

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Каргальцева Н.М.<sup>1</sup>, Кочеровец В.И.<sup>2</sup>, Миронов А.Ю.<sup>1</sup>, Борисова О.Ю.<sup>1</sup>

## СЕРДЕЧНО-МОЗГОВЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ГЕМОКУЛЬТУР

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;  
<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ», 119991, Москва, Россия

*Питательная среда – основа для роста микроорганизмов и выделения гемокультур при диагностике инфекции кровотока (ИК). Основа питательных сред в РФ – панкреатический гидролизат рыбной муки. В Европейских странах используются сердечно-мозговые среды (СМС) для выделения микроорганизмов из крови. В РФ производство СМС отсутствует. Цель исследования: апробировать рецептуру и способ приготовления СМС (жидкой и агара) для повышения эффективности выделения гемокультур. Определены физико-химические и биологические показатели качества разработанной СМС. Микробиологический контроль СМС осуществлён исследованием крови терапевтических больных кардиологического профиля. На основе разработанной технологии приготовления сердечного и мозгового экстрактов (СМЭ) сконструированы жидкая и агаровая среды (СМС, СМА). Жидкая СМС разливалась по флаконам, насыщалась инертным газом. Флакон, закрытый резиновой пробкой, завальцованный металлическим колпачком, представлял закрытую систему. Для определения качества 260 проб крови исследованы на СМС и на тиогликолевой среде (ТГС). На СМС рост аэробов в 2,4 раза, микроаэрофилов – в 3,2 раза выше, чем на ТГС. Рост анаэробов на ТГС отсутствовал ( $p < 0,001$ ). Моновидовые гемокультуры получены на СМС в 13,4 раза чаще, чем на сахарном бульоне, 2,3 раза чаще, чем на ТГС ( $p < 0,001$ ). Смешанные гемокультуры чаще получены на СМС, чем на ТГС (7,3 и 1,7%, соответственно). Качество плотного СМА протестировано на крови 300 больных на 5% кровяном мясо-пептонном агаре (МПА) и СМА при аэробном и анаэробном культивировании. На плотном СМА рост аэробов в 2 раза, микроаэрофилов – в 3,6 раза выше, чем на 5% МПА. В анаэробных условиях на плотном СМА рост аэробов в 2 раза, микроаэрофилов в 2,5 раза выше, чем на 5% МПА ( $p < 0,001$ ). Анаэробы на МПА не росли. Сердечно-мозговые среды (жидкая и агар) создают оптимальные условия для роста широкого спектра возбудителей ИК.*

**Ключевые слова:** *сердечно-мозговая жидкая среда; сердечно-мозговой агар; гемокультура.*

**Для цитирования:** Каргальцева Н. М., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю. Сердечно-мозговые среды для гемокультур. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (6): 375-381.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381>

Kargaltseva N. M.<sup>1</sup>, Kocherovets V. I.<sup>2</sup>, Mironov A. Yu.<sup>1</sup>, Borisova O. Yu.<sup>1</sup>

BRAIN-HEART MEDIA FOR BLOOD CULTURES

<sup>1</sup>G. N. Gabrichevskii Moscow research institute for epidemiology and microbiology for Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

*When diagnosing bloodstream infection (BI) the culture medium is the basis for growth of microorganisms and obtaining the blood culture. Pancreatic digest from fish meal is the basis of all culture media in Russia. In European countries brain-heart media (BHM) are used for detecting microorganisms in blood. In Russia BHM is not produced. The aim is to work out the formulation and the way of the BHM (broth and agar) preparation in order to improve the efficiency of obtaining blood culture. There were defined the physical and chemical indices and biological parameters of the BHM. The microbiological control of the BHM was carried out by diagnostic study of cardiologists' blood. On the basis of the developed technique of the brain-heart extraction (BHE) preparation there was created the liquid and agar BHM (LBHM, BHA). The LBHM was poured into bottles which then were filled with the inert gas. The bottles were closed with rubber stoppers and rolled in metal caps became a closed system. Microbiological qualities of LBHM were tested on 260 blood samples and thioglycollate medium (TGM) and LBHM. Aerobic microorganisms grew in LBHM 2,4 times more often than in TGM. The microaerophilic microbes grew in LBHM 3,2 times more often than in TGM. Anaerobic microbes did not show any growth in TGM, ( $p < 0,001$ ). Monomicrobes hemocultures were obtained in LBHM 13,4 times more often than in glucose broth and 2,3 times more often than in TGM, ( $p < 0,001$ ). Polymicrobes hemocultures were obtained in LBHM more often than in TGM (7,3% and 1,7%, respectively). The quality of brain-heart agar (BHA) was tested on 300 blood samples in 5% blood meat-pepton agar (MPA) and BHA in aerobic and anaerobic conditions for both the media. Aerobic microorganisms grew in BHA 2 times more often than in MPA. The microaerophilic microbes grew in BHA 3,6 times more often than in MPA. In anaerobic condition in BHA aerobic microorganisms grew 2 times more often than in MPA and the microaerophilic microbes grew 2,5 times more often than in MPA, ( $p < 0,001$ ). Anaerobic microbes did not grow in MPA. When diagnosing bloodstream infection the BHM (liquid and agar) are able to create the optimal conditions for the increase of the wide range pathogen growth.*

**Key words:** *liquid brain-heart medium; brain-heart agar; bloodculture.*

**For citation:** Kargaltseva N. M., Kocherovets V. I., Mironov A. Yu., Borisova O. Yu. Brain-heart media for blood cultures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (6): 375-381 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-6-375-381>

**For correspondence:** Kargaltseva N. M.; candidate of medical science, researcher of G.N.Gabrichevskii Moscow research institute for epidemiology and microbiology; e-mail: [kargaltseva@mail.ru](mailto:kargaltseva@mail.ru)

**Для корреспонденции:** Каргальцева Наталья Михайловна, канд.мед.наук, научный сотрудник Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им.Г.Н.Габричевского ; e-mail: [kargaltseva@mail.ru](mailto:kargaltseva@mail.ru)

**Information about authors:**

Kargaltseva N. M., <http://orcid.org/0000-0002-3245-5486>  
Kocherovets V. I., <http://orcid.org/0000-0001-7720-670X>  
Mironov A. Yu., <http://orcid.org/0000-0002-8544-523>  
Borisova O. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6316-5046>

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

**Acknowledgment.** *The study had no sponsorship.*

Received 22.04.2020  
Accepted 27.04.2020

**Введение.** Питательная среда – ключевой элемент в работе микробиологической лаборатории. Несмотря на расширение молекулярно-генетических методов диагностики инфекционных заболеваний, культуральное исследование биоматериала остается лидирующим [1-3]. Положительная гемокультура при диагностике инфекции кровотока (ИК) востребована высоким уровнем летальности пациентов (20-40%) [4,5]. За последние 30 лет разработаны новые формуляры питательных сред, появились автоматизированные гемокультуральные системы, но эффективная диагностика ИК продолжает оставаться проблемой [4,6,7].

Гарантией выделения культур микроорганизмов из биоматериала является высокопитательная среда и оптимальные условия для роста микроорганизмов при лабораторном культивировании. Известно более 5000 прописей, опубликованных в руководствах и справочниках по питательным средам [8].

Первоначально кровь на стерильность высевали на 2-4% сахарный бульон. Приказ № 535 от 1985 г. регламентировал для посева крови пять сред: 1. «Двойная среда»; 2. «Среда для контроля стерильности» (тиогликолевая среда-ТГС); 3. «Среда со стаканчиком»; 4. «Полужидкая среда Тароцци»; 5. «Жидкая среда Сабуро». «Двойная среда», предназначенная для выделения факультативных анаэробов, микроаэрофилов, состоит из 2% скошенного мясо-пептонного агара (МПА), полужидкой среды, приготовленной на питательном бульоне (Дагестанский НИ-ИПС, г. Махачкала) с добавлением глюкозы и агара. В среде отсутствуют необходимые питательные вещества, ростовые факторы, нет высоко питательной основы. Аэробная атмосфера во флаконе и ватно-марлевые пробки обеспечивают рост только аэробов.

Для приготовления питательных сред необходимы различного типа гидролизаты. Производство питательных сред в СССР базировалось на панкреатическом гидролизате кильки каспийской (бульон и агар), в РФ – на гидролизате рыбной муки (ГРМ) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболensk, Россия) [9]. При сравнении с другими гидролизатами плотная среда на ГРМ показала высокую активность, технологичность, экономичность [10]. ГРМ является основой более 50% отечественных питательных сред промышленного производства (ТУ 9385-017-78095326-2006) [11]. Отечественными производителями выпускаются среды с номенклатурой более 400 наименований. На российский рынок медицинских изделий поступают дорогостоящие импортные среды, не выпускаемые в России, производимые зарубежными фирмами Becton Dickinson (США), Merck (Германия), Oxoid (Англия), Bio-Merieux (Франция), Pronadisa (Испания), Hi-Media (Индия) [12,13]. Универсальных сред, одинаково пригодных для всех микроорганизмов, не существует. Современные среды разрабатываются с учётом требований микробио-

го метаболизма. Для приготовления высокопитательных сред используют экстракты мяса, кровь, сыворотку, дрожжевые и растительные экстракты. Эти среды пригодны для культивирования микроорганизмов разных таксонов.

Для выделения гемокультур рекомендовано использовать сердечно-мозговую среду (СМС) [5]. В 1919 г. E. Rosenow получил сердечно-мозговую экстракт (СМЭ), усовершенствованный в 1923 г. Зарубежные производители питательных сред используют экстракты сердца и мозгов крупного рогатого скота, гидролизаты мяса. Производство СМС занимает 50% номенклатуры производимых сред. Зарубежные микробиологические лаборатории используют автоматизированные гемокультуральные системы с СМС [12-14]. Преимущество СМС заключается в обеспечении роста широкого спектра возбудителей, включая высоко требовательные к питательным веществам микроорганизмы. При диагностике лихорадочного состояния больного среда для посева крови должна быть максимально универсальной, высокопитательной, содержать необходимые ингредиенты для роста аэробных, микроаэрофильных, строго анаэробных микроорганизмов [15-18].

Среды, приготовленные из натуральных природных субстратов, имеют все необходимые компоненты для роста большинства видов микроорганизмов. Среды специального назначения используют с диагностической целью и готовят на СМЭ [19]. Короткая преинкубация на сердечно-мозговом экстракте в течение 4-х часов позволила идентифицировать в MALDI-ToF MS 91,6% бактерий [14].

Отечественная СМС промышленным способом не выпускается. Мясо-пептонный бульон (МПБ), как основа, используется в отечественной микробиологии более 80 лет для выделения стафилококков, стрептококков, энтеробактерий и др. Разрабатываются новые среды и совершенствуются применяемые в качестве дифференциально-диагностических или целевых [20]. Недостаточный ассортимент отечественных сред вынуждает готовить среды в условиях лаборатории.

Цель исследования – апробация рецептуры и способа приготовления жидкой и плотной СМС на основе СМЭ для выделения гемокультур с целью повышения эффективности диагностики ИК.

**Материал и методы.** Разработанная СМС исследована на пробах крови терапевтических пациентов кардиологического профиля с диагнозами: инфекционный эндокардит, ревматизм, врождённый порок сердца, ишемическая болезнь сердца, лихорадочное состояние. Взятие крови, транспортировка проб выполнялась согласно методическим указаниям<sup>1</sup>. Жидкая СМС во флаконах исследована на 260, сердечно-мозговой агар (СМА) – на

<sup>1</sup>МУ 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории: Методические указания. М.: ФБУЗ ЦЦГиЭ Роспотребнадзора; 2006.

300 пробах крови больных. Качество приготовленных сред проверено согласно официальным рекомендациям<sup>2</sup> [21, 22].

Определены физико-химические показатели разработанной жидкой СМС: прозрачность, цветность, pH, Eh, содержание хлоридов (в пересчёте на натрия хлорид), содержание аминного азота, массовая доля влаги и сухого остатка, стерильность. Для плотной среды СМА – контролировали перечисленные показатели и дополнительно: температуру плавления студня среды, температуру застудевания среды. Биологический контроль качества проводили по показателям: чувствительность, стабильность основных свойств микроорганизмов, скорость роста. При конструировании использованы: СМЭ, приготовленный из свежих мозгов и сердец крупного рогатого скота, согласно рекомендациям [11], ферментативный гидролизат казеина (артикул 042108, НИЦФ), дрожжевой экстракт (ТУ 9182-001-23206313-95), глюкоза (ГОСТ 6038-79), натрия хлорид (ТУ 20.13.62-001-97947516-2017), натрий бикарбонат (ТУ 38401-67-108-92), тиогликолят натрия (ТУ 6-09-5033-82), гидрохлорид цистеина (Е 920), менадион (витамин K<sub>1</sub>), гемин (фактор Х), твин-80 (ТУ 6-14-938-79), агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), дистиллированная вода (ГОСТ 6709-72), L-глутамин (составляющая нуклеиновых кислот), парааминобензойная кислота, L-цистеин (ТУ 6-093252-80), никотинамид, L-солянокислый цистеин (ТУ 6-093252-80), азотнокислый калий (ГОСТ 4217-77), пептон (ГОСТ 13805-76), 2-х замещённый фосфорнокислый натрий (ТУ 2148-022-00203677-07). Гемолизированную кровь готовили из цельной крови, разлитой по пробиркам объёмом 10-12 мл, замороженной в морозильной камере. Использовали гемолизированную кровь после оттаивания на водяной бане [18]. Питательные среды должны удовлетворять установленным критериям эффективности, поэтому, среды лабораторного приготовления контролировались по всем перечисленным показателям с использованием следующих методов.

**Физико-химический контроль.** Прозрачность и цветность разработанной жидкой СМС, разлитой во флаконы (ГОСТ 10782-85), определяли визуально в проходящем свете [22]. Плотный СМА плавил на водяной бане и разливали по чашкам Петри (ГОСТ 23932-90 Е) слоем до 5 мм. Жидкая и плотная среды были прозрачные, с желтовато-коричневым цветом. pH жидкой среды измеряли потенциометрическим методом pH-метром со стеклянным электродом [22]. pH агара определяли после его плавления и охлаждения до 45-50°C. Величину окислительно-восстановительного потенциала – Eh, выражаемую в вольтах (В) или милливольтках (мВ), измеряли потенциометрически, СМА предварительно плавил и охлаждали до 45-50°C. Содержание хлоридов (в пересчёте на NaCl) в СМС определяли аргентометрическим методом [22]. Содержание NaCl в процентах вычисляли по формуле. Содержание аминного азота определяли методом pH-метрического формольного титрования. Отбирали 10 мл жидкой СМС, 3 мл расплавленного на водяной бане СМА. Определение массовой доли влаги в процентах проводили по разности

масс до и после высушивания [22]. Определение сухого остатка проводили выпариванием влаги с последующим высушиванием остатка до постоянного веса [22]. Определение стерильности сред проводили визуально, просматривая определённое количество флаконов и чашек Петри после инкубации в термостате при температуре 37°C в течение 2-14 суток [22]. Определение стерильности добавок для питательных сред (гемолизированная кровь, факторы роста) проводили методом прямого посева 1 мл препарата в 2 пробирки с 20 мл ТГС и инкубацией посевов при 30-35°C и 20-25°C в течение 14 суток [22]. Температуру плавления студня СМА определяли визуально от момента закипания воды до полного расплавления агара [22]. Определение температуры застудевания проводили визуально путём определения момента застудевания раствора агара при помощи погруженного термометра [22]. Биологический контроль: определение чувствительности разработанной СМС оценивали полуколичественным способом. Для СМА посевной инокулят референс-штаммов содержал 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> КОЕ/мл, для жидкой СМС – 10-100 КОЕ/мл; оценка по мутности для жидкой СМС и по росту колоний – для СМА<sup>3</sup> [14, 21]. Скорость роста определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое появлялся рост в виде типичных колоний или мутности, хорошо видимых невооружённым глазом [22]. Показатели стабильности основных биологических свойств микроорганизмов на разработанных средах оценивали по культуральным, морфологическим, тинкториальным, ферментативным, антигенным и другим свойствам. Оценивали характер роста культур на жидкой и тип колоний – на плотных средах [22].

**Результаты.** В основу СМС и СМА положены разработка рецептуры и способы приготовления СМЭ, сред и обогащение их факторами роста.

**Приготовление СМЭ. Первый день.** Сердце и мозги крупного рогатого скота очищали от плёнок, сосудов, оболочек, жира. Измельчали при помощи мясорубки. Заливали одинарным количеством водопроводной воды (на 1 кг ткани – 1 л воды). Оставляли на ночь в холодильнике при +4°C. Сердце и мозги обрабатывали и готовили для экстрактов отдельно.

**Второй день.** Настой при помешивании доводили до кипения, кипятили 5-10 мин. Горячие экстракты фильтровали через 3 слоя марли, затем через ватно-марлевый фильтр. Разливали по флаконам ёмкостью: мозговой экстракт по 100 мл, сердечный – по 150 мл. Закрывали резиновыми пробками, завальцевывали металлическими колпачками. Автоклавировали 15 мин при 0,7 атм. Готовые экстракты хранили при +4°C. После смешивании двух экстрактов, как предусмотрено в рецептуре СМС, проверяли показатели.

**Показатели химического анализа СМЭ:**

- общее количество азота – 12,2%
- а-амино азот – 5,7%
- остатки серы – 14,9%
- а-амино азот / общее количество азота – 0,47%
- хлориды – 1,2%
- кальций – 0,1%

<sup>2</sup>ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории. М.: ФГПУ Стандартинформ; 2015

<sup>3</sup>ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. М.: ФГПУ Стандартинформ; 2012.

Аминокислоты, мг/г:  
Аспарагиновая кислота – 68  
Треонин – 36  
Серин – 33  
Глютаминовая кислота – 103  
Пролин – 27  
Глицин – 43  
Аланин – 48  
Валин – 37  
Метионин – 14  
Изолейцин – 25  
Лейцин – 47  
Тирозин – 10  
Фенилаланин – 10  
Гистидин – 23  
Лизин – 53  
Аргинин – 48  
рН – 7,0  
t=25°C

Химический анализ показал полноценный аминокислотный состав СМЭ.

**Приготовление жидкой СМС.** Сухие ингредиенты (ферментативный гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, хлорид натрия, глюкоза, тиогликолят натрия, карбонат натрия, гидрохлорид цистеина, агар-агар), растворяли в 750 мл дистиллированной воды, доводили до кипения и кипятили в течение 2-3 минут. Добавляли стерильные мозговой и сердечный экстракты, гемин, менадион, твин-80. Доводили рН до 7,4-7,6 раствором 8 N NaOH. Разливали по 200 мл в 250 мл флаконы, закрывали резиновыми пробками, замещали воздух во флаконах чистым азотом, используя шланг с длинной иглой широкого диаметра, накрывали металлическими колпачками, завальцевывали. Автоклавировали при 1 атм в течение 15-20 мин, хранили при +4°C. Можно использовать альтернативные варианты, т. е. разливать разные объёмы СМС (50 мл, 100 мл, 200 мл) по флаконам разной ёмкости (100 мл, 150 мл, 250 мл, соответственно). Алюминиевые колпачки завальцевывали машинкой ПОК-3 (производитель: «ООО-Медиформ») для ручного обжима колпачков типа К-3 при укупорке стеклянных флаконов или машинным способом при помощи «Закаточного полуавтомата ПЭР-М», применяемого для укупоривания любого типа флаконов с гладким или винтовым горлом ёмкостью (от 10 до 500 мл) колпачками: К-1, К-2, К-3, К-4, К-5 для аптечного и фармацевтического производ-

#### Чувствительности СМС и ТГС

Референс-штамм (АТСС)	Посевная доза референс-штаммов			
	10 КОЕ/мл		100 КОЕ/мл	
	СМС	ТГС	СМС	ТГС
<i>Staphylococcus epidermitis</i> (14990)	2+	1+	2+	2+
<i>Streptococcus pyogenes</i> (19615)	2+	-	2+	1+
<i>Neisseria meningitidis</i> (13090)	1+	-	2+	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (6538)	2+	1+	2+	2+
<i>Clostridium sporogenes</i> (11437)	1+	-	2+	-
<i>Bacteroides vulgatus</i> (8482)	1+	-	2+	-
<i>Candida albicans</i> (10231)	1+	-	2+	-

Примечание. (-) – нет мутности, (1+) – незначительная мутность, (2+) – значительная мутность.

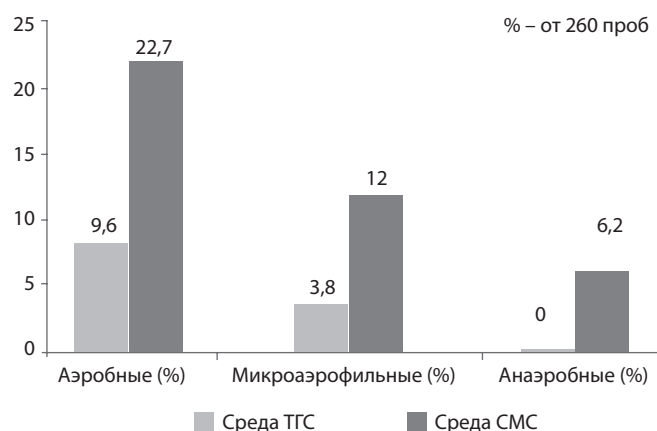


Рис. 1. Выделение микроорганизмов из крови на ТГС и СМС в аэробных и анаэробных условиях.

ства. На разработанную жидкую СМС получен патент РФ [23].

Определение чувствительности СМС оценивали по-луколичественным способом и сравнивали с ТГС, приготовленной по прописи приказа № 535. Для жидкой СМС посевной инокулят референс-штаммов составлял 10-100 КОЕ/мл. Чувствительность СМС определяли по мутности среды (см. таблицу).

Показана более высокая чувствительность СМС по сравнению с ТГС, на которой стафилококки давали слабый рост в виде незначительной мутности при посевном инокуляте 10 КОЕ/мл, другие референс-штаммы не давали роста при культивировании при +37°C в течение 18-20 часов. Аналогичные результаты получены для посевной концентрации 100 КОЕ/мл. Биологические качества СМС проверены на пробах периферической крови больных.

Выделение микроорганизмов из 260 проб крови терапевтических больных на ТГС и СМС представлено на рис. 1. Рост на СМС выше, чем на ТГС аэробов (22,7% и 9,6%, соответственно) ( $p < 0,001$ ), микроаэрофилов (12% и 3,8%, соответственно) ( $p < 0,001$ ), анаэробов (6,2% и 0%, соответственно) ( $p < 0,001$ ), различия статистически значимые.

Выделение моно- и смешанных гемокультур на сахарном МПБ, ТГС, СМС показано на рис. 2. Показана высокая эффективность СМС по сравнению с сахарным МПБ в 13,4 раза ( $p < 0,001$ ), ТГС – в 2,3 раза ( $p < 0,001$ ). Смешанные гемокультуры чаще получены на СМС, чем на ТГС (7,3% и 1,7%, соответственно), ( $p = 0,0068$ ), различия статистически значимые.

Жидкая СМС создаёт оптимальные условия культивирования.

#### Приготовление плотного СМА.

**I этап:** в 50 мл дистиллированной воды растворяли L-глутамин, аденин, парааминобензойную кислоту, L-цистеин, никотинамид, солянокислый цистеин, азотнокислый калий.

**II этап:** в отдельной посуде в 500 мл дистиллированной воды растворяли агар микробиологический, добавляли пептон, глюкозу, хлористый натрий, двухзамещенный фосфорнокислый натрий, кипятили в течение 5-10 мин. Добавляли в горячую смесь содержимое 1-го состава, мозговой экстракт, сердечный экстракт, гемин, добавляли дистиллированную воду до 1000 мл.

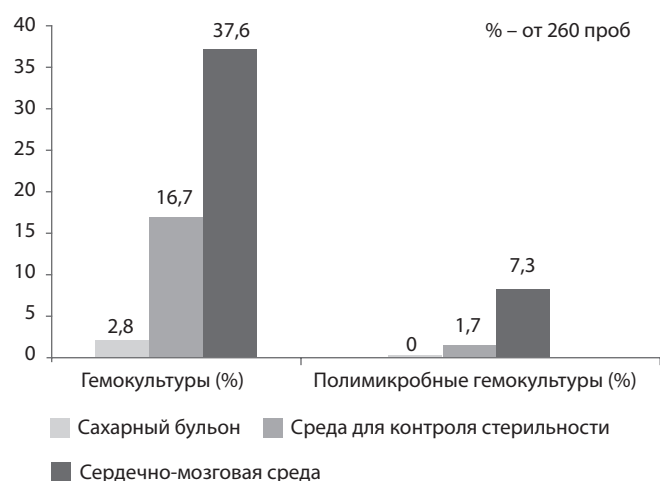


Рис. 2. Рост моно- и смешанных гемокультур на питательных средах.

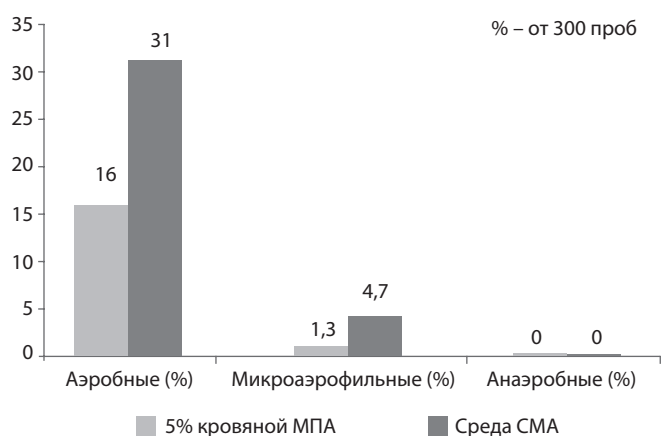


Рис. 3. Выделение микроорганизмов из крови на 5% кровяном МПА и СМА в аэробных условиях культивирования.

*III этап:* доводили pH до 7,4-7,6 раствором 8 N NaOH.

*IV этап:* разливали по 300 мл во флаконы ёмкостью 500 мл, закрывали резиновыми пробками, завальцовывали алюминиевыми колпачками.

*V этап:* автоклавировали при 0,5-0,6 атм. в течение 20 мин.

**Приготовление чашек Петри с плотным СМА.**

Флаконы с СМА помещали на водяную баню для плавления агара. Расплавленный СМА остужали до +50°C, добавляли менадион, гемолизированную кровь (на 100 мл агара – 5-7 мл крови). Содержимое перемешивали, разливали по чашкам Петри. После застывания СМА подсушивали, применяли для посева материала «кровь-среда» при субкультивировании. На разработанный плотный СМА получен патент РФ [24].

Качество разработанного плотного СМА проверено на этапе субкультивирования при посеве на 5% кровяной МПА и СМА в аэробных и анаэробных условиях культивирования. Выделение микроорганизмов из крови на 5% кровяном МПА и СМА в аэробных условиях культивирования показано на рис. 3.

Выделение эффективнее на плотном СМА по сравнению с 5% МПА аэробов ( $p < 0,001$ ) и микроаэрофилов ( $p = 0,017$ ). Выделение микроорганизмов из крови на 5%

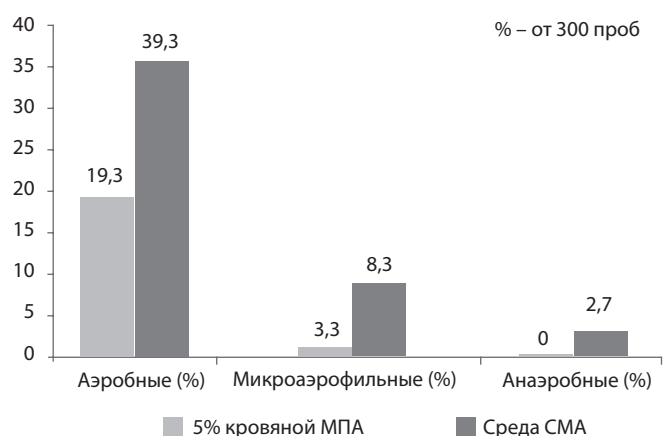


Рис. 4. Выделение микроорганизмов из крови на 5% кровяном МПА и СМА в анаэробных условиях культивирования.

кровяном МПА и СМА в анаэробных условиях культивирования представлено на рис. 4.

Рост аэробов преобладал на СМА по сравнению с 5% кровяным МПА в 2 раза ( $p < 0,001$ ), микроаэрофилов – в 2,5 раза ( $p = 0,009$ ), рост анаэробов отсутствовал на МПА ( $p = 0,12$ ). Питательность 5% кровяного МПА недостаточна для роста требовательных к питанию факультативно-анаэробных и строгих анаэробных микроорганизмов.

**Обсуждение.** Сохраняется актуальность выделения гемокультур для повышения эффективности диагностики ИК. Лихорадка неясного генеза часто продолжает оставаться недиагностируемой. Культуральное исследование крови необходимо при хирургической и терапевтической патологии. Развитие молекулярно-генетических методов диагностики инфекции не снизило значение получения гемокультуры при ИК.

Существуют определённые условия для оптимального получения гемокультуры. Одно из них – высокопитательная среда, на которой способен расти широкий спектр микроорганизмов. Состав среды должен быть максимально приближен к питательным потребностям микроорганизмов.

В России жидкая и плотная сердечно-мозговые среды промышленным способом не выпускаются. МПБ, как основа жидких питательных сред, используется в отечественной микробиологии более 80 лет для выделения и культивирования широкого спектра микроорганизмов. За рубежом для выделения и культивирования высоко требовательных факультативно-анаэробных и облигатно анаэробных микроорганизмов применяют агар Шедлера, среду для бруцелл, обогащенные витамином К и геминном. Прописи более «богатых» сред должны содержать L-цистеин, гемин, витамин K<sub>1</sub> [8,18]. Отечественные лаборатории используют эритрит-агар, как наиболее эффективную из всех имеющихся отечественных плотных сред, или закупают дорогостоящие импортные среды. Внедрение в промышленное производство предложенных и разработанных высокопитательных сред реализует проблему импортозамещения в России [25,26].

Разработанные СМС и СМА являются высокопитательными, проверены на референс-штаммах и при исследовании крови больных. Сравнили рост микроорга-

низмов на ТГС и СМС. На СМС аэробы растут чаще в 2,4 раза, микроаэрофилы – в 3,1 раза, анаэробы на ТГС не растут. Эффективность выделения моновидовых гемокультур на СМС выше в 2,3 раза, смешанных – в 4,3 раза по сравнению с ТГС. Аэробы растут в 2 раза, микроаэрофилы в 3,6 раза чаще на СМА, чем на МПА. Рост анаэробов на 5% кровяном МПА отсутствует.

СМЭ, как основа для питательной среды, и факторы роста обеспечивают оптимальные питательные потребности для роста широкого спектра клинически значимых микроорганизмов.

**Заключение.** Разработка отечественных жидкой и плотной сердечно-мозговых сред повышает эффективность выделения гемокультур за счёт высокой питательности сред (СМЭ, факторы роста), создания анаэробных условий. Получение гемокультур – необходимое условие для верификации диагноза ИК и назначения целевой антимикробной терапии.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках НИР ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-2, 4, 7, 12-14, 19  
см. REFERENCES)

3. Микробиология и иммунология: учебник. Воробьев А.А., ред. 2-е изд. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2005.
5. Каргальцева Н. М., Кочеровец В. И., Миронов А. Ю., Борисова О. Ю. Метод получения гемокультур при диагностике инфекции кровотока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(3): 185-90.
6. Белобородов В.Б. Роль современных рекомендаций по профилактике инфекций, связанных с катетеризацией сосудов. *Инфекции и антимикробная терапия*. 2002; 6: 177-80.
8. Шепелин И. А., Миронов А. Ю., Шепелин К. А. Питательные среды (справочник бактериолога). М.: Издательство «ЗАО А-Принт»; 2015.
9. Шепелин А.П., Дятлов И.А., Марчихина И.И., Миронова Е.Н. Разработка технологии приготовления панкреатического гидролизата рыбной муки – белковой основы бактериологических питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 9: 48-9.
10. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных основ микробиологических сред. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 3: 92-5.
11. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: Издательство «ЭЛБИ-СПб»; 2008.
15. Пашков Е. П., Миронов А. Ю., Култаев М. С., Плотича Ю. М. Питательная среда для культивирования неспорообразующих анаэробных бактерий на основе мясо-пептонного бульона. *Лабораторное дело*. 1988; 6: 47-9.
16. Миронов А. Ю., Ташлиев А. Р. Питательные среды из отечественных ингредиентов для анаэробной бактериологии. *Здравоохранение Туркменистана*. 1989; 9: 42-6.
17. Воробьев А. А., Пашков Е. П., Миронов А. Ю., Быков А. С., Шимчук Л. Ф. Современное состояние лабораторной диагностики инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробами, и пути её совершенствования. *Вестник РАМН*. 1994; 8: 26-9.
18. Кочеровец В. И., Михайлова В. С., Миронов А. Ю., Петраков А. А., Понамарёва Т. Р. Методы микробиологического анализа неспорообразующих анаэробных бактерий. М.: ТОО «Лабинформ»; 1996.
20. Подкопаев Я.В., Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Акимова Н.А., Храмов М.В. Питательная среда для культивирования и выде-

- ления возбудителей гнойных бактериальных менингитов, сухая (варианты). Патент РФ № 2471865; 2013.
21. Меньшиков В.В., Козлов Р.С., Поляк М.С., Михайлова В.С., Иноземцева Л.О., Шуляк Б.Ф. и др. Внутривенный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований: Клинические рекомендации. М.: Федерация лабораторной медицины; 2014.
22. Суханова С.М., Захарова Н.Е., Конду Э.И., Голубенко И.А. МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. М.: ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора; 2008.
23. Каргальцева Н.М., Кочеровец В.И., Борисова О.Ю., Пастушенков В.Л., Афанасьев С.С. Сердечно-мозговая питательная среда для диагностики инфекции в кровотоке и способ её получения. Патент РФ № 2650863; 2018.
24. Каргальцева Н.М., Борисова О.Ю., Кочеровец В.И., Алёшкин В.А., Афанасьев С.С., Пастушенков В.Л. и др. Способ получения питательной среды для выделения гемокультур при диагностике инфекции кровотока. Патент РФ № 2660708; 2018.
25. Дятлов И. А., Шепелин А. П., Алёшкин В. А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(8): 61-5.
26. Шепелин А. П., Домотенко Л. В., Дятлов И. А., Миронов А. Ю., Алёшкин В. А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(6): 63-5.

REFERENCES

1. Lagier J., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C. et al. Microbial culturomics: Paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012; 18(12): 1185-93.
2. Dunne W.M., Burnham C.D. The dark art of blood cultures. Washington: ASM Press DC; 2018.
3. Microbiology and Immunology: textbook [Mikrobiologiya i immunologiya: uchebnik]. Vorob'ev A.A., ed. 2<sup>nd</sup> ed. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
4. Pien B.C., Sundaram P., Raof N., Costa S.F., Mirrett S., Woods C.W., et al. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. *Amer. J. of Medicine*. 2010; 123(9): 819-28.
5. Kargal'tseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., Pastushenkov B.L. et al. The method for preparing a nutrient medium to obtain blood culture when diagnosing bloodstream infection. Patent RF № 2660708; 2018. (in Russian)
6. Beloborodov V.B. The role of modern infection prevention guidelines, associated with vascular catheterization. *Infektsii i antimikrobnaya terapiya*. 2002; 6: 177-80. (in Russian)
7. Wilson M.L., Mitchell M., Morris A.J., Murray P.R., Reimer L.G., Reller L.B. et al. Principles and procedures for blood cultures; approved guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
8. Shepelin I.A., Mironov A.Yu., Shepelin K.A. Culture media (bacteriologist's guide). Moscow: ZAO A-Print; 2015. (in Russian)
9. Shepelin A.P., Dyatlov I.A., Marchihina I.I., Mironova E.N. Development of a technology for the preparation of pancreatic hydrolyzate of fish meal, the protein basis of bacteriological culture media. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2011; 9: 48-9. (in Russian)
10. Kovtun Ju.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. Comparative assessment of the potential foundations of microbiological media. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2014; 3: 92-5. (in Russian)
11. Polyak M.S., Suharevich V.I., Suharevich M.Ye. Culture media for medical and sanitary microbiology. SPb.: JELBI; 2008. (in Russian)
12. Weinstein M.P., Mirrett S., Reimer L.G., Wilson M.L., Smith-Elekes S., Chuard C.R., Yoho K.L., Reller L.B. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *J. Clin. Microb.* 1995; 33(4): 978-81.
13. Cockerill F.R., Reed G.S., Hughes J.G., Torgerson C.A., Vetter E.A., Harmsen W.S. et al. Clinical comparison of BACTEC 9240 Plus

- Aerobic/F resin bottles and the isolator aerobic culture system for detection of bloodstream infections. *J.Clin.Microbiol.* 1997; 35(6): 1469-72.
14. Torres I., Gimenez E., Pascual T., Bueno F., Huntley D., Martinez M. et al. Short-term incubation of positive blood cultures in brain-heart infusion broth accelerates identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry. *J. Med. Microbiol.* 2017; 66(12): 1752-8.
  15. Pashkov E.P., Mironov A.Yu., Kul'taev M.S., Plotica Yu.M. Culture medium for the cultivation of non-spore-forming anaerobic bacteria based on meat and peptone broth. *Laboratornoe delo.* 1988; 6: 47-9. (in Russian)
  16. Mironov A.Yu., Tashliev A.R. Culture media from domestic ingredients for anaerobic bacteriology. *Zdravookhranenie Turkmenistana.* 1989; 9: 42-6. (in Russian)
  17. Vorobev A.A., Pashkov E.P., Mironov A.Yu., Bykov A.S., Shimchuk L.F. Current state of laboratory diagnosis of infections caused by non-spore-forming anaerobes and ways to improve it. *Vestnik RAMN.* 1994; 8: 26-9. (in Russian)
  18. Kocherovets V. I., Michajlova V.S., Mironov A.Yu., Petrakov A.A., Ponomareva T.R. Methods of microbiological analysis of non-spore-forming anaerobic bacteria. Moscow:Labinform; 1996. (in Russian)
  19. Peretz A., Pastukh N., Isakovich N., Koifman A., Brodsky D., Mizrahi H. et al. Efficacy of an enrichment media for increasing threshold for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* Screening. *J. Clin. Laboratory Analysis.* 2016; 30(5): 563-6.
  20. Podkopaev Ya.V., Morozova T.P., Domotenko L.V., Akimova N.A., Hramov M.V. Culture medium for the cultivation and isolation of pathogens of purulent bacterial meningitis, dry (variants). Patent RF № 2471865; 2013. (in Russian)
  21. Menshikov V.V., Kozlov R.S., Polyak M.S., Mikhailova V.S., Inozemtseva L.O., Shulyak B.F. et al. Intra-laboratory quality control of culture media for clinical microbiological studies: Clinical recommendations. Moscow: Federatsiya laboratornoy meditsiny; 2014. (in Russian)
  22. Sukhanova S.M., Zaharova N.E., Kondu Ye.I., Golubenko I.A. MUK 4.2.2316-08. Methods for controlling bacteriological culture media: Guidelines. Moscow: FBUZ Federal'nyi Tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)
  23. Kargal'tseva N.M., Kocherovets V.I., Borisova O.Yu., Pastushenkov B.L., Afanas'ev S.S. Brain-heart nutrient medium for diagnosing bloodstream infection and the way for preparing it. Patent RF №2650863; 2018. (in Russian)
  24. Kargal'tseva N.M., Borisova O.Yu., Kocherovets V.I., Aleshkin V.A., Afanas'ev S.S., Pastushenkov B.L. et al. The method for preparing a nutrient medium to obtain blood culture when diagnosing bloodstream infection. Patent RF № 2660708; 2018. (in Russian)
  25. Dyatlov I.A., Shepelin A.P., Aleshkin V.A. The state and development trends of clinical and sanitary microbiology in the Russian Federation and the problem of import substitution. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(8): 61-5. (in Russian)
  26. Shepelin A.P., Domotenko L.V., Dyatlov I.A., Mironov A.Yu., Aleshkin V.A. Modern approaches to the problem of import substitution in the production of culture media. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2015; 60(6): 63-5. (in Russian)

Поступила 22.04.20

Принята к печати 27.04.20