



1. ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR είναι ένα επιλεκτικό και διαφορικό θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια, απομόνωση, καταμέτρηση και διαφοροποίηση των Λακτοβακίλλων από κλινικά δείγματα και τρόφιμα.

Το μέσο επιτρέπει τη διάκριση των Λακτοβακίλλων (Μπλε αποικίες) που παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και στους Λακτοβάκιλλους (Λευκές αποικίες) που δεν παράγουν H_2O_2 .

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Οι Λακτοβάκιλλοι είναι Gram-θετικά, προαιρετικά αναερόβια ή μικροαερόφιλα βακτήρια, τα οποία απαντώνται φυσικά σε διάφορα περιβάλλοντα, συμπεριλαμβανομένης της γαστρεντερικής, στοματικής και κολπικής μικροχλωρίδας ανθρώπων και ζώων.

Οι Λακτοβάκιλλοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της μικροβιακής ισορροπίας, ιδιαίτερα στη γαστρεντερική και κολπική μικροχλωρίδα. Ορισμένα είδη παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το οποίο βοηθά:

- Στην αναστολή παθογόνων βακτηρίων (π.χ., *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).
- Στην προστασία της κολπικής μικροχλωρίδας διατηρώντας το όξινο pH.
- Στη ρύθμιση της εντερικής υγείας μέσω ανοσοτροποποιητικής δράσης.

Ωστόσο, ορισμένα στελέχη Λακτοβακίλλων δεν παράγουν H_2O_2 και μπορεί να σχετίζονται με ανισορροπία της μικροχλωρίδας (δυσβίωση), διευκολύνοντας την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

Το κλασικό Rogosa Άγαρ χρησιμοποιείται για την απομόνωση των Λακτοβακίλλων, αλλά δεν διαφοροποιεί τα στελέχη με βάση την παραγωγή H_2O_2 .

Η τροποποίηση του BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR με TMB και Peroxidase επιτρέπει την οπτική διαφοροποίηση των Λακτοβακίλλων:

- Οι Λακτοβάκιλλοι που παράγουν H_2O_2 οξειδώνουν το TMB, προκαλώντας μπλε χρώση των αποικιών.
- Οι Λακτοβάκιλλοι που δεν παράγουν H_2O_2 παραμένουν λευκοί, καθώς δεν διαθέτουν την απαραίτητη ενζυματική δραστηριότητα για οξείδωση.

Αυτή η διαφοροποίηση είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε διαγνωστικές εξετάσεις, όπου οι H_2O_2 -θετικοί Λακτοβάκιλλοι έχουν προστατευτικό ρόλο στην κολπική και εντερική υγεία και στην μικροβιολογία τροφίμων, για την παρακολούθηση της μικροβιακής σύστασης των γαλακτοκομικών προϊόντων.

3. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR είναι ένα επιλεκτικό και διαφορικό θρεπτικό μέσο, σχεδιασμένο ειδικά για την καλλιέργεια, απομόνωση και χρωματική διαφοροποίηση των Λακτοβακίλλων με βάση την ικανότητά τους να παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2).

Η διαφοροποίηση επιτυγχάνεται από την αντίδραση H_2O_2 + TMB μέσω Peroxidase προκαλεί μπλε χρωματισμό των αποικιών, οδηγώντας στη χρωματική διάκριση.

Για τη βέλτιστη ανάπτυξη των Λακτοβακίλλων, το BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR περιλαμβάνει υδατάνθρακες (Σακχαρόζη, Αραβινόζη, Δεξτρόζη) ως πηγές άνθρακα και ενέργειας. Επίσης τρυπτόνη και εκχύλισμα ζύμης που παρέχουν βιταμίνες (κυρίως B), αμινοξέα και ανόργανα στοιχεία. Θεϊκά άλατα ($FeSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$) σημαντικά για τη μεταβολική δραστηριότητα των Λακτοβακίλλων.

Το BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR έχει έντονα επιλεκτικές ιδιότητες, οι οποίες εξασφαλίζουν την ανάπτυξη μόνο των Λακτοβακίλλων, εμποδίζοντας την ανάπτυξη ανεπιθύμητων μικροοργανισμών.

Οι μηχανισμοί επιλεκτικότητας είναι το οξικό νάτριο (*Sodium acetate*) και κιτρικό αμμώνιο (*Ammonium citrate*) που αναστέλλουν τα περισσότερα Gram-αρνητικά βακτήρια, καθώς και μύκητες και στρεπτόκοκκους.

Το χαμηλό pH (~5,5). Οι λακτοβάκιλλοι είναι ανθεκτικοί στα όξινα περιβάλλοντα, ενώ οι περισσότεροι άλλοι μικροοργανισμοί δεν μπορούν να επιβιώσουν.

Το Πολυσορβικό 80 (Tween 80) το οποίο δρα ως επιφανειοδραστικός παράγοντας, εξουδετερώνοντας ανασταλτικές ουσίες όπως φαινόλες, εξαχλωροφαινίνη και φορμαλίνη. Τέλος το βακτηριολογικό άγαρ αποτελεί τον στερεοποιητικό παράγοντα του θρεπτικού μέσου.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
Enzymatic Digest of Casein	10,0
Yeast extract	5,0
Dextrose	20,0
Sodium Acetate	25,0
Ammonium Citrate	2,0
Monopotassium Phosphate	6,0
Magnesium Sulfate	0.575
Manganese Sulfate	0,12
Ferrous Sulfate	0.034
Polysorbate 80	1,0
TMB & Peroxidase	0,3
Agar	15,0

Εμφάνιση: Ελαφρώς θολό, κιτρινωπό-πράσινο ανοιχτό, πιθανώς με κρυστάλλους.

Τελικό pH $5,5 \pm 0.1$ στους 25 °C

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου. Το υλικό αυτό περιέχει πεπτόνες και εκχυλίσματα ζωικής προέλευσης. Τα πιστοποιητικά για την προέλευση και την υγειονομική κατάσταση των ζώων δεν εγγυόνται πλήρως την απουσία μεταδιδόμενων παθογόνων παραγόντων. Γι' αυτό συνιστάται αυτά τα υλικά να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά και με τήρηση των συνήθων μέτρων ασφαλείας (να μη λαμβάνονται από την πεπτική ή την αναπνευστική οδό). Ο χειρισμός των τρυβλίων να γίνεται πάντα με γάντια και μέσα σε Laminar flow Class II, για να αποφεύγονται επιμολύνσεις κυρίως από σαπροφυτικούς μύκητες. Τα τρυβλία BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR παρέχονται έτοιμα προς χρήση και δεν απαιτούν περαιτέρω επεξεργασία πριν τη χρήση. Πριν από τη χρήση, ελέγξτε τα τρυβλία για πιθανές αλλοιώσεις, όπως αφυδάτωση, ρωγμές ή μόλυνση. Αν υπάρχουν λευκά στίγματα στην επιφάνεια λόγω κρυσταλλωμένων χολικών αλάτων, αυτά δεν επηρεάζουν την απόδοση του μέσου και απορροφώνται μετά την επώαση. Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα πλένουμε αμέσως με άφθονο νερό και σαπούνι. Τα θετικά δείγματα πρέπει να καταστρέφονται σύμφωνα με τους κανόνες υγιεινής που προβλέπονται για τη διαχείριση μολυσματικών δειγμάτων.

6. ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους **2 – 12 °C** μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Αποφύγετε την έκθεση σε φως και υγρασία, καθώς μπορεί να αλλοιώσει τη σταθερότητα του TMB και της Peroxidase. Επίσης να αποφεύγεται την υπερβολική θέρμανση. Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα τρυβλία μπορούν να παραμείνουν στους **6 - 25 °C για 3 ημέρες** ή στους **25 - 40 °C για 24 ώρες**, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

7. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΧΡΗΣΗΣ

Η καλλιέργεια και ανάλυση των δειγμάτων στο BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR απαιτεί προσεκτικά βήματα για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων.

7.1 Προετοιμασία των τρυβλίων:

Αφήστε τα τρυβλία να προσαρμοστούν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) για 30 λεπτά πριν από την ενοφθαλμιστική διαδικασία.

Αυτό βοηθά στην αποφυγή σχηματισμού συμπυκνωμάτων υγρασίας στο καπάκι του τρυβλίου, που μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη των αποικιών.

Ενοφθαλμισμός του δείγματος:

Βυθίστε το στειλέο στο δείγμα. Εφαρμόστε το δείγμα στην επιφάνεια του τρυβλίου, διαγράφοντας διαδοχικές ζώνες για τη σταδιακή αραίωση των βακτηρίων. Περιστρέψτε το τρυβλίο κατά 90° και επαναλάβετε τη διαδικασία 2-3 φορές με νέο αποστειρωμένο στειλέο.

Κλείστε το τρυβλίο και προχωρήστε στην επώαση στους 35±2°C για 24-48 ώρες σε μικροαερόφιλες συνθήκες.

8. ΑΝΑΓΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Μετά την επώαση, οι αποικίες αξιολογούνται μακροσκοπικά, παρατηρώντας το χρώμα και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

• Οι Λακτοβάκιλλοι που παράγουν H₂O₂ οξειδώνουν το TMB, προκαλώντας μπλε χρώση των αποικιών H₂O₂ - παραγωγικοί Λακτοβάκιλλοι-προστατευτικοί.

• Οι Λακτοβάκιλλοι που δεν παράγουν H₂O₂ παραμένουν λευκοί, καθώς δεν διαθέτουν την απαραίτητη ενζυματική δραστηριότητα για οξείδωση H₂O₂ - μη παραγωγικοί λακτοβάκιλλοι-δυσνητικά επιβλαβείς.

9. ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Η Bioprepare ελέγχει κάθε παρτίδα εμπορικά παραγόμενου θρεπτικού μέσου χρησιμοποιώντας κατάλληλους ποιοτικούς ελέγχους μικροοργανισμών και προδιαγραφές ποιότητας, όπως περιγράφονται στα Πιστοποιητικά Ανάλυσης (CoA).

Μικρόβιο	Συνθήκες επώασης	Ανάπτυξη-Χρώμα αποικιών
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	44-48 ώρες στους 35-37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες	Καλή ανάπτυξη, λευκωπές, μεσαίου μεγέθους, γυαλιστερές αποικίες
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	44-48 ώρες στους 35-37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες	Καλή ανάπτυξη, λευκωπές, ελαφρώς κυρτές, γυαλιστερές αποικίες
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CS1/2	44-48 ώρες στους 35-37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες	Καλή ανάπτυξη, μπλε αποικίες μεσαίου μεγέθους (H ₂ O ₂ Θετικό).
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	44-48 ώρες στους 35-37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες	Καμία ανάπτυξη
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	44-48 ώρες στους 35-37°C, σε μικροαερόφιλες συνθήκες	Καμία ανάπτυξη



Lactobacillus acidophilus CS1/2



Lactobacillus delbrueckii ATCC 7830

10. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σε ορισμένες περιπτώσεις, η μπλε χρώση μπορεί να είναι ασθενής, ειδικά όταν η παραγωγή H_2O_2 είναι χαμηλή.

Εάν δεν υπάρχει καμία ανάπτυξη στο τρυβλίο, πιθανώς το δείγμα δεν περιέχει Λακτοβακίλλους ή έχει υψηλή συγκέντρωση ανασταλτικών παραγόντων.

Εάν απαιτείται επιβεβαίωση ταυτοποίησης των Λακτοβακίλλων, μπορούν να πραγματοποιηθούν πρόσθετες δοκιμές:

✓ **Gram Χρώση:** Οι Λακτοβάκιλλοι είναι Gram-θετικοί και εμφανίζονται ως ραβδία.

✓ **Κατάλωση (-) Τεστ:** Οι Λακτοβάκιλλοι είναι κατάλωση-αρνητικοί (δεν παράγουν φυσαλίδες με υπεροξείδιο του υδρογόνου).

✓ **Βιοχημικά τεστ:** Για επιβεβαίωση της ταυτότητας του είδους μέσω μεταβολισμού σακχάρων.

11. ΑΠΟΡΡΙΨΗ ΤΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

Τα υλικά που δεν παρουσιάζουν καμία ανάπτυξη μπορεί να θεωρηθούν ως μη επικίνδυνα απόβλητα και να απορρίπτονται ανάλογα.

Τα υλικά που παρουσιάζουν ανάπτυξη αποικιών πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τις οδηγίες για μολυσματικά ή δυνητικούς μολυσματικά απόβλητα. Το εργαστήριο είναι υπεύθυνο για τη σωστή διαχείριση των μολυσματικών αποβλήτων σύμφωνα με τη φύση και το βαθμό επικινδυνότητάς τους και πρέπει να τα διαχειρίζεται και να τα απορρίπτει (ή να αναθέτει τη διαχείριση και απόρριψή τους) σύμφωνα με τους εκάστοτε ισχύοντες κανονισμούς.

12. ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR	010872	2 x 5 τρυβλία 9cm σε κουτί των 10 τεμαχίων	2 – 12 °C	2 μήνες

Παράγεται στην Ελλάδα από την εταιρεία Bioprepare σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΕ) 2017/746.

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714010402WH. EDMA: (14 01 04 02) Chromogenic ID Media (Plates).

Η εταιρεία Bioprepare έχει πιστοποιηθεί σύμφωνα με τα πρότυπα: EN ISO 9001:2015 / ΕΛΟΤ EN ISO 13485:2016 ΔΥ8δ/1348/2004.

13. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. **Rogosa, M., Mitchell, J. A., Wiseman, R. F.** (1951). *A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli*. Journal of Dental Research, 30(5), 682-689.

Η αρχική δημοσίευση για το **Rogosa agar**, το οποίο σχεδιάστηκε για την εκλεκτική απομόνωση των Λακτοβακίλλων από δείγματα κοπράνων και στοματικής μικροχλωρίδας.

2. **De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E.** (1960). *A medium for the cultivation of lactobacilli*. Journal of Applied Bacteriology, 23(1), 130-135.

Παρουσίαση του **MRS agar**, ενός μέσου που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη των Λακτοβακίλλων και τη σύγκριση με το Rogosa agar.

3. **Ouweland, A. C., Salminen, S., Isolauri, E.** (2002). *Probiotics: an overview of beneficial effects*. Antonie Van Leeuwenhoek, 82, 279-289.

Ανασκόπηση σχετικά με τη σημασία των προβιοτικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των Λακτοβακίλλων, και τον ρόλο τους στην ανθρώπινη υγεία.

4. **Kullen, M. J., & Klaenhammer, T. R.** (1999). *Genetics and genomics of Lactobacillus acidophilus*. FEMS Microbiology Reviews, 23(2), 131-144.

Γενετική και λειτουργική ανάλυση του **Lactobacillus acidophilus**, ενός βασικού προβιοτικού βακτηρίου.

5. **Reuter, G.** (2001). *The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: Composition and succession*. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2(2), 43-53.

Ανάλυση της εντερικής μικροχλωρίδας και της σημασίας των λακτοβακίλλων στην υγεία του πεπτικού συστήματος.

6. **Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., & Bruck, W.** (2003). *Some insights into the derivation and early uses of probiotics*. British Journal of Nutrition, 90(6), 845-852.

Ιστορική ανασκόπηση της ανακάλυψης και χρήσης των προβιοτικών, εστιάζοντας στους Λακτοβακίλλους.

7. **Collins, M. D., & Gibson, G. R.** (1999). *Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut*. American Journal of Clinical Nutrition, 69(5), 1052S-1057S.

Αναφορά στον ρόλο των Λακτοβακίλλων και άλλων προβιοτικών βακτηρίων στη ρύθμιση της εντερικής χλωρίδας.

8. **Hsieh, C. Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., & Tsuneda, S.** (2015). *Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by Bifidobacterium bifidum*. Physiological Reports, 3(3), e12327.

Αναφορά στη λειτουργία των Λακτοβακίλλων και των bifidobacteria στη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.

9. **Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., & Moench, T. R.** (2001). *Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source*. Human Reproduction, 16(9), 1809-1813.

Έρευνα για τον ρόλο των Λακτοβακίλλων στη ρύθμιση του κοιλιακού pH μέσω της παραγωγής γαλακτικού οξέος.

10. **Molin, G.** (2001). *Probiotic bacteria: interactions with the human host*. Food & Nutrition Research, 45(1), 13-17.

Επισκόπηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των Λακτοβακίλλων και του ανθρώπινου οργανισμού, με έμφαση στα προβιοτικά προϊόντα.

•Πρόσθετες πηγές:

Regulation (EU) 2017/746 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, σχετικά με τα **διαγνωστικά προϊόντα in vitro**.

ISO 11133:2014, πρότυπο για την **προετοιμασία, παραγωγή και ποιοτικό έλεγχο των καλλιεργητικών μέσων**.

14. ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΑΤΑΣΚΕΥΑΣΤΗ IN VITRO



Γ. ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ & ΣΙΑ Ε.Ε.

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

Ποταμού 5 ΒΙΟ ΠΑ ΚΕΡΑΤΕΑΣ - ΑΤΤΙΚΗ ΤΚ 19001

Τ.Θ. 4893 - Τηλ.: 2299 0 66113 Φαξ: 2299 0 66112.

E-mail: bioprep1@otenet.gr www.bioprep1.gr

PRODUCT: **BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR**REFERENCE: **010872**

1. INTENDED USE

BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR is a selective and differential nutrient medium used for the cultivation, isolation, enumeration, and differentiation of Lactobacilli from clinical samples and food. The medium allows the distinction between Lactobacilli that produce hydrogen peroxide (H_2O_2) (blue colonies) and those that do not produce H_2O_2 (white colonies).

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Lactobacilli are Gram-positive, facultative anaerobic, or microaerophilic bacteria naturally found in various environments, including the gastrointestinal, oral, and vaginal microbiota of humans and animals. Lactobacilli play a crucial role in maintaining microbial balance, particularly in the gastrointestinal and vaginal microbiota. Some species produce hydrogen peroxide (H_2O_2), which helps:

- Inhibit pathogenic bacteria (e.g., *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*).
- Protect the vaginal microbiota by maintaining an acidic pH.
- Regulate gut health through immunomodulatory activity.

However, some strains of Lactobacilli do not produce H_2O_2 and may be associated with microbiota imbalance (dysbiosis), facilitating the growth of pathogenic microorganisms.

Classic Rogosa Agar is used for Lactobacilli isolation but does not differentiate strains based on H_2O_2 production.

The modification of BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR with TMB and Peroxidase allows visual differentiation of Lactobacilli:

- H_2O_2 -producing Lactobacilli oxidize TMB, turning their colonies blue.
- Non- H_2O_2 -producing Lactobacilli remain white, as they lack the enzymatic activity required for oxidation.

This differentiation is particularly useful in diagnostic tests, where H_2O_2 -positive Lactobacilli play a protective role in vaginal and gut health, as well as in food microbiology for monitoring the microbial composition of dairy products.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR is a selective and differential nutrient medium specifically designed for the cultivation, isolation, and color differentiation of Lactobacilli based on their ability to produce hydrogen peroxide (H_2O_2). Differentiation is achieved through the reaction: H_2O_2 + TMB via Peroxidase, which causes a blue coloration of the colonies, allowing visual distinction. For optimal Lactobacilli growth, BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR contains:

- Carbohydrates (Sucrose, Arabinose, Dextrose) as carbon and energy sources.
- Tryptone and yeast extract, which provide vitamins (mainly B), amino acids, and essential minerals.
- Sulfates ($FeSO_4$, $MnSO_4$, $MgSO_4$), crucial for the metabolic activity of Lactobacilli.

BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR has highly selective properties, ensuring the exclusive growth of Lactobacilli while preventing the development of unwanted microorganisms. Selectivity Mechanisms:

- Sodium acetate and ammonium citrate, which inhibit most Gram-negative bacteria, fungi, and streptococci.
- Low pH (~5.5), as Lactobacilli are acid-tolerant, whereas most other microorganisms cannot survive in acidic environments.
- Polysorbate 80 (Tween 80), which acts as a surfactant, neutralizing inhibitory substances such as phenols, hexachlorophene, and formalin.

Finally, bacteriological agar serves as the solidifying agent of the nutrient medium.

4. REAGENTS

FORMULA	g/litre
Enzymatic Digest of Casein	10,0
Yeast extract	5,0
Dextrose	20,0
Sodium Acetate	25,0
Ammonium Citrate	2,0
Monopotassium Phosphate	6,0
Magnesium Sulfate	0.575
Manganese Sulfate	0,12
Ferrous Sulfate	0.034
Polysorbate 80	1,0
TMB & Peroxidase	0,3
Agar	15,0

Appearance: Slightly cloudy, yellowish greenish, possibly with crystals.

Final pH $5,5 \pm 0,1$ στους $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR is an in vitro laboratory diagnostic material that must be handled exclusively by trained laboratory personnel. This medium contains peptones and extracts of animal origin. While certification regarding the origin and health status of the animals is provided, it does not fully guarantee the absence of transmissible pathogens. For this reason, it is recommended that these materials be treated as potentially infectious and handled with standard safety precautions (avoiding ingestion or inhalation). The handling of plates should always be done with gloves and within a Laminar Flow Class II cabinet to prevent contamination, particularly from saprophytic fungi. BIOCHROM ROGOSA AGAR plates are ready to use and do not require further processing before use. Prior to use, inspect the plates for possible defects such as dehydration, cracks, or contamination. If white spots appear on the surface due to crystallized bile salts, they do not affect the performance of the medium and will dissolve after incubation. In case of skin contact, wash immediately with plenty of water and soap. Positive samples must be disposed of according to hygiene regulations for the management of infectious specimens.

6. STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The plates should be stored at **2 – 12 °C** in their original packaging until use. Even momentary freezing can damage the medium. Avoid exposure to light and humidity, as this may affect the stability of TMB and Peroxidase. Excessive heating should also be avoided. The plates can be used until the expiration date indicated on the label. Stability studies have shown that for transport, the plates can remain at **6 - 25 °C** for up to **3 days** or at **25 - 40 °C** for up to **24 hours** without affecting product performance.

7. USAGE PROCEDURE

The cultivation and analysis of samples on BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR require careful steps to ensure reliable results.

7.1 Plate Preparation:

Allow the plates to equilibrate to room temperature (20-25°C) for 30 minutes before inoculation.

This prevents moisture condensation on the plate lid, which could affect colony growth.

Inoculation of the Sample:

Dip a sterile swab into the sample.

Streak the sample onto the agar surface in successive zones to gradually dilute the bacterial load.

Rotate the plate 90° and repeat the streaking 2-3 times with a new sterile swab.

Close the plate and incubate at 35 ± 2°C for 24-48 hours under microaerophilic conditions.

8. READING AND INTERPRETATION OF RESULTS

After incubation, colonies are assessed macroscopically by observing their color and morphological characteristics: H₂O₂-producing Lactobacilli: These colonies oxidize TMB, resulting in a blue coloration. These strains are considered protective. Non-H₂O₂-producing Lactobacilli: These colonies remain white, as they lack the enzymatic activity required for oxidation. These strains are considered potentially harmful.

9. QUALITY CONTROL

Bioprepure ensures the quality of each commercially produced culture medium by performing quality control tests using appropriate microbial strains and quality specifications, as detailed in the Certificates of Analysis (CoA).

Microorganism	Incubation Conditions	Growth - Colony Color
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	44-48 hours at 35-37°C, microaerophilic conditions	Good growth, whitish, medium-sized, glossy colonies.
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 7830	44-48 hours at 35-37°C, microaerophilic conditions	Good growth, whitish, slightly convex, glossy colonies.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> CS1/2	44-48 hours at 35-37°C, microaerophilic conditions	Good growth, blue colonies (H ₂ O ₂ positive)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	44-48 hours at 35-37°C, microaerophilic conditions	No growth
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	44-48 hours at 35-37°C, microaerophilic conditions	No growth



Lactobacillus acidophilus CS1/2



Lactobacillus delbrueckii ATCC 7830

10. LIMITATIONS OF THE METHOD

In some cases, the blue coloration may be weak, especially when the production of H₂O₂ is low. If there is no growth on the plate, it is likely that the sample does not contain Lactobacilli or has a high concentration of inhibitory factors. If confirmation of Lactobacillus identification is required, additional tests can be performed:

- ✓ Gram Staining: Lactobacilli are Gram-positive and appear as rods.
- ✓ Catalase (-) Test: Lactobacilli are catalase-negative (they do not produce bubbles with hydrogen peroxide).
- ✓ Biochemical tests: To confirm species identity through sugar metabolism.

11. DISPOSAL OF MATERIALS IN WASTE

Materials that show no growth may be considered non-hazardous waste and disposed of accordingly. Materials that show colony growth must be disposed of following guidelines for infectious or potentially infectious waste. The laboratory is responsible for the proper management of infectious waste according to its nature and degree of hazard and must manage and dispose of (or assign the management and disposal of) the waste according to the applicable regulations.

12. SPECIFICATIONS

ITEM	CODE	PACKAGE	STORAGE	SHELF LIFE
BIOCHROM LACTOBACILLUS AGAR	010872	2 x 5 petri dishes 9cm in a box of 10 pieces	2 – 12 °C	2 months

Produced in Greece by the company Bioprep in accordance with the requirements of the European Directive 2017/746.

BASIC UDI-DI: 5212037714010401WF. EDMA (14 01 04 01) non-chromogenic media (Plates).

The Bioprep company has been certified according to the standards: EN ISO 9001:2015 / EAOT EN ISO 13485:2016 DY8d/1348/2004

13. LITERATURE REFERENCES

Rogosa, M., Mitchell, J. A., Wiseman, R. F. (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *Journal of Dental Research*, 30(5), 682-689.

The original publication for Rogosa agar, designed for the selective isolation of lactobacilli from fecal and oral microbiota samples.

De Man, J. C., Rogosa, M., Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130-135.

Introduction of MRS agar, a medium widely used for the cultivation of lactobacilli and comparison with Rogosa agar.

Ouwehand, A. C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 279-289.

A review of the importance of probiotic bacteria, including lactobacilli, and their role in human health.

Kullen, M. J., & Klaenhammer, T. R. (1999). Genetics and genomics of *Lactobacillus acidophilus*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 131-144.

Genetic and functional analysis of *Lactobacillus acidophilus*, a key probiotic bacterium.

Reuter, G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 2(2), 43-53.

Analysis of the intestinal microbiota and the significance of lactobacilli in digestive system health.

Hamilton-Miller, J. M. T., Gibson, G. R., & Bruck, W. (2003). Some insights into the derivation and early uses of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 90(6), 845-852.

Historical review of the discovery and use of probiotics, focusing on lactobacilli.

Collins, M. D., & Gibson, G. R. (1999). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 1052S-1057S.

Reference to the role of lactobacilli and other probiotic bacteria in regulating intestinal flora.

Hsieh, C. Y., Osaka, T., Moriyama, E., Date, Y., Kikuchi, J., & Tsuneda, S. (2015). Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiological Reports*, 3(3), e12327.

Reference to the role of lactobacilli and bifidobacteria in maintaining the integrity of the intestinal barrier.

Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., & Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction*, 16(9), 1809-1813.

Research on the role of lactobacilli in regulating vaginal pH through the production of lactic acid.

Molin, G. (2001). Probiotic bacteria: interactions with the human host. *Food & Nutrition Research*, 45(1), 13-17.

Overview of the interactions between lactobacilli and the human body, with emphasis on probiotic products.

• Additional sources:

Regulation (EU) 2017/746 of the European Parliament and Council, on in vitro diagnostic devices.

ISO 11133:2014, standard for the preparation, production, and quality control of culture media.

14. MANUFACTURER DETAILS IN VITRO



G. PAPANIKOLAOU & CO

PRODUCTION LABORATORIES OF CULTURE MEDIA

Potamou 5, Industrial Area Keratea, Attica

P.O. Box: 4893, Postal Code: 9001 - Tel: +30 2299066113. Fax: +30 2299066112

E-mail: bioprep1@otenet.gr

www.bioprep.gr