақтау мерзімінің ұлғаюымен градиентті түрде төмендейді. ТБМ клиникалық изоляттарын -80°C температурада құрамында 1% глицерин бар ерітіндіде өміршеңдігін айтарлықтай жоғалтпай 4 жылға дейін сақтауға болатындығы анықталды. Антибиотикке төзімділік профилі мен -80°C температурада ұзақ уақыт сақтағаннан кейін өміршеңдікті қалпына келтіру арасында байланыс табылған жоқ.

Түйін сөздер: туберкулез, *Mycobacterium tuberculosis*, консервация, бактерияларды сақтау, көптеген дәрілерге төзімді туберкулез.

Z.E. Baikenov <https://orcid.org/0000-0002-7229-9940>O.E. Sharipov <https://orcid.org/0009-0000-1040-8331>M.B. Baikenov <https://orcid.org/0000-0001-5697-0370>K.K. Khakimov <https://orcid.org/0009-0002-2782-1274>*PSE "Kostanay Regional Center for Phthisiopulmonology" UZKO, Kostanay, Kazakhstan***CRYOPRESERVATION OF CLINICAL ISOLATES OF M. TUBERCULOSIS IN THE BACTERIOLOGICAL LABORATORY OF THE REGIONAL CENTER OF PHTHISIOPULMONOLOGY**

Resume: The purpose of the study was to evaluate the effectiveness of the practiced cryopreservation of bacterial strains procedure in the bacteriological laboratory of the Kostanay Regional Center of Phthisiopulmonology (KRCF). In the article the viability of *M. tuberculosis* isolated from clinical samples were studied depending on the preservation period (1-5 years) at a temperature of -80°C . It was found that there is a correlation between viability rates and the storage period. The number of viable strains gradually decreases with increasing storage period. It was found that clinical isolates of MTB can be stored at -80°C in a solution containing 1% glycerol for up to 4 years without significant loss of viability. There was no significant difference in the recovery rates between all-susceptible and MDR strains.

Keywords: tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis*, conservation, preservation of bacterial cultures, multidrug resistant tuberculosis.

Введение. На данный момент туберкулез (ТБ) оценивается Всемирной организацией здоровья (ВОЗ) как вторая главная причина смертности во всем мире от одной инфекции после COVID-19 [1]. В связи с чем, предупреждение и контроль заболеваемости ТБ является приоритетной задачей глобальных организаций и национальных ведомств большинства стран, в особенности стран с тяжелым бременем ТБ, в число которых входит и Казахстан [1]. Несмотря на относительно высокий уровень MDR/RR-TB, в целом благодаря комплексной работе по борьбе с распространением и последствиями ТБ в Казахстане за последние годы наблюдается стабильное снижение уровня заболеваемости ТБ [2,3]. Для повышения эффективности данной работы необходимо развивать и совершенствовать все уровни фтизиопульмонологической службы, в том числе лабораторную диагностику. Одним из аспектов лабораторной диагностики ТБ является создание и ведение биобанков или коллекций штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ), выделенных из клинических образцов. Правильная техника криоконсервации изолятов МБТ и их сохранность на протяжении длительного периода времени представляет важность как для рутинной работы бактериологической лаборатории, так и, потенциально, для фундаментальных биомедицинских исследований [4,5]. Главным критерием успешного функционирования биобанка является сохранение микроорганизмами жизнеспособности и основных биологических свойств, присущих виду, что может быть достигнуто при правильной процедуре подготовки и хранения изолятов. Сохранность бактериальных штаммов при длительной консервации зависит от двух факторов: температуры хранения и криопротективных свойств питательной среды [6,7]. В бактериологической лаборатории КГП «КОЦФ» выделенные штаммы МБТ хранятся при температуре -80°C , в качестве криопротектора используется 1%-ный раствор глицерина с физиологическим раствором (NaCl, 0.9%), что согласно литературе [5-7] является вариантом выбора для длительного хранения МБТ.

Цель данного исследования: оценить эффективность практикуемой процедуры криоконсервации бактериальных штаммов путем определения жизнеспособности МБТ, находящихся на хранении при температуре -80°C в течение 5 лет, 4 лет, 3 лет, 2 лет и 1 года. Актуальность выбранной темы обуславливается тем, что в отечественной и зарубежной литературе данный вопрос освещен исследователями недостаточно широко, а большинство работ написаны десятилетия назад. Кроме того, в литературе имеются неоднозначные данные [6,7] о разной переносимости длительной криоконсервации штаммами МБТ с различным

профилем антибиотикорезистентности. В виду этого, нами проведен сравнительный анализ степени жизнеспособности микобактерий в зависимости от чувствительности к противотуберкулезным препаратам (ППП).

Материалы и методы исследования. Бактериальные штаммы. В исследовании использовано 250 штаммов *M. tuberculosis*, замороженных в течение предыдущих 5 лет: по 50 штаммов, помещенных в морозильную камеру в 2018 г, 2019 г, 2020 г, 2021, 2022 г. Отбор культур производился по двум критериям: антибиотикочувствительность и этап лечебно-диагностического алгоритма. Было отобрано 125 культур с сохраненной чувствительностью к ППП первого ряда и 125 культур с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Штаммы были выделены из диагностического клинического материала пациентов КОЦФ. Все культуры до консервации прошли процедуру идентификации с помощью экспресс-теста SD BIOLINE TB Ag MPT64, микроскопического исследования на наличие кислотоустойчивых бактерий, исключена вероятность контаминации посторонней микрофлорой. Видовая принадлежность также подтверждена одним или несколькими из следующих молекулярно-генетических тестов: GeneXpert MTB-Rif, ExiStation (Bioneer), LPA (Hain Lifescience).

Процедура криоконсервации. Криоконсервации подвергались культуры, выращенные на среде Левенштейна-Йенсена при 37°C в течение 21-25 дней после прямого посева деконтаминированного материала, либо после субкультивирования с жидкой питательной среды Middlebrook 7H9 из пробирки MGIT. После инкубации с поверхности плотной среды стерильной бактериологической петлей снимали не менее 5 колоний и переносили в криопробирку со средой для криоконсервации. В качестве среды для заморозки использовался 1%-ный раствор глицерина в физиологическом растворе. Далее криопробирки помещались в морозильную камеру и хранились при постоянной температуре -80°C .

Субкультивирование штаммов после хранения. По заранее составленному списку криопробирки со штаммами были извлечены из морозильной камеры, разморожены при комнатной температуре. 200 мкл каждой суспензии были инокулированы на среду Левенштейна-Йенсена. После 3 недель инкубации при 37°C производилась четка результатов. Критерием жизнеспособности микобактерий после хранения при -80°C считали наличие или отсутствие колониеобразующих единиц (КОЕ) на среде.

Результаты и обсуждение. Согласно результатам исследования, представленным в таблице 1, имеется корреляционная зависимость между количеством штаммов сохранивших жизнеспособность и периодом

хранения. С увеличением срока хранения количество жизнеспособных штаммов постепенно снижается. Спустя 1 год консервации все 50 посеянных штаммов (100%) выросли на плотной среде, затем доля изолятов, восстановивших рост, градиентно снижается. После 2 лет хранения высеваемость составила 88%, после 3 и 4 лет значение высеваемости практически равное – 70% и 72%, соответственно, и для бактериальных культур, находящихся при низких температурах не менее 5 лет высеваемость составила 52%. Примечательно, что в исследованиях Huang T.S. и Kim T.H. [6,7] доля штаммов, сохранивших жизнеспособность после криоконсервации, составляла порядка 90% до 7 лет хранения включительно, достигая 50% к 9-летнему сроку криоконсервации. В указанных работах

методика криоконсервации и температура хранения соответствует таковым в лаборатории КОЦФ, отличается лишь среда для заморозки, Huang T.S. и Kim T.H. использовали среду Middlebrook 7H9. Согласно некоторым данным, чувствительные ко всем антибиотикам штаммы лучше переносят хранение при низких температурах, чем штаммы с какой-либо устойчивостью [6]. В нашем исследовании, однако, такой зависимости обнаружено не было. Чувствительные и устойчивые штаммы одинаково сохраняли жизнеспособность в течение 5 лет. Отсутствие зависимости показателя выживаемости МБТ от профиля антибиотикорезистентности также отмечает в своей работе и другие авторы [5-7].

Таблица 1 - Жизнеспособность микобактерий после криоконсервации

Срок хранения	Общее количество образцов		Из них штаммы с сохраненной чувствительностью		Из них штаммы с МЛУ	
	Всего	Рост	Всего	Рост	Всего	Рост
1 год	50	50 (100%)	25	25 (100%)	25	25 (100%)
2 года	50	44 (88%)	25	21 (84%)	25	23 (92%)
3 года	50	35 (70%)	25	19 (76%)	25	16 (64%)
4 года	50	36 (72%)	25	19 (76%)	25	17 (68%)
5 лет	50	26 (52%)	25	11 (44%)	25	15 (60%)

Выводы. Данное исследование показало, что клинические изоляты МТБ могут храниться при -80°C в растворе, содержащем 1% глицерин, до 4 лет без значительной потери жизнеспособности. Однако литературные данные [5-7] свидетельствуют о сохранении жизнеспособности на протяжении большего срока, в среднем до 7 лет при температуре -70-80°C. Учитывая, что основными факторами, обеспечивающими сохранность бактериальных штаммов при длительной консервации, являются температура и питательная среда, полученные нами результаты, вероятно, связаны с использованием разных растворов для заморозки. Что обуславливает актуальность дальнейшего изучения данной темы. Вместе с тем, в ходе исследования не было обнаружено корреляции между профилем антибиотикорезистентности и восстановлением жизнеспособности после длительного хранения при -80°C, что подтверждается результатами современных исследований [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. – World Health Organization, 2022
 2 Статистический обзор по туберкулезу в Республике Казахстан / под ред. М.М. Аденова. – Алматы, 2019. – 58 с.
 3 TB data [website]. Geneva: World Health Organization; 2022 (https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_pronto/).
 4 Shu Z, Weigel KM, Soelberg SD, Lakey A, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, Gao D. Cryopreservation of Mycobacterium tuberculosis complex cells. J Clin Microbiol. 2012 Nov; 50(11):3575-80.

5 Умпелева Т. В., Еремеева Н. И., Вахрушева Д. В. Разработка технологии длительного хранения культур микобактерий туберкулеза //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2021. – Т. 23. – №. 4. – С. 404-408.
 6 Ikuta, Cassia & Ambrosio, Simone & de Souza Filho, Antonio & Filho, J.H. & Heinemann, Marcos & Neto, José & Amaku, Marcos. (2016). Cryopreservation of Mycobacterium bovis isolates. Semina: Ciências Agrárias. 37. 3701-3708.
 7 Ланкина М. В., Кутулуцкая Т. В., Оспанова Г. Т. Консервация микобактерий туберкулеза. //Лабораторная медицина –1-2(4)2012-2013. С. 69-71.

REFERENCES

1 World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. – World Health Organization, 2022
 2 Statisticheskij obzor po tuberkulezu v Respublike Kazakhstan / pod red. M.M. Adenova. – Almaty, 2019. – 58 s.
 3 TB data [website]. Geneva: World Health Organization; 2022 (https://worldhealthorg.shinyapps.io/tb_pronto/).
 4 Shu Z, Weigel KM, Soelberg SD, Lakey A, Cangelosi GA, Lee KH, Chung JH, Gao D. Cryopreservation of Mycobacterium tuberculosis complex cells. J Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3575-80.
 5 Umpeleva T. V., Eremeeva N. I., Vahrusheva D. V. Razrabotka tehnologii dlitel'nogo hranenija kul'tur mikobakterij tuberkuleza //Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2021. – Т. 23. – №. 4. – С. 404-408.
 6 Ikuta, Cassia & Ambrosio, Simone & de Souza Filho, Antonio & Filho, J.H. & Heinemann, Marcos & Neto, José & Amaku, Marcos. (2016). Cryopreservation of

Mycobacterium bovis isolates. Semina: Ciências Agrárias.
37. 3701-3708.

7 Lankina M. V., Kutuluckaja T. V., Ospanova G. T.
Konzervacija mikobakterij tuberkuleza. //Laboratornaja
medicina. - 1-2(4)2012-2013. S. 69-71.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами. При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами. Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ.

Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ. Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

No conflicts of interest have been declared.

This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers. There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work. Funding - no funding was provided.

Сведения об авторах

№	ФИО (полностью)	Должность, место работы	Телефон	Эл.почта
1	Байкенова Зайтна Ермековна 0000-0002-7229-9940	Специалист бактериологической лаборатории, КГП «Костанайский областной центр фтизиопульмонологии» УЗ КО	+77479222712	bzaitna@gmail.com
2	Шарипов Озодий Эргашевич 0009-0000-1040-8331	И.о. заведующего бактериологической лаборатории КГП «Костанайский областной центр фтизиопульмонологии» УЗ КО	+77056698024	kocf-baklab@yandex.kz
3	Байкенова Мадина Багатчановна, 0000- 0001-5697-0370	Специалист бактериологической лаборатории, КГП «Костанайский областной центр фтизиопульмонологии» УЗ КО	+77471169526	baykenovamadina@mail.ru
4	Хакимова Куляш Кабдоловна. 0009- 0002-2782-1274	Старший лаборант бактериологической лаборатории, КГП «Костанайский областной центр фтизиопульмонологии» УЗ КО	+77783731850	kulyashh67@bk.ru