

Каким должен быть кровяной агар?

Б. Ф. Шуляк, к. вет. н.

С. Г. Марданлы, д.м.н., акад. АМН, проф. кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин², президент и директор по науке¹, заслуженный работник здравоохранения России

С. С. Марданлы, м.н.с. отдела эпидемиологии³, зам. ген. директора по коммерческим вопросам¹

Я. В. Мишуткина, к.б.н., директор НПО «Иммунология» и НПО «Биохимия»¹

¹ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск, Московская область

²ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» Минобразования Московской области, г. Орехово-Зуево, Московская область

³ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

What should be blood agar?

B. F. Shulyak, S. G. Mardanly, S. S. Mardanly, Ya. V. Mishytkina

ECOLab Co., Elektrogorsk, Moscow Region; State University of Humanities and Technology, Orekhovo-Zuevo, Moscow Region; Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology n.a. honorary academician N.F. Gamalei, Moscow; Russia

Резюме

ЗАО «ЭКОлаб» выпускает стерильную дефибрированную баранью кровь для приготовления кровяного агара (РУ № ФСР 2008/03081 от 30.07.2008) и разработало технический регламент аналогичного продукта из крови лошадей (проходит регистрацию в России). Эти медицинские изделия позволяют полностью исключить применение не по назначению человеческой донорской крови, которая значительно уступает им по ростовым качествам и малопригодна для индикации гемолитических бактерий по типу вызываемого гемолиза.

Ключевые слова: бактерии, гемолиз, донорская кровь человека, кровяной агар, кровь баранья дефибрированная, кровь лошадиная дефибрированная, микробиологические питательные среды, эритроциты.

Summary

EKOLab Co. produces sterile defibrinated sheep blood for the preparation of blood agar (RU № ФСР 2008/03081 from 30.07.2008) and has developed a technical regulation of a similar product from the blood of horses (now is registered in Russia). These products will completely exclude the misuse of human blood which is much inferior to them in terms of growth properties and is not so suitable for identification hemolytic bacteria by the type of hemolysis.

Keywords: bacteria, blood agar, defiled sheep blood, equine defibrinated blood, erythrocytes, hemolysis, human blood, microbiological nutrient media.

Основной принцип выделения из патологического материала и объектов окружающей среды бактерий, сформулированный Р. Кохом в статье *Methods for the study of pathogenic organisms* (1881), состоит в том, что используемые с этой целью субстраты (среды) должны содержать необходимые им для роста и размножения питательные вещества.

За последующую более чем 120-летнюю историю развития микробиологии предлагалось огромное количество питательных сред с разной рецептурой, но ни одна из них не отвечает упомянутому выше требованию в такой же степени, как кровяной агар. Это вполне закономерно, поскольку основная функция крови состоит в обеспечении тканей организма всем необходимым (белками, липидами, углеводами, минеральными веществами, витаминами и другими биологически активными соединениями), а эволюция патогенных микроорганизмов направлена на адаптацию к условиям, с которыми они сталкиваются в организме хозя-

ина. Благодаря таким особенностям плотные среды с кровью пригодны для выращивания большинства патогенных бактерий, включая даже многих из тех, которые проявляют особые требования к условиям культивирования *in vitro*. Кроме того, они позволяют дифференцировать микроорганизмы по способности вызывать гемолиз, а также его типу.

В состав плотных сред с кровью, обозначаемых обобщающим названием «кровяной агар», можно включать кровь разных видов млекопитающих, поскольку содержание в ней питательных веществ существенно не различается. Поэтому в ситуации, когда важны только ростовые качества (питательная ценность) субстрата, предназначенного для культивирования бактерий, при выборе вида донора ориентируются в основном на такие критерии, как доступность и стоимость. В ряде стран Западной Европы предпочтение отдают лошадям, в остальных регионах мира — овцам, реже используют с этой целью крупный рогатый скот, и в еще меньшей степени — свиней. Что каса-

ется человеческой крови, то ее включают в состав питательных сред лишь в медицинских лабораториях Российской Федерации и некоторых стран Африки. Это обусловлено не только ее худшими ростовыми качествами для бактерий по сравнению с кровью жвачных и лошадей [5], но также рядом причин, которые подлежат специальному рассмотрению.

Во-первых, донорская кровь людей имеет иное назначение — трансфузия нуждающимся в ней пациентам. Лечебные медицинские учреждения испытывают (особенно в последние 20 лет) острую ее нехватку. В бактериологических лабораториях она попадает не сразу после забора, а после выбраковки в связи с истекшим сроком годности или спонтанным лизисом эритроцитов. В таком состоянии ее можно использовать только для приготовления шоколадного агара, поскольку находящиеся в ней эритроциты претерпели необратимые морфологические изменения (деструкцию мембран и накопление кислых продуктов метаболизма),

Таблица
Сравнительная оценка эритроцитов различных видов животных и человека

Вид	Площадь поверхности эритроцитов, мкм ²	Объем эритроцитов, мкм ³	Концентрация эритроцитов в крови, млн/мкл
Курица	182,0	127,0	3,0
Свинья	83,4	58,0	7,0
Собака	82,7	70,0	6,7
Крупный рогатый скот	82,0	56,0	6,2
Кролик	81,0	68,0	4,7
Лошадь	68,6	50,0	7,5
Овца	60,5	31,0	9,5
Коза	53,0	25,0	14,5
Человек	136,0	90,0	4,7

Примечание: в таблице приведены усредненные значения показателей.



Медицинское изделие «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред, стерильная» по ТУ 9398-073-70423725-2007 и РУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008 г. производства ЗАО «ЭКОлаб».

частично, а чаще полностью, утратив способность служить индикатором гемолитической активности бактерий.

Не поддается контролю и соответственно не регистрируется использование донорами накануне сдачи крови антибактериальных препаратов, ингибирующих рост микроорганизмов *in vivo* и в еще большей степени *in vitro*.

В крови многих доноров содержатся специфические антитела, оказывающие отрицательное влияние на рост в питательных средах соответствующих им бактерий. К примеру, при посевах патологического материала пациентов, инфицированных стрептококками (*S. pyogenes*, *S. agalactiae* и др.), на плотные среды с человеческой кровью в 20–30% случаев получают ложноотрицательный результат из-за плохого роста бактерий, а также

проявления ими нехарактерных типов гемолиза [2]. Причина банальна: стрептококки широко распространены среди населения и вызывают антительный иммунный ответ — доноры не являются в этом отношении исключением.

На агаре с человеческой кровью стрептококки индуцируют переменный по степени выраженности гемолиз, что затрудняет идентификацию и дифференциацию этих бактерий. На агаре с кровью барана типичные штаммы *S. agalactiae*, как правило, вызывают β-гемолиз, но некоторые изоляты проявляют слабую гемолитическую активность. Для ее выявления в зарубежных, а в последние годы и отечественных лабораториях широко применяют CAMP-тест, основанный на совместном культивировании предполагаемых изолятов *S. agalactiae* с золотистым стафилококком.

Выделяемый последним фермент сфингомиелиназа гидролизует основной липидный компонент стенки эритроцитов (сфингомиелин), усиливая литическое действие гемолизина стрептококка, что ведет к увеличению зон гемолиза вокруг колоний последнего. Однако на агаре с человеческой кровью данный феномен проявляется слабо [6, 7]. На этом основании у многих отечественных бактериологов сложилось необоснованное представление о неэффективности CAMP-теста.

Площадь поверхности и объем эритроцитов у мелкого рогатого скота значительно меньше, чем у большинства других видов млекопитающих, а по концентрации эритроцитов в крови овцы и козы превосходят других сельскохозяйственных животных (см. табл.). Такие морфологические особенности делают кровь животных этих видов наилучшим компонентом сред, предназначенных для идентификации бактерий.

Взятие крови при убое животных снижает стоимость, но негативно отражается на качестве (стерильности конечного продукта и сохранности в нем эритроцитов). Этого удается избежать посредством использования закрытых стад животных-доноров. От них регулярно берут кровь в количестве, не превышающем 15% ее общего объема, соблюдая при этом асептику. Животные-доноры получают полноценный рацион и находятся в условиях, соответствующих их физиологическим потребностям, что отражается на качестве крови и стабильности ее компонентов. Кроме того, их содержат изолированно и периодически проверяют на отсутствие опасных инфекций, тем самым предотвращая контаминацию крови патогенами и возможность заражения ими лабораторных работников.

На предприятии ЗАО «ЭКОлаб» (г. Электрогорск Московской области) организовано производство консервированной дефибринированной крови овец-доноров. Специалистами компании оптимизирована технология удаления из венозной крови фибрина, а также разработан состав стабилизирующих добавок, обеспечивающих более длительное ее хранение [3]. Результатом проведенных исследований стала регистрация в Российской Федерации медицинского изделия «Кровь баранья дефибриниро-

ванная для питательных сред, стерильная» (см. фото). Срок гарантированного сохранения специфических свойств продукта (в комплектации № 1) составляет 14 суток, а при добавлении в его состав цитрата натрия (комплектация № 2) он увеличивается до 30 суток [4].

Установлены хорошие ростовые свойства 5-процентного кровяного агара, приготовленного на основе выпускаемой ЗАО «ЭКОлаб» дефибринированной бараньей крови, для *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *S. agalactiae*, *Cl. perfringens*, *L. monocytogenes*.

Приобретенный опыт позволил специалистам компании разработать технические условия производства еще одного медицинского изделия — «Крови лошадиной дефибринированной для питательных сред стерильной» (в стеклянных флаконах по 100 мл), имеющего срок годности 14 суток. Ее включение в состав плотных сред позволяет с большей эффективностью культивировать такие прихотливые бактерии, как *H. pylori*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*, *Streptococcus spp.*, а также дифференцировать их по типу гемолитической активности.

Заключение

Для приготовления в медицинских лабораториях 5–15-процентного кровяного агара ЗАО «ЭКОлаб» выпускает дефибринированную баранью кровь (ПУ № ФСР 2008/03081 от 30.07.2008) и разработало регламент производства дефибринированной крови лошадей (проходит регистрацию в России).

По ростовым качествам для бактерий, а также возможности их дифференциации по типу гемолиза и агалактичного стрептококка в CAMP-тесте кровь овец и лошадей значительно превосходит свежую донорскую человеческую кровь. Поэтому применять с диагностической целью последнюю (особенно с истекшим сроком годности или признаками гемолиза) не следует. Более того, для проведения микробиологических исследований в диагностических лабораториях медицинских учреждений Российской Федерации разрешается использовать только зарегистрированные в установленном законом порядке медицинские изделия. Их замена недоброкачественными и незарегистрированными аналогами, в том числе донорской человеческой кровью, предназначенной исключи-

тельно для трансфузии, предусматривает административную или уголовную ответственность в соответствии с законодательством Российской Федерации.

Список литературы

1. Федеральный закон № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21.11.2011 г.
2. Долгов В. В., Меньшиков В. В. (ред.). Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство в 2 томах // М.: АСМОК, 2012.
3. Марданлы С. Г., Бахилина Н. В., Ротанов С. В., Котляр М. А. Кровь баранья дефибринированная для приготовления питательных сред // Медицинский алфавит. Современная лаборатория. 2016. Т. 3. № 19 (282). С. 51.
4. Медицинское изделие «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред, стерильная» по ТУ 9398-073-70423725-2007 и ПУ № ФСР 2008/03081 от 30 июля 2008 г. // Государственный реестр медицинских изделий и организаций (индивидуальных предпринимателей), осуществляющих производство и изготовление медицинских изделий, № 05984 (<http://www.rozdravnadzor.ru/services/misearch>).
5. Russell F. M., Biribo S. S. N., Selvaraj G., et al. As a Bacterial Culture Medium, Citrated Sheep Blood Is a Practical Alternative to Citrated Human Blood Agar in Laboratories of Developing Countries. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44, 3346–3351.
6. Sterzik B., Fehrenbach F. J. Reaction components influencing CAMP factor induced lysis. *J Gen Microbiol*, 1985, 131 (4), 817–820.
7. Yeh E., Pinsky B. A., Banaei N., Baron E. J. Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PLoS ONE*, 2009, Vol. 4, Issue 7, e6141.





Мэрия Москвы,
14-15 ноября 2018г.

IV Российская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов»

Документация по данному учебному мероприятию представлена в Комиссию по оценке учебных мероприятий и материалов для НМО. Регистрация на сайте обязательна

www.expodata.info

Оргкомитет конгресса:

ООО «Экспо пресс»
Москва, ул. Ак. Королева, 13;
Тел.: +7 (495) 617-36-43/44;
Факс: (495) 617-36-79;
E-mail: lvov.m.g@inbox.ru;
www.expodata.info




