



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Основа колумбійського кров'яного агару (DM063)

Призначення:

Це середовище використовується в якості ефективної основи для приготування кров'яного, шоколадного агару, а також різних селективних і диференціальних середовищ.

Короткий опис та пояснення:

Це середовище розробили Ellner з соавт. Основу колумбійського кров'яного агару зазначено в Компендіумі методів мікробіологічного дослідження харчових продуктів.

Колумбійський агар використовується в якості основи для середовищ, що містять кров і для селективних форм середовищ, в яких різні комбінації антимікробних препаратів використовуються як добавки. Основа колумбійського кров'яного агару, як правило, доповнюється 5-10% овечої, кінської або кролячої крові для виділення, вирощування та визначення гемолітичної реакції вибагливих патогенних мікроорганізмів. Без збагачення основа колумбійського кров'яного агару використовується як середовище загального призначення. Кров вівці була додана для спостереження гемолітичної реакції, що видно по подвійній зоні β-гемолізу *Clostridium perfringens*. Це середовище готують, зберігають і розподіляють в безкисневих умовах, щоб запобігти утворенню окислених продуктів перед використанням.

Принцип дії:

Спеціальний пептон є джерелом азоту, вітамінів і вуглецю. Кукурудзяний крохмаль сприяє росту *Neisseria spp.* і підсилює гемолітичні реакції деяких стрептококів. Крім того кукурудзяний крохмаль служить в якості джерела енергії, а також нейтралізує токсичні метаболіти. Хлорид натрію підтримує осмотичний баланс середовища. Агар є агентом затвердіння. Особливий пептон підтримує швидкий і пишний ріст вибагливих і невибагливих організмів. Крім того, це середовище сприяє появі колоній з типовою морфологією; на ньому краще проявляється пігментоутворення і більш різко визначені гемолітичні реакції. Fildes виявив, що поживний агар з додаванням перевару овечої крові є джерелом X і V факторів і підтримує ріст *H. influenzae*. Включення бацитрацину робить колумбійський кров'яний агар селективним для виділення *Haemophilus spp.* з клінічних зразків, особливо з верхніх дихальних шляхів. Колумбійський агар використовується як основа для середовищ, що містять кров, і для селективних форм середовищ, в яких як добавки використовуються різні комбінації антимікробних препаратів. Загалом, основа кров'яного агару відносно вільна від відновлення цукрів, які, як було доведено, несприятливо впливають на гемолітичні реакції β-гемолітичного стрептококу. Збагачення кров'ю (5-10%) надає додаткові ростові фактори для вибагливих мікроорганізмів, і допомагає у визначенні гемолітичної реакції. Гемолітичні моделі можуть змінюватися залежно джерела крові тварин і типу використовуваного основного середовища.

Овеча кров дозволяє виявити гемоліз, а також забезпечує гемін (фактор X), який потрібен для зростання багатьох бактерій. Однак вона позбавлена V фактора (нікотинамідаденіндинуклеотид) і, отже, *Haemophilus influenzae*, який потребує X і V факторів, не буде рости на цьому середовищі. Через те, що середовище має відносно високий вміст вуглеводів, бета-гемолітичний стрептокок може проявляти зеленувату гемолітичну реакцію, що може бути помилково прийнято за альфа-гемоліз. Для всіх колоній проводять підтвердуючі тести. Колумбійський агар з додаванням стерильної сироватки є ефективним випробувальним середовищем для вірулентності *Corynebacterium diphtheriae*. При проведенні методики, установлені для *Corynebacterium diphtheriae*, лінію преципітації токсин-антитоксин чітко видно протягом 48 годин. Багато патогенів вимагають вуглекислого газу; тому чашки можуть інкубуватись в атмосфері, що містить приблизно 3-10% CO₂.

Запобіжні заходи: культури *Brucella* дуже інфекційні і з ними необхідно поводитись дуже обережно; інкубувати в 5-10% CO₂. *Campylobacter spp.* краще всього вирощувати при 42°C в мікроаерофільній атмосфері. Чашки з добавками для *Gardenerella* повинні інкубуватись при 35°C протягом 48 годин, 7% CO₂.

Формула/літр

Інгредієнти	Грам/літр
Спеціальний пептон	23,00
Кукурудзяний крохмаль	1,00
Хлористий натрій	5,00



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

Агар	15,00
Вирішальне значення рН (при 25°C)	7,3 ± 0,2
Формула може змінюватися і/або доповнюватися у відповідності до технічних вимог.	

Засоби застереження:

1. Тільки для лабораторного використання.
2. ШКІДЛИВО. Подразнює очі, шкіру та респіраторні органи.

Приготування:

1. Розмішати 44 г сухого середовища у 1000 мл дистильованої води. Підігріти до кипіння для повного розчинення частинок.
2. Стерилізувати автоклавуванням при 1,1 ат (121 °C) протягом 15 хвилин. Охолодити до 45-50° C перед додаванням теплочутливих компонентів.
3. Для кров'яного агару: додати 5% від обсягу дефібринованої овечої крові до стерильної охолодженої основи.
4. Для шоколадного агару: додати 10% від обсягу стерильної дефібринованої овечої крові в стерильну охолоджену основу. Нагріти до 80°C протягом 10 хвилин при постійному помішуванні.
5. Середовище може бути зроблено селективним шляхом додавання різних антимікробних препаратів у стерильну основу.
6. Для *Brucella spp.*: додати регідратований вміст 1 флакона селективної добавки для *Brucella* (MS043) до 500 мл стерильної розплавленої основи.
7. Для *Campylobacter spp.*: додати регідратований вміст 1го флакону добавки-I для *Campylobacter* (Blaser-Wang) (MS004) або добавки-II для *Campylobacter* (Butzler) (MS005) або добавки-III для *Campylobacter* (Skirrow) (MS007) або селективної добавки для *Campylobacter* (MS155) або добавки-VI для *Campylobacter* (Butzler) (MS138) до 500 мл стерильної розплавленої основи разом з регідратованим вмістом 1го флакону ростової добавки для *Campylobacter* (MS008) і 5-7% від обсягу кінської або овечої крові.
8. Для *Gardnerella spp.*: додати регідрований вміст 1 флакона селективної добавки *G. vaginalis* (MS018) до 500мл стерильної розплавленої основи.
9. Для коків додати регідрований вміст 1 флакона стафілокок-стрепто (MS026) або стрепто добавки (MS027) до 500 мл стерильної розплавленої основи.

Контроль якості:

Зовнішній вигляд сухого середовища	Колір від кремового до жовтого; гомогенний, легко сипучий порошок
Готове середовище	Світло-бурштинового кольору, прозорий або злегка опалесцюючий гель. Після додавання 5% від об'єму стерильної дефібринованої крові: вишнево-червоний непрозорий гель у чашках Петрі.
Реакція 4,4% розчину (основне середовище)	рН: 7.2 ± 0.2 при температурі 25°C
Міцність гелю	Щільний, подібний до 1,5% агарового гелю

Культуральні властивості:

культуральні особливості колумбійського агару після додавання 5% від об'єму стерильної дефібринованої крові відмічаються під час інкубації при 35-37°C на протязі 24-48 годин.

№ з/п	Штами мікроорганізмів	Інокулят (КУО)	Ріст	Виділення	Гемоліз
1.	<i>Neisseria meningitidis</i> ATCC 13090	50-100	Пишний	>=70%	Відсутній
2.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	50-100	Пишний	>=70%	β\γ
3.	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	50-100	Пишний	>=70%	β\γ
4.	<i>Staphylococcus aureus</i> NCIMB 9518	50-100	Пишний	>=70%	β\γ
5.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	50-100	Пишний	>=70%	γ
6.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6303	50-100	Пишний	>=70%	α
7.	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	50-100	Пишний	>=70%	β



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

8.	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	50-100	Пишний	$\geq 70\%$	-
9.	<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 11437	50-100	Пишний	$\geq 70\%$	-
10.	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	50-100	Пишний	$\geq 70\%$	-
11.	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 12934	50-100	Пишний	$\geq 70\%$	-

У таблиці наданій мінімальний перелік штамів мікроорганізмів, що повинні бути використані для проведення контролю якості.

Процедура тестування:

1. Обробляється кожен зразок в міру необхідності; інокулювання відбувається безпосередньо на поверхню середовища. Для виділення роблять посів штрихами петлею та проколюють агар декілька разів, щоб внести бета-гемолітичний стрептокок під поверхню агару. Поверхневий ріст покаже найнадійніші гемолітичні реакції внаслідок активності як киснево-стабільних, так і киснево-лабільних стрептококів.
2. Чашки інкубують в аеробних умовах, в анаеробних умовах, або в умовах підвищеної концентрації CO_2 (5-10%) відповідно до лабораторних протоколів.

Результати:

Вивчіть середовище на предмет росту і гемолітичних реакцій після 18 - 24 і 48 годин інкубації. Є чотири типи гемолізу на кров'яному агарі, описані як:

- Альфа гемоліз (α) - редукування гемоглобіну в метгемоглобін в середовищі, навкруги колонії. Проявляється як зелене знебарвлення середовища.
- Бета-гемоліз (β) - лізис еритроцитів з чіткою зоною навколо колонії.
- Гамма гемоліз (γ) вказує на відсутність гемолізу. Руйнування еритроцитів не відбувається, і немає ніяких змін в середовищі.
- Альфа-прайм-гемоліз (α') являє собою невелику зону повного гемолізу, що оточений площею часткового лізису.

Зберігання:

Зберігайте герметично закрити упаковку, що містить сухе середовище при температурі 2 - 30 °C. Після розкриття або перепакування зберігайте флакон в приміщеннях з низьким рівнем вологості при тій же температурі. Бережіть від потрапляння вологи та світла.

Термін зберігання:

Термін зберігання вказаний на упаковці. Не використовуйте середовища що втратили сипучість, або якщо зовнішній вигляд відрізняється від оригінального. Термін зберігання відноситься до середовищ за умов збереження цілісності контейнера та при зберіганні відповідно до вказівок.

Обмеження процедури:

1. У зв'язку з особливостями в потребах поживних речовин декотрі штами можуть рости погано або не рости на цьому середовищі.
2. Гемолітичні реакції деяких штамів стрептококів групи D, як було показано, можуть порушуватись через відмінності у крові тварин. Це такі штами, як бета-гемолітичний стрептокок на агарі з кінською, людською і кролячою кров'ю і альфа-гемолітичний - на агарі з овечою кров'ю.
3. Атмосфера інкубації, як було показано, впливає на гемолітичні реакції бета-гемолітичного стрептококу. Для забезпечення оптимальної продуктивності інкубувати основу колумбійського кров'яного агару необхідно при підвищеній концентрації CO_2 (5-10%) відповідно до встановлених лабораторних протоколів.

Упаковка:

Найменування середовища: Основа колумбійського кров'яного агару

Каталожний номер: DM063

Доступний розмір упаковки: 500 г

Посилання на літературу:

1. Ellner, Stoessel, Drakeford and Vasi. 1966. Am. J. Clin. Pathol. 45:502.
2. Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser (eds.). Compendium Of Methods For The Microbiological Examination Of Food, 3rd ed., p.1113. American Public Health Association, Washington, D.C.
3. Casman, E. P. 1947. A noninfusion blood agar base for neisseriae, pneumococci and streptococci. Am. J. Clin. Pathol. 17:281-289.



ІНСТРУКЦІЯ З ВИКОРИСТАННЯ

4. Ruoff, K. L. 1995. Streptococcus, p. 299-305. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (eds.). Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
5. Ellner P. P., Stoessel C. J., Drakeford E. and Vasi F., 1966, Am. J. Clin. Pathol., 45:502.
6. Fildes P., 1920, Br. J. Exp. Pathol., 1:129.
7. Fildes P., 1921, Br. J. Exp. Pathol., 2:16.
8. Chapin K. C. and Doern G. V., 1983, J. Clin. Microbiol., 17:1163.
9. Bailey R. K., Voss J. L. and Smith R. F., 1979, J. Clin. Microbiol., 9 ; 65-71
10. Isenberg, H. D. (ed.). 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1 p. 1.61-1.67. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



MICROMASTER LABORATORIES PRIVATE LIMITED

Unit 38/39, Kalpataru Industrial Estate,
Off G.B. Road, Near 'R-Mall' , Thane (W) – 400607. M.S. INDIA.
Ph: +91-22-25895505, 4760, 4681. Cell: 9320126789.
Email: micromaster@micromasterlab.com

DM063PI, Rev.0, 01.08.2008