

Опыты по повышению стабильности крови бараньей дефибрированной

С.Г.Марданлы^{1,2}, Н.В.Бахилина¹, Я.В.Мишуткина¹, М.А.Котляр¹

¹ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», Орехово-Зуево, Московская область, Российская Федерация;

²ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Московская область, Российская Федерация

В работе представлены результаты экспериментов по увеличению сроков годности крови бараньей дефибрированной за счет введения в состав реагента готовых консервантов крови и отдельных их компонентов, разработаны практические рекомендации по оптимизации этого параметра, предложено инициировать процедуру актуализации соответствующих нормативных документов.

Ключевые слова: кровь баранья дефибрированная, консерванты крови, хранение

Для цитирования: Марданлы С.Г., Бахилина Н.В., Мишуткина Я.В., Котляр М.А. Опыты по повышению стабильности крови бараньей дефибрированной. Бактериология. 2018; 3(3): 34–37. DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-34-37

Experiences to improve the stability of the defibrinated lamb blood

S.G.Mardanly^{1,2}, N.V.Bahilina¹, Ya.V.Mishutkina¹, M.A.Kotlyar¹

¹State Humanitarian and Technological University, Orekhovo-Zuyev, Moscow region, Russian Federation;

²CJSC EKOLab, Elektrogorsk, Moscow region, Russian Federation

The paper presents the results of experiments to increase the shelf life of defibrinated lamb blood by introducing ready-made blood preservatives and their individual components into the reagent, practical recommendations for optimizing this parameter have been developed, initiating the procedure for updating relevant regulatory documents have been suggested.

Keywords: defibrinated lamb blood, blood preservatives, storage

For citation: Mardanly S.G., Bahilina N.V., Mishutkina Ya.V., Kotlyar M.A. Experiences to improve the stability of the defibrinated lamb blood. Bacteriology. 2018; 3(3): 34–37. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2018-3-34-37

Кровь баранья дефибрированная – реагент, широко используемый в микробиологических лабораториях при приготовлении питательных сред как для их обогащения при выращивании особо требовательных к составу сред микроорганизмов, так и для приготовления сред, позволяющих дифференцировать микроорганизмы по наличию или отсутствию у них гемолитической активности.

Для последнего исключительно важна устойчивость эритроцитов к спонтанному гемолизу в реагенте, хранящемся до своего использования, а также способность обеспечивать при добавлении в питательную среду выявление гемолитических свойств микроорганизмов. То есть характеристиками, определяющими возможность использования крови бараньей как диагностического реагента, являются полное от-

сутствие спонтанного гемолиза на момент исследования и способность обеспечивать рост тест-микроорганизмов на питательной среде, приготовленной с его использованием.

Реагент, выпускаемый ЗАО «ЭКОлаб», в соответствии с ТУ 9389-073-70423725-2007 имеет гарантированный срок хранения до использования 14 сут, что существенно снижает его потребительские характеристики сравнительно с аналогичными продуктами других производителей, гарантированный срок хранения которых составляет 56 сут.

Методики увеличения сроков хранения крови животных и ее компонентов практически не описаны в литературе. Поэтому при планировании экспериментов мы опирались на литературные данные по технологии консервирования донорской крови человека.

Для корреспонденции:

Марданлы Сейфаддин Гашимович, доктор медицинских наук, академик АМТН, профессор кафедры фармакологии и фармацевтических дисциплин ГОУ ВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет», президент и директор по науке ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1

Телефон: (49643) 3-17-45

E-mail: ekolab-president@mail.ru

Статья поступила 19.06.2018 г., принята к печати 29.10.2018 г.

For correspondence:

Seifaddin G. Mardanly, MD, PhD, DSc, professor, academician AMTS, Professor of the Department of pharmacology, State Humanitarian and Technological University, President and Director of Science CJSC "EKOLab"

Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation

Phone: (49643) 3-17-45

E-mail: ekolab-president@mail.ru

The article was received 19.06.2018, accepted for publication 29.10.2018

В современной трансфузиологии для консервирования крови чаще всего используются многокомпонентные консерванты на основе цитрата натрия. Помимо цитрата натрия, консервирующие растворы содержат глюкозу, аденин, дифосфоглицерофосфаты (1,3-ДФГ, 2,3-ДФГ), L-аминокислоты, аденозинмонофосфат (АМФ) или циклический АМФ (цАМФ), фосфатные буферные растворы и т.д. Подобное сочетание компонентов позволяет уменьшить количество применяемого цитрата, снизить его токсические эффекты, стабилизировать pH крови, поддержать высокий уровень гликолиза в течение всего срока хранения [1–4]. Однако возможность использования консервированной таким образом крови как компонента питательных сред у многих потребителей вызывает вполне обоснованный скепсис, учитывая достаточно сложный механизм гемолиза эритроцитов в питательных средах в результате действия гемолитических ферментов микроорганизмов.

Целью настоящего исследования была оценка возможности увеличения сроков годности крови бараньей дефибринированной нашего производства за счет введения в состав реагента как готовых консервантов крови, используемых в современной трансфузиологии, так и отдельных их компонентов. Кроме того, представлялось целесообразным оценить возможность использования осмотической устойчивости эритроцитов (минимальной концентрацией гипотонического раствора натрия хлорида, вызывающего в течение 3 ч гемолиз всех эритроцитов крови, помещенных в этот раствор) и такого показателя, как гематокрит, для прогнозирования гемолитической стабильности эритроцитов.

Материалы и методы

Использовали реагент собственного производства «Кровь баранья дефибринированная для питательных сред стерильная» по ТУ 9389-073-70423725-2007, приготовленный по регламенту №ПР-073-07.

В качестве стабилизирующих добавок были использованы:

1) консервант крови «ЦФДА-1», в состав которого входит лимонная кислота (безводная), натрия цитрата дигидрат, натрия дигидрофосфата моногидрат, декстрозы моногидрат, аденин, вода для инъекций;

2) консервант крови «САГМ», в состав которого входят натрия хлорид, аденин, глюкоза, маннитол, вода для инъекций (оба раствора брали из мешков для забора крови производства ЗАО «Дельрус»);

3) препарат для внутривенных инъекций «Глюкоза буфус», ЗАО «Производственная фармацевтическая компания Обновление» (раствор глюкозы 40%);

4) аналогичный раствор с добавкой аденина «ООО Кемикал Лайн», приготовленный на воде, очищенной по ФС 2.2.0020.15, стерилизованный при 1,1 атм, в течение 30 мин.

Стабилизаторы добавляли к реагенту, профильтрованному через стерильный трехслойный марлевый фильтр, и тщательно перемешивали, избегая образования пены:

- ЦФДА-1 – из расчета 63 мл на 450 мл крови;
- САГМ – из расчета 100 мл на 450 мл крови;
- раствор глюкозы – из расчета на получение конечной концентрации глюкозы 1%;

Таблица 1. Устойчивость к гемолизу эритроцитов в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Наличие гемолиза на срок хранения при 2–8°C, сут						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	–	–	–	+	+	+	+
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	–	–	–	–	–	+	+
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	–	–	–	–	+	+	+
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	–	–	–	–	–	–	+
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	–	–	–	–	–	–	+
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	–	–	–	–	–	–	+

«–» гемолиз отсутствует, «+» частичный гемолиз, «++» гемолиз.

Таблица 2. Показатель осмотической устойчивости эритроцитов в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Значения показателя на ... суток хранения при 2–8°C						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	0,55	0,65	0,65	0,7	Не исследовались**		
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	Нет данных*	0,6	0,6	0,65	0,65	0,7	0,7
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	0,55	0,6	0,6	0,65	0,65	Не исследовались**	
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	0,55	0,65	0,65	0,65	0,65	Не исследовались**	
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	0,5	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,6
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	0,5	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55	0,6

*Исходная осмотическая устойчивость препарата E&O Laboratories Ltd не известна (показатель отсутствует в паспорте);
**оценка не проводилась по причине полного гемолиза.

Таблица 3. Показатель гематокрита (%) в образцах крови бараньей, хранившихся при 2–8°C

Исследуемый вариант реагента	Значения показателя на ... суток хранения при 2–8°C						
	0	7	14	28	35	42	56
1-й контрольный (реагент производства ЗАО «ЭКОлаб» без добавок)	30	30	30	30	Не исследовались		
2-й контрольный (реагент производства E&O Laboratories Ltd)	30	32	32	32	32	32	30
1-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора ЦФДА-1)	30	30	30	30	30	30	27
2-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора САГМ)	30	30	30	30	30	30	27
3-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы)	30	30	30	30	30	30	27
4-й экспериментальный (реагент ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой раствора глюкозы и аденина)	30	30	30	30	30	30	27

• раствор глюкозы с аденином – из расчета на получение конечных концентраций глюкозы и аденина 1% и 0,003% соответственно.

В качестве контроля использовали реагент без стабилизаторов.

В качестве референс-реагента использовали аналогичный реагент фирмы E&O Laboratories Ltd (Шотландия).

Образцы всех реагентов помещали на хранение при 2–8°C.

Непосредственно после приготовления, а также через 7, 14, 28, 35 и 42 сут хранения все образцы оценивали по наличию в них спонтанного гемолиза и по характеру роста тест-штаммов стафилококка и стрептококка на средах, приготовленных с использованием этих реагентов. Оценку проводили по методикам, изложенным в ТУ 9389-073-70423725-2007. Гематокрит и осмотическую устойчивость эритроцитов оценивали по методикам, изложенным в руководстве «Лабораторные методы диагностики» [5].

Результаты исследования

Исследование влияния хранения на основные характеристики экспериментальных и контрольных образцов крови бараньей показало сохранность ростовых характеристик питательных сред, приготовленных из этих образцов на протяжении всего срока хранения, вплоть до появления в них частичного гемолиза (из полностью гемолизованных образцов питательные среды не готовились).

Результаты оценок устойчивости эритроцитов испытуемых образцов к гемолизу представлены в таблице 1.

На каждый срок исследовано не менее 5 образцов каждого варианта. Во всех параллельных исследованиях были получены совпадающие результаты.

Как следует из приведенных в таблице 1 данных, добавка в препарат крови глюкозы (образец 3) и глюкозы с аденином (образец 4) обеспечила полную гемолитическую стабильность вплоть до 42 сут хранения, т.е. до срока, на котором в контрольном коммерческом препарате уже был отмечен частичный гемолиз. Одинаковый стабилизирующий эффект добавок глюкозы и глюкозы с аденином позволяет рекомендовать для практического использования только 1% раствор глюкозы.

Представляло интерес также сопоставление исходных значений и динамики значений показателей осмотической устойчивости эритроцитов и гематокрита при хранении образцов со сроками наступления в них гемолиза.

Значения показателей устойчивости эритроцитов и гематокрита (исходные и в процессе хранения образцов) приведены в таблицах 2 и 3.

Как следует из приведенных в таблицах 2 и 3 данных, ни в исходных значениях обоих показателей, ни в последующей их динамике при хранении не удалось выявить существенных различий между всеми исследованными образцами. Можно отметить лишь тенденцию к более высокой осмотической стабильности (и исходной, и в процессе хранения) реагента ЗАО «ЭКОлаб» с добавкой глюкозы и глюкозы с аденином (образцы 3 и 4), совпадающую с более поздним появлением в них признаков гемолиза. Однако доказать статистическую значимость этой тенденции из-за столь

малых отличий и по причине недостаточных данных не удалось, что еще не позволяет рекомендовать этот показатель для прогнозирования гемолитической устойчивости эритроцитов в производимом продукте.

Показатель гематокрита в этом отношении оказался еще менее информативен и может расцениваться лишь как необходимая характеристика постоянства концентрации эритроцитов в продукте.

Выводы и предложения

1. Введение в коммерческий препарат крови бараньей дефибринированной 1% глюкозы или 1% глюкозы с 0,003% аденина позволило обеспечить полное отсутствие гемолиза в препарате до 42 сут хранения при 2–8°C.

2. Частичный гемолиз эритроцитов, выявляемый на 56-е сутки хранения, не препятствует использованию реагента для приготовления питательных сред.

3. Возможность использования осмотической устойчивости эритроцитов в свежеприготовленном реагенте для прогнозирования сроков гемолиза при хранении не доказана.

4. Показатель гематокрита может быть использован как показатель качества только для характеристики постоянства содержания эритроцитов в выпускаемом реагенте.

5. Целесообразно продолжить исследования связи гемолитической устойчивости эритроцитов при хранении реагента с исходным значением их осмотической устойчивости.

6. Целесообразно включить показатель гематокрита в число показателей качества реагента как характеристику исходного содержания в нем эритроцитов.

7. Рекомендовать инициацию процедуры актуализации нормативных документов, входящих в регистрационное досье для включения в его состав 1% глюкозы, изменения гарантированного срока хранения реагента до 56 сут и включения гематокрита в число показателей качества реагента.

Литература

1. Кузьмина ТВ, Пацелова ЛП. Сравнительный анализ применения эритроцитной массы, заготовленной с гемоконсервантом CPDA-1 и эритроцитной взвеси, полученной с применением ресуспендирующего раствора SAGM. Трансфузиология. 2004;5(3):100-3.
2. Рагимов АА, Еременко АА, Никифоров ЮВ. Трансфузиология в реаниматологии. М.: МИА; 2005, 784 с.
3. Трансфузиология: национальное руководство. Под ред. проф. А.А.Рагимова. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015, 1184 с.
4. Четкин АВ, Макеев АБ, Солдатенков ВЕ, Григорьян МШ. Совершенствование технологий заготовки эритроцитных компонентов в службе крови Российской Федерации. Медицина экстремальных ситуаций. 2013;3(45):63-9.
5. Степанов ЮМ. Лабораторные методы диагностики. Исследование крови. Абакан: Хакасский филиал ФГОУ ВПО «КрасГМУ»; 2004, 55 с.

References

1. Kuz'mina TV, Patselova LP. Sravnitel'nyi analiz primeneniya eritrotsitnoi massy, zagotovlennoi s gemokonservantom CPDA-1 i eritrotsitnoi vzvezi, poluchenoj s primeneniem resuspendiruyushchego rastvora SAGM. Transfuziologiya. 2004; 5(3):100-3. (In Russian).

2. Ragimov AA, Eremenko AA, Nikiforov YuV. Transfuziologiya v reanimatologii. Moscow: "MIA" Publ.; 2005, 784 p. (In Russian).
3. Transfuziologiya: natsional'noe rukovodstvo. Edited by A.A.Ragimov. Moscow: "GEOTAR-Media" Publ.; 2015, 1184 p. (In Russian).
4. Chechetkin AV, Makeev AB, Soldatenkov VE, Grigoryan MS. Perfecting the technologies of red blood banking in blood supply service in Russian Federation. Medicine of Extreme Situations. 2013;3(45):63-9. (In Russian).
5. Stepanov YuM. Laboratornye metody diagnostiki. Issledovanie krovi. Abakan, 2004, 55 p. (In Russian).

Информация об авторах:

Бахилина Наталья Владимировна, начальник НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»

Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-bahilina@mail.ru

Мишуткина Яна Владимировна, кандидат биологических наук, директор НПО «Иммунология» ЗАО «ЭКОлаб»
Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Котляр Марина Анатольевна, кандидат биологических наук, заместитель начальника ОБТК ЗАО «ЭКОлаб»
Адрес: 142530, Московская область, Электрогорск, ул. Буденного, 1
Телефон: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-kotlyar@mail.ru

Information about co-authors:

Natalia V. Bahilina, Head of the NGO «Immunology» CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-bahilina@mail.ru

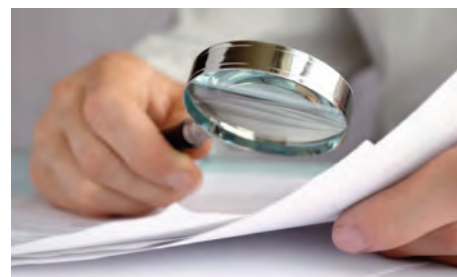
Yana V. Mishutkina, PhD (Biological Sciences), Director of Scientific and Production Association «Immunology» CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-mishutkina@mail.ru

Marina A. Kotlyar, PhD (Biological Sciences), Deputy Head of the OPF CJSC «EKOLab»
Address: 1 Budyonny str., Elektrogorsk, Moscow region, 142530, Russian Federation
Phone: (800) 333-1745
E-mail: ekolab-kotlyar@mail.ru

Оральные бактерии могут помочь судебным-медицинским экспертам оценить время с момента смерти

Точное определение времени, прошедшего с момента смерти, является важным аспектом судебной медицины и судебной практики. Новые исследования показывают, что это может быть достигнуто путем изучения изменений в бактериальных сообществах рта, которые возникают после смерти.

Adserias-Garriga J, Quijada NM, Hernandez M, Rodríguez Lázaro D, Steadman D, Garcia-Gil LJ. Dynamics of the oral microbiota as a tool to estimate time since death. Mol Oral Microbiol. 2017 Dec;32(6):511-516. DOI: 10.1111/omi.12191.



Фосфомицин как потенциальное лекарство для лечения системных инфекций: популяционная фармакокинетическая модель для моделирования множественных режимов дозирования

Новое исследование показывает, что лекарственный фосфомицин может быть эффективным для лечения множественных лекарственно-устойчивых бактериальных инфекций. В большинстве европейских стран пероральная композиция одобряется только как однократная доза 3 г для лечения неосложненного цистита; однако исследование Pharmacology Research & Perspectives показало, что режим дозирования 6–12 г в день, разделенный на 3 дозы, необходим для лечения системных бактериальных инфекций, резистентных к нескольким лекарственным средствам.



Ortiz Zacañas NV, Dijkmans AC, Burggraaf J, Mouton JW, Wilms EB, van Nieuwkoop C, et al. Fosfomicin as a potential therapy for the treatment of systemic infections: a population pharmacokinetic model to simulate multiple dosing regimens. Pharmacol Res Perspect. 2018 Feb;6(1). DOI: 10.1002/prp2.378