



BD Columbia Agar With 5% Horse Blood

PRZEZNACZENIE

Columbia Agar with 5% Horse Blood (Agar Columbia z dodatkiem 5% krwi końskiej) stanowi wieloskładnikowe, uniwersalne podłoże służące do izolacji i hodowli pochodzących z próbek klinicznych drobnoustrojów o niskich i wysokich wymaganiach żywieniowych.

ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY

Metoda mikrobiologiczna.

W 1966 roku Ellner i wsp.¹ zgłosili opracowanie nowego preparatu agaru z krwią, który nazwano agarem Columbia. Wyjątkowo korzystne własności podtrzymywania wzrostu agaru Columbia z dodatkiem 5% krwi końskiej wynikają z zastosowania połączenia dwóch peptonów i wyciągu z drożdży jako źródła witamin grupy B. Podłoże zawiera skrobię kukurydzianą, która służy do absorbowania toksycznych produktów ubocznych znajdujących się w próbce i stanowi źródło energii dla organizmów wytwarzających alfa-amylazy. Krew końska umożliwia wykrycie reakcji hemolizy i dostarcza zarówno czynnika X (hemu), jak i czynnika V (dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, NAD), niezbędnego do wzrostu wielu gatunków bakterii, w tym *Haemophilus influenzae*, który wymaga zarówno czynnika X, jak i V. Ponieważ agar Columbia z krwią charakteryzuje się względnie wysoką zawartością węglowodanów, paciorkowce beta-hemolizujące mogą powodować reakcję hemolityczną nadającą zielonkawe zabarwienie, niekiedy mylnie interpretowane jako hemoliza typu alfa. Taka reakcja hemolityczna dotycząca paciorkowców nadająca zielonkawe zabarwienie jest jednak obserwowana rzadziej w przypadku agaru Columbia z krwią końską niż w przypadku tego samego podłoża z krwią owczą.² Należy zauważyć, że zachodzące reakcje beta-hemolizy zależą od rodzaju dodawanej krwi, np. bakterie *Enterococcus*, które rzadko hemolizują krew owczą, będą wywoływać wyraźnie widoczną hemolizę krwi końskiej. *Staphylococcus aureus*, który zwykle we krwi owczej wywołuje hemolizę typu beta, najczęściej nie będzie powodował hemolizy krwi końskiej.

Na tej pożywce kolonie mają tendencję do rozwoju, a wzrost jest obfitszy niż na innych pożywkach zawierających podłoża z agaru z krwią. Agar Columbia z krwią zalecany jest jako podstawowe podłoże izolacyjne w standardach MiQ.³ W wielu krajach europejskich to podłoże stało się najczęściej używanym podłożem izolacyjnym do próbek klinicznych.

ODCZYNNIKI

BD Columbia Agar with 5% Horse Blood (Agar Columbia z dodatkiem 5% krwi końskiej BD)

Skład* w przeliczeniu na litr wody oczyszczonej

Trzustkowy wyciąg kazeiny	12,0 g
Pepsynowy wyciąg tkanki zwierzęcej	5,0
Ekstrakt drożdżowy	3,5
Ekstrakt wołowy	3,0
Skrobia kukurydziana	1,0
Chlorek sodu	5,0
Agar	13,5
Krew końska, odwłókniona	5%

pH 7,3 +/- 0,2.

* Odpowiednio skorygowany lub uzupełniony w celu spełnienia kryteriów wydajności.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

IVD . Wyłącznie do zastosowań profesjonalnych. ②

Nie należy używać płytek, jeżeli są na nich widoczne oznaki skażenia mikrobiologicznego, odbarwienia, wyschnięcia, pęknięcia lub inne oznaki pogorszenia jakości.

W dokumencie **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA** podano procedury aseptycznej techniki pracy z produktem, zagrożenia biologiczne oraz sposób utylizacji zużytego produktu.

PRZECHOWYWANIE I DOPUSZCZALNY OKRES MAGAZYNOWANIA

Dostarczone płytki należy przechowywać w zaciemnionym pomieszczeniu, w temperaturze od 2 do 8°C, w oryginalnych opakowaniach w formie rękawa, aż do momentu użycia. Nie zamrażać i nie przegrzewać. Płytki należy wykorzystać do posiewu bakterii przed upływem daty ważności (zobacz etykietę na opakowaniu) i inkubować zgodnie z zalecanymi czasami inkubacji.

Płytki z otwartego zestawu 10 płytek można zużyć w ciągu jednego tygodnia pod warunkiem przechowywania w czystym miejscu w temperaturze od 2 do 8°C.

KONTROLA JAKOŚCI PRZEZ UŻYTKOWNIKA

Reprezentatywne próbki podłoża zaszczepia się hodowlami wymienionych niżej szczepów (szczegółowe informacje — patrz dokument **OGÓLNE INSTRUKCJE DOTYCZĄCE STOSOWANIA**). Inokulowane płytki inkubuje się w temperaturze 35 ±2°C w środowisku tlenowym wzbogaconym dwutlenkiem węgla.

Płytki należy badać po 18 do 24 h, oceniając stopień wzrostu, wielkość kolonii i reakcję hemolizy.

Szczepy	Wynik wzrostu
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Wzrost, hemoliza typu beta
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Wzrost, hemoliza typu alfa
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Wzrost, hemoliza typu beta
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Wzrost, możliwa hemoliza typu beta
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Wzrost
Bez posiewu	Czerwone (kolor krwi)

PROCEDURA

Dostarczane materiały

BD Columbia Agar with 5% Horse Blood (Agar Columbia z dodatkiem 5% krwi końskiej BD) (płytki **Stacker** o średnicy 90 mm). Sprawdzane pod kątem obecności drobnoustrojów.

Materiały niedostarczane

Pomocnicze podłoża hodowlane, odczynniki oraz wyposażenie laboratoryjne zgodne z wymaganiami.

Typy próbek

Jest to uniwersalne podłoże izolacyjne, którego można używać do wszystkich typów próbek bakteriologicznych hodowanych w warunkach tlenowych (patrz także **CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY**).

Procedura testowa

Po dostarczeniu materiału do laboratorium jak najszybciej wykonać posiew próbki. Płytką do posiewu służy przede wszystkim do izolowania czystych hodowli z próbek zawierających florę mieszaną. Innym sposobem, jeżeli materiał jest hodowany bezpośrednio z wymazu, jest przetoczenie wymazówki po niewielkiej powierzchni krawędzi płytki, a następnie posiew pasmowy z zaszczepionego obszaru w celu uzyskania pojedynczych kolonii. W celu wykrywania swoistych patogenów należy włączyć odpowiednie podłoże wybiórcze, np. **BD MacConkey II Agar** do izolacji *Enterobacteriaceae* i innych pałeczek Gram-ujemnych.

Płytki z podłożem **BD Columbia Agar with 5% Horse Blood** należy inkubować w atmosferze tlenowej zawierającej od około 3 do 10% CO₂, gdyż wiele patogenów wymaga dwutlenku węgla przy pierwszej izolacji. Płytki inkubować w temperaturze 35 ±2°C przez okres od 18 do 72 godz. Pierwszego odczytu dokonać po 18 do 24 godz. i w razie potrzeby inkubować ponownie.

Wyniki

Po inkubacji na większości płytek pojawiają się obszary zlewnego wzrostu. W miejscach posiewu pasmowego drobnoustroje występują w zmniejszonej ilości, ponieważ procedura posiewu pasmowego w rzeczywistości stanowi technikę „rozcieńczeniową”. Na skutek tego w kilku miejscach powinny znajdować się wyizolowane kolonie drobnoustrojów zawartych w próbce. Ponadto wzrost wszystkich drobnoustrojów można oceniać ilościowo na podstawie wzrostu w każdym posianym pasmowo obszarze. W celu uzyskania informacji dotyczących wyglądu kolonii i dalszych testów różnicujących izolowane organizmy należy zapoznać się z odpowiednim piśmiennictwem.^{2,3}

Typowa morfologia kolonii często izolowanych drobnoustrojów na podłożu

BD Columbia Agar with 5% Horse Blood jest następująca:

Paciorkowce (nienależące do grupy D)	Niewielkie o barwie białej do szarawej. Hemoliza beta lub alfa.
Enterokoki (należące do grupy D)	Niewielkie, lecz większe niż paciorkowce grupy A, szarawe kolonie. Hemoliza typu beta.
Gronkowce	Duże, białe przechodzące w szare lub kremowe przechodzące w żółte, z hemolizą lub bez hemolizy.
Maczugowce	Od niewielkich do dużych, białe przechodzące w szare lub żółte, z hemolizą lub bez hemolizy.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Od niewielkich do średnich, szarawe, ze słabą hemolizą typu beta.
<i>Enterobacteriaceae</i>	Średnie do rozległych, szare, z hemolizą lub bez hemolizy.
<i>Candida</i> spp.	Niewielkie, białe.

CHARAKTERYSTYKA WYDAJNOŚCIOWA I OGRANICZENIA PROCEDURY

Opisywane podłoże jest przeznaczone do izolowania i hodowli wielu gatunków drobnoustrojów wykazujących wzrost w warunkach tlenowych, takich jak *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* i inne niefermentujące pałeczki Gram-ujemne, gronkowce, maczugowce, grzyby z gatunku *Candida* i wiele innych.²⁻⁴

Agar Columbia wzbogacony krwią końską zapewnia wyraźniejszą hemolizę typu beta paciorkowców niż agar Columbia z krwią owczą.²

Właściwości hemolityczne opisywane w podręcznikach diagnostycznych zazwyczaj odnoszą się do krwi owczej. W przypadku podłoży zawierających krew końską, np. **BD Columbia Agar with 5% Horse Blood**, te cechy mogą być inne (zobacz także **ZASADY I OBJAŚNIENIE PROCEDURY**). Kolonie *Haemophilus haemolyticus*, która jest elementem prawidłowej mikroflory gardła, są beta-hemolityczne w agarze z krwią końską oraz króliczą i muszą zostać odróżnione od kolonii beta-hemolizujących paciorkowców za pomocą innych kryteriów. Sugerowano, że zastosowanie krwi owczej usuwa ten problem, ponieważ jest ona pozbawiona nukleotydów pirydynowych i nie wywołuje wzrostu *H. haemolyticus*.⁵

Neisseria gonorrhoeae nie rośnie dobrze na opisywanym podłożu. Do hodowli tych gatunków zamiast opisywanego podłoża należy użyć agaru czekoladowego.

Opisywane podłoże nie nadaje się także do izolacji i hodowli *Mycobacterium*, *Legionella*, *Bordetella* i innych organizmów o wysoce swoistych wymaganiach żywieniowych.

Liczba gatunków bakterii występujących jako czynniki zakaźne jest bardzo duża. Dlatego przed rutynowym stosowaniem podłoża do hodowli rzadko izolowanych lub nowo opisanych drobnoustrojów należy sprawdzić jego przydatność poprzez wyhodowanie czystych kultur danego organizmu.

Wprawdzie pewne testy diagnostyczne można wykonywać bezpośrednio na opisywanym podłożu, jednak w celu przeprowadzenia pełnej identyfikacji konieczne jest wykonanie badania biochemicznego oraz, jeśli jest to wskazane, badania immunologicznego z użyciem czystych hodowli. W celu uzyskania dalszych informacji należy zapoznać się z odpowiednim piśmiennictwem.^{4,5}

PIŚMIENNICTWO

1. Ellner, P.D., C.J. Stoessel, E. Drakeford, and F. Vasi. 1966. A new culture medium for medical bacteriology. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 502-504.
2. Chapin, K.C., and T.-L. Lauderdale. 2003. Reagents, stains, and media: bacteriology. *In*: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenenbaum (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
3. MiQ - Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, edited by Mauch, H., R. Lüttken, and S. Gatermann for the Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM). Volumes 3, 6, and 7. Urban & Fischer, Munich, Germany.
4. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, *Clinical microbiology procedures handbook*, vol.1, p. 1.6.1-1.6.7. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Baron, E. J, L. R. Peterson, and S. M. Tenenbaum. 1994. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology*, 9th ed., p. 415. Mosby-Year Book, Inc. St. Louis, MO.

OPAKOWANIE/DOSTĘPNOŚĆ

BD Columbia Agar with 5% Horse Blood (Agar Columbia z dodatkiem 5% krwi końskiej BD)

Nr kat. 256006

Podłoże na płytkach, gotowe do użycia, 20 sztuk

DODATKOWE INFORMACJE

W celu uzyskania dodatkowych informacji należy skontaktować się z lokalnym przedstawicielem BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastrasse 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD