

УДК 619:616.98:579.873.21

А.І. Завгородній^{1*}, В.В. Білушко¹, М.В. Калашник¹,
С.А. Позмогова¹, А.П. Палій¹, О.В. Павліченко²

Експериментальне обґрунтування складу захисних середовищ та режиму заморожування під час ліофілізації *Mycobacterium avium*

UDC 619:616.98:579.873.21

A.I. Zavhorodnii^{1*}, V.V. Bilushko¹, M.V. Kalashnyk¹,
S.A. Pozmogova¹, A.P. Paliy¹, O.V. Pavlichenko²

Protective Media Composition and Freezing Regimen Experimental Substantiation During *Mycobacterium Avium* Freeze-Drying

Ключові слова: мікобактерії, захисне середовище, концентрація, температура, ліофілізація, культивування, життєздатність.

Key words: mycobacteria, protective medium, concentration, temperature, freeze-drying, cultivation, viability.

Спорадичні випадки туберкульозу птиці викликані збудником *Mycobacterium avium*. Захворювання відмічають як у домашньої, так і у багатьох видів дикої та зоопаркової птиці [3, 4].

Для виявлення туберкульозу та забезпечення фахівців ветеринарної медицини якісними діагностичними препаратами необхідні штамподуцентні зі стабільними біологічними властивостями [5]. Підтримання штамів на щільних та рідких живильних середовищах шляхом чисельних пасажувань може повністю або частково змінити їхні морфологічні, вірулентні, анти- та протеїногенні властивості, а також призвести до дисоціації. У подальшому це впливатиме як на біологічні властивості, так і на активність та специфічність виготовлених діагностичних препаратів [6]. Найбільш надійним технологічним методом збереження референтних та виробничих штамів мікроорганізмів є сублимаційне висушування [1, 2]. Проте залишаються нез'ясованими питання щодо життєздатності, збереження тінкторіальних, культуральних, біологічних і антигенних властивостей *M. avium*.

Мета роботи — визначення складу захисного середовища, концентрації біомаси у ньому та режиму заморожування перед ліофілізацією

Sporadic cases of poultry tuberculosis are caused by *Mycobacterium avium*. The disease is found both in domestic as well as major species of wild and zoo birds [3, 4].

Producing strains with stable biological properties are needed to detect tuberculosis and provide veterinary medicine specialists with high-quality diagnostic drugs [5]. Maintaining strains on dense and liquid nutrient media by means of multiple passages can completely or partially change their morphological, virulence, anti- and proteinogenic properties, as well as lead to dissociation. In future, this will affect both the biological properties as well as activity and specificity of the manufactured diagnostic preparations [6]. The most reliable technique for preserving the reference and production strains of microorganisms is freeze-drying [1, 2]. However, the questions regarding viability, preservation of tinctorial, cultural, biological and antigenic properties of *M. avium* remain unsolved.

The research purpose was to determine the composition of protective medium, biomass concentration in it, and the freezing regimen prior to freeze-drying for a long-term preservation of the viability and biological properties of *M. avium* tuberculosis pathogen.

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків
²Державний біотехнологічний університет, м. Харків

¹National Scientific Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine', Kharkiv
²State Biotechnological University, Kharkiv

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: bw.pochta@gmail.com

***To whom correspondence should be addressed:**

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: bw.pochta@gmail.com

Надійшла 13.10.2021
Прийнята до друку 17.05.2023

Received 13, October, 2021
Accepted 17, May, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

для тривалого збереження життєздатності та біологічних властивостей збудника туберкульозу *M. avium*.

У роботі використовували референтну культуру збудника туберкульозу виду *M. avium* (об'єкт дослідження). Культура *M. avium* штам ІЕКВМ УААН виділена з біоматеріалу, паспортизована та задепонована у Державному науково-контрольному інституті біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ), зберігається у колекції культур мікроорганізмів Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (м. Харків).

Ліофілізацію зразків здійснювали на установці «LZ-4527» (Frigera, Чехія) за відповідним технологічним регламентом. У якості захисних сполук застосовували середовища: 1 — 10% сахарози та 2,0% желатину (на стерильному ізотонічному розчині); 2 — 10% сахарози та 1,5% желатину (на стерильній дистильованій воді); 3 — 10% сахарози, 1,5% желатину та 0,1% агару (на стерильному ізотонічному розчині). Виготовлені захисні середовища (кожне окремо) розливали у п'ять флаконів і піддавали 30-хвилинній стерилізації шляхом автоклавування. Після перевірки на стерильність до кожного флакону вносили живу бактеріальну масу 25-добової культури *M. avium*, вирощеної на картопляному середовищі Павловського, у концентраціях 1, 100, 200, 300 і 400 мг/см³ захисних середовищ [6]. Отриману суспензію кожного розведення у середовищі розливали у стерильні флакони (ємністю 10 см³) по 5 см³ і розміщували у двох касетах, одну з яких заморожували за температури -30°C протягом 24 годин (режим 1), а другу — за температури -50°C протягом 12 годин (режим 2) до утворення у флаконі склоподібної маси. Після цього касети з флаконами поміщали у холодильну камеру (-65°C) на 2 години. Сублімаційне висушування зразків здійснювали за температури субліматора -50°C, після досягнення вакууму 100 мм рт. ст. полиці поступово підігрівали до 24°C зі швидкістю (2,0 ± 0,5) °C/годину протягом 36 годин з метою дегідратації. Залишкова вологість ліофілізованої культури *M. avium* у флаконах не перевищувала 3%. Культуру зберігали за температури 4°C.

Життєздатність ліофілізованої культури *M. avium* визначали після її регідратації стерильним ізотонічним розчином NaCl шляхом висіву 0,2 см³ у розведеннях 10⁻¹–10⁻¹⁰ зависі на щільне яєчне живильне середовище для культивування мікобактерій. Після цього пробірки з посівами культивували в термостаті за температури (37,5 ± 0,5)°C.

In our work we used the reference culture of the causative agent of tuberculosis of *M. avium* species (research object). The culture of *M. avium* strain of the Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine of the Ukrainian Academy of Agrarian Sciences was isolated from biomaterial, certified and deposited at the State Scientific and Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms (Kyiv), stored in the collection of microorganism cultures at the National Research Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine' (Kharkiv).

The samples were frozen-dried by means of LZ-4527 device (Frigera, Czech Republic) according to the relevant technological regulations. The following media were used as protective compounds: 1 – 10% sucrose and 2.0% gelatin (in a sterile isotonic solution); 2 – 10% sucrose and 1.5% gelatin (in sterile distilled water); 3 – 10% sucrose, 1.5% gelatin and 0.1% agar (with a sterile isotonic solution). The prepared protective media (each separately) were poured into five vials and subjected to 30-min sterilization by autoclaving. After testing for sterility, a live bacterial mass of a 25-day culture of *M. avium* grown with Pavlovsky's potato medium was added to each vial at concentrations of 1, 100, 200, 300, and 400 mg/cm³ of protective media [6]. The obtained suspension of each dilution in the medium was poured into sterile vials (with a capacity of 10 cm³) of 5 cm³ each and placed in two cassettes, one of which was frozen at a temperature of -30°C for 24 hours (mode 1), and the second at a temperature of -50°C for 12 hours (mode 2) until a vitreous mass formed in the vial. After that, the cassettes with vials were placed in a refrigerator (-65°C) for 2 hours. Sublimation drying of the samples was carried out at a sublimator temperature of -50°C, after reaching a vacuum of 100 mm Hg. Art. the shelves were gradually heated to 24°C at a rate of (2.0 ± 0.5)°C/hour for 36 hours for the purpose of dehydration. The residual moisture content of the frozen-dried culture of *M. avium* in vials did not exceed 3%. The culture was stored at a temperature of 4°C.

The viability of the frozen-dried culture of *M. avium* was determined after its rehydration with a sterile isotonic NaCl solution by plating 0.2 cm³ in 10⁻¹–10⁻¹⁰ dilutions of suspension with a dense egg nutrient medium to culture mycobacteria. Afterwards the test tubes with cultures were cultivated in a thermostat at a temperature of (37.5 ± 0.5)°C. Colony growth on the medium surface was recorded for 30 days with an interval of 5 days. Frozen-dried culture of *M. avium* was considered viable if there was characteristic growth in the test tubes.



Облік росту колоній на поверхні середовища проводили протягом 30 діб з інтервалом 5 діб. Ліофілізовану культуру *M. avium* вважали життєздатною за наявності характерного росту в пробірках. Тінкторіальні властивості вивчали у мазках, забарвлених за методом Циль-Нільсена. Антигенні властивості культури *M. avium*, вирощеної з ліофілізованих зразків, тестували за сироватково-краплинною реакцією аглютинації (СКРА) і крові-краплинною реакцією аглютинації (ККРА) [5]. Активність нативного антигена та у розведеннях 1:1 і 1:2 визначали за СКРА з позитивними та негативними сироватками крові курей. Специфічність антигену визначали у ККРА на шести експериментально заражених культурою *M. avium* у дозі 1,0 мг/см³ та трьох здорових курях [3].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили із застосуванням програми «Statistica 10.0» для Windows (StatSoft, США). Числові дані, отримані в результаті експерименту, обробляли методом варіаційної статистики за допомогою непараметричних критеріїв. Різницю між двома величинами вважали значущою на рівні $p < 0,05$.

Результати дослідження впливу вихідної концентрації біомаси, складу захисних середовищ і режимів заморожування на показник життєздатності мікобактерій після ліофілізації наведено у таблиці.

Встановлено, що за режимів заморожування -30°C (100, 200, 300 і 400 мг/см³) та -50°C (200, 300 і 400 мг/см³) життєздатність ліофілізованої культури *M. avium* була значуще нижчою у порівнянні з захисним середовищем 1, про-

Tinctorial properties were studied in the Ziehl-Neelsen stained smears. The antigenic properties of *M. avium* culture, grown from frozen-dried samples, were tested by the serum-drop agglutination test (SDAT) and blood-drop agglutination test (BDAT) [5]. The activity of the native antigen and in 1:1 and 1:2 dilutions was determined by SDAT with positive and negative blood sera of chickens. The specificity of the antigen was determined in BDAT in six chickens experimentally infected by *M. avium* culture at a dose of 1.0 mg/cm³ and three healthy ones [3].

Research results were statistically processed using the STATISTICA 10.0 for Windows (StatSoft, USA). Numerical data obtained as a result of the experiment were processed by the method of variational statistics using non-parametric criteria. The difference between the two values was considered significant at the level of $p < 0.05$.

The research results on the influence of the initial concentration of biomass, composition of protective media and freezing modes on viability of mycobacteria after freeze-drying are shown in the Table.

It was established that under freezing regimes of -30°C (100, 200, 300 and 400 mg/cm³) and -50°C (200, 300 and 400 mg/cm³) the viability of the frozen-dried culture of *M. avium* was significantly lower compared to the protective medium 1, however, with the regimen of -50°C (100 mg/cm³) no significant changes were found in comparison with protective medium 1.

The findings on the influence of the freeze-drying conditions for *M. avium* as well as the composition of protective media showed that

Життєздатність *M. avium* після ліофілізації ($M \pm m$, $n = 5$)

Viability of *M. avium* after freeze-drying ($M \pm m$, $n = 5$)

Захисне середовище Protective medium	Життєздатність <i>M. avium</i> (%) за режиму заморожування Viability of <i>M. avium</i> (%) under the freezing regimen											
	-30°C		-50°C		-30°C		-50°C		-30°C		-50°C	
	1 мг/см ³ 1 mg/cm ³		100 мг/см ³ 100 mg/cm ³		200 мг/см ³ 200 mg/cm ³		300 мг/см ³ 300 mg/cm ³		400 мг/см ³ 400 mg/cm ³			
1	46 ± 5,1	63 ± 6,8	55 ± 6,3	71 ± 6,4	54 ± 6,5	72 ± 6,9	51 ± 5,6	70 ± 8,1	47 ± 6,2	66 ± 7,3		
2	32 ± 3,5*	45 ± 4,7*	44 ± 5,2*	64 ± 7,5	43 ± 4,7*	64 ± 6,7*	38 ± 4,2*	51 ± 6,2*	37 ± 4,3*	40 ± 4,4*		
3	37 ± 4,2*	53 ± 5,5*	46 ± 5,7*	69 ± 8,1	49 ± 5,7	70 ± 7,3	41 ± 5,3*	55 ± 5,6*	39 ± 4,1*	43 ± 4,7*		

Примітка: * — результати значущі по відношенню до середовища 1, $p \leq 0,05$.

Note: * – results are significant versus the medium 1, $p \leq 0.05$.



те за режиму -50°C (100 мг/см^3) значущих змін у порівнянні з захисним середовищем 1 не встановлено.

Результати вивчення впливу умов ліофілізації *M. avium* та складу захисних середовищ показали, що найбільш придатним для ліофілізації є середовище 1 за концентрації бактеріальної маси $100\text{--}200\text{ мг/см}^3$, що забезпечує збереження життєздатних клітин на рівні $71\text{--}72\%$.

Після встановлення оптимальної концентрації бактеріальної маси у захисному середовищі, режиму заморожування та ліофілізації вирощену культуру *M. avium* висівали на щільне живильне середовище та культивували для накопичення бактеріальної маси мікобактерій. Вивчали морфологічні, тінкторіальні, біохімічні і біологічні властивості у порівнянні з культурою *M. avium*, яку культивували на середовищі Павловського.

У зразках мазків, забарвлених за методом Циль-Нільсена, нативна та ліофілізована культури *M. avium* мали форму паличок яскраво-червоного кольору з округленими кінцями. Палички мали незначну зернистість, розташовувались у полі зору мікроскопа окремо або групами. Відмічали первинний ріст колоній за умов використання яєчного середовища на $12\text{--}14$ добу при 37 і 45°C . Колонії мали округлу форму, світло-сірий колір, маслянисту консистенцію, позитивну реакцію з телуридом калію, нікотинамідом і піразинамідом, негативну каталазну активність і реакцію з сечовиною, не утворювали пігмент у темряві та на світлі.

Результати вивчення біологічних властивостей нативної та ліофілізованої культури *M. avium* показали відсутність патогенності для морських свинок. Кролі, заражені нативною культурою, загинули через $21\text{--}32$ доби від септичної форми туберкульозу, а кури — через $38\text{--}82$ діб. Культура *M. avium* після $12\text{--}18$ -місячного зберігання у ліофілізованому стані викликала у кролів септичну форму туберкульозу на $16\text{--}21$ добу, а у курей — туберкульозні ураження печінки та загибель через $31\text{--}65$ діб після інокуляції.

Результати досліджень за СКРА показали позитивний результат тільки після використання сироватки крові хворих на туберкульоз курей з нативним та у розведенні $1:1$ і $1:2$ антигеном. Після дослідження за ККРА позитивні реакції відмічали тільки з пробами крові, відібраними від шести експериментально заражених курей із антигеном, який зберігався 6 місяців за температури 4°C .

За результатами порівняльних досліджень захисної дії різних середовищ встановлено,

the most suitable for freeze-drying was the medium 1 with a bacterial mass concentration of $100\text{--}200\text{ mg/cm}^3$, which ensured the preservation of viable cells at the level of $71\text{--}72\%$.

After establishing the optimal concentration of the bacterial mass in protective medium, the mode of freezing and freeze-drying, the grown culture of *M. avium* was plated with a dense nutrient medium and cultured to accumulate the bacterial mass of mycobacteria. Morphological, tinctorial, biochemical and biological properties were studied in comparison with the culture of *M. avium*, cultivated with Pavlovsky's medium.

Native and frozen-dried cultures of *M. avium* were bright red rods with rounded edges in Ziehl-Neelsen stained smear samples. The rods had a slight granularity, they were located in the field of view of the microscope individually or in groups. The primary growth of colonies was observed when the egg medium was used for $12\text{--}14$ days at 37 and 45°C . Colonies were of a rounded shape, light gray color, oily consistency, positive reaction with potassium tellurite, nicotinamide and pyrazinamide, negative catalase activity and reaction with urea; did not form pigment in the dark and in the light.

The results of studying the biological properties of the native and freeze-dried culture of *M. avium* showed the absence of pathogenicity in guinea pigs. Rabbits infected with the native culture died after $21\text{--}32$ days from the septic tuberculosis, and chickens did in $38\text{--}82$ days. *M. avium* culture after $12\text{--}18$ -month storage in a frozen-dried state caused a septic tuberculosis in rabbits for $16\text{--}21$ days, and in chickens it did the tuberculous liver lesions and death $31\text{--}65$ days after inoculation.

The results of the studies for SDTA showed a positive result only after using the blood serum of chickens suffering from tuberculosis with native antigen and in $1:1$ and $1:2$ dilution. After the SDTA the positive reactions were noted only with blood samples taken from six experimentally infected chickens with the antigen, which was stored for 6 months at 4°C .

Based on the results of comparative studies of protective effect of different media, we have established that the most suitable for freeze-drying of *M. avium* culture was the medium containing $100\text{--}200\text{ mg/cm}^3$ of bacterial mass. Such a medium ensures the preservation of tinctorial, cultural, biochemical and biological properties as well as viability of *M. avium* culture at the level of $71\text{--}72\%$. *M. avium* culture lyophilized with the pro-



що найбільш придатним для ліофілізації культури *M. avium* є середовище, яке вміщує 100–200 мг/см³ бактеріальної маси. Таке середовище забезпечує збереженість тінкторіальних, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей та життєздатність культури *M. avium* на рівні 71–72%. Ліофілізована на захисному середовищі 1 культура *M. avium* може застосовуватись як матриксний розплід для виробництва діагностичних препаратів (антигену) для ККРА, а також як референс-зразок для ідентифікації польових ізолятів мікобактерій. Це суттєво зменшує матеріальні витрати на періодичне пасажування на живильних середовищах і сприйнятливих лабораторних тваринах для підтримання біологічних властивостей культур мікобактерій.

Література

1. Уховський ВВ, Палій АП, Тарасов ОА, та ін. Застосування гліцерину та ДМСО для кріоконсервування лептоспір *Leptospira Interrogans*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; 29 (1): 102–6.
 2. Bircher L, Geirnaert A, Hammes F, et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microb Biotechnol*. 2018; 11 (4): 721–33.
 3. Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, et al. Tuberculosis in birds: Insights into the *Mycobacterium avium* infections. *Vet Med Int*. [Internet]. 2011 Jul 4 [cited 2022 Febr 14]; 2011:712369. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/712369/>
 4. Falkinham JO. *Mycobacterium avium* complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiol*. 2018; 4 (3): 428–38.
 5. Thomas J, Balseiro A, Gortázar C, et al. Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Vet Res*. [Internet]. 2021 Febr 24 [cited 2022 Febr 14]; 52:31(2021). Available from: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-020-00881-y>
 6. Udou T. Adaptation of mycobacteria on solid, egg-based media to anaerobic conditions and characterization of their diagnostic phenotypes. *J UOEH*. 2013; 35 (2): 109–17.
- ective medium 1 can be used as a matrix culture for the production of diagnostic drugs (antigen) for CKRA, and also as a reference sample for the identification of mycobacteria field isolates. This significantly reduces the costs as for periodic passaging with nutrient media and susceptible laboratory animals to maintain the biological properties of mycobacterial cultures.

References

1. Bircher L, Geirnaert A, Hammes F, et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microb Biotechnol*. 2018; 11 (4): 721–33.
2. Dhama K, Mahendran M, Tiwari R, et al. Tuberculosis in birds: Insights into the *Mycobacterium avium* infections. *Vet Med Int*. [Internet]. 2011 Jul 4 [cited 2022 Febr 14]; 2011:712369. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/712369/>
3. Falkinham JO. *Mycobacterium avium* complex: Adherence as a way of life. *AIMS Microbiol*. 2018; 4 (3): 428–38.
4. Thomas J, Balseiro A, Gortázar C, et al. Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Vet Res*. [Internet]. 2021 Febr 24 [cited 2022 Febr 14]; 52:31(2021). Available from: <https://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-020-00881-y>
5. Udou T. Adaptation of mycobacteria on solid, egg-based media to anaerobic conditions and characterization of their diagnostic phenotypes. *J UOEH*. 2013; 35 (2): 109–17.
6. Ukhovskiy VV, Paliy AP, Tarasov OA, et al. Using of glycerol and DMSO for *Leptospira Interrogans* cryopreservation. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2019; 29 (1): 102–6.

