

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ**

ΠΡΟΪΟΝ: **CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR**
ΚΩΔΙΚΟΣ: **020140**



Ημ. 1^{ης} Έκδοσης:

7ος 2009

Ημ. 4^{ης} Αναθεώρησης:

6ος 2024

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Διχοτομημένο τρυβλίο CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR για την καλλιέργεια μικροβίων με ειδικές τροφικές απαιτήσεις, όπως *Αιμόφιλος*, *Ναϊσσέριες*. (CHOCOLATE AGAR) – και για την Εκλεκτική απομόνωση της *Gardnerella vaginalis* (GARDNERELLA AGAR).

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Το Chocolate Agar είναι ένα εμπλουτισμένο υπόστρωμα για ποιοτικές διαδικασίες, για την απομόνωση και καλλιέργεια παθογόνων μικροοργανισμών, ιδιαίτερα της *Ναϊσσέριας* και των ειδών του *Αιμόφυλου* από ποικιλία κλινικών δειγμάτων.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
CHOCOLATE AGAR	
Columbia Peptone Mixture	23.0
Corn Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar No. 2	12.0
Horse Blood	60ml

Εμφάνιση: Καφέ – σοκολατί μη διαυγές, λόγω της προσθήκης του αίματος.

Τελικό pH 7.3 ± 0.2 στους 25 °C

Το GARDNERELLA AGAR είναι εκλεκτικό θρεπτικό υλικό το οποίο χρησιμοποιείται για την απομόνωση της *Gardnerella vaginalis*. Το *Gardnerella* Agar επωάζεται σε 10% CO₂. Το Columbia base είναι μια φόρμουλα αρκετά πλούσια σε θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για την ανάπτυξη απαιτητικών βακτηρίων. Τα ένζυμα των πεπτονών της καζείνης, του κρέατος και το εκχύλισμα βοός, προσφέρουν τα απαραίτητα αμινοξέα και άλλα αζωτούχα σύμπλοκα. Το εκχύλισμα ζύμης κυρίως προσφέρει την βιταμίνη B. Το άμυλο αραβοσίτου συντελεί στην ουδετεροποίηση των λιπαρών οξέων, τα οποία μπορεί να παίζουν τοξικό ρόλο για την *G. Vaginalis*. Το NaCl διατηρεί την ωσμωτική ισορροπία. Η κολλιστίνη το ναλιδιξικό οξύ και η αμφοτερισίνη-B προστίθενται στο υλικό προκειμένου να διευκολύνουν την εκλεκτική ανάπτυξη της *G. vaginalis* από κλινικά δείγματα. Η κολλιστίνη και το ναλιδιξικό οξύ αναστέλλουν τα περισσότερα gram(-) βακτήρια ενώ η αμφοτερισίνη-B αναστέλλει τους περισσότερους μύκητες. Η προσθήκη αίματος αλόγου βοηθάει στην θρεπτικότητα του μέσου αλλά και στην ταυτοποίηση της *G. Vaginalis* λόγω της β-αιμόλυσης στα ερυθρά.

ΣΥΝΘΕΣΗ	g/litre
GARDNERELLA AGAR	
Peptone Mixture	20.0
Beef Extract	3.0
Corn Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Bacteriological Agar	15.0
Horse Blood	100ml
Colistin	10mg
Nalidixic acid	15mg
Amphotericin B	3mg

Εμφάνιση: Κόκκινο – βυσσινί μη διαυγές, λόγω της προσθήκης του αίματος.

Τελικό pH 7.3 ± 0.2 στους 25 °C.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA 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 υγιεινολογική 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. Εάν το τρυβλίο είναι ραγισμένο ή το σακουλάκι τρύπιο, μη το χρησιμοποιήσετε. Μη χρησιμοποιείτε τα τρυβλία εάν παρουσιάζουν ενδείξεις μικροβιακής μόλυνσης. Το πάχος του άγαρ πρέπει να είναι 4 - 5 mm και το υλικό χωρίς ρωγμές, ξηρότητα ή άλλα σημεία αλλοίωσης. Μετά την ημερομηνία λήξεως το υλικό είναι ακατάλληλο για χρήση. 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.

ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Τα τρυβλία πρέπει να φυλάσσονται στους 2 – 12 °C μέσα στη συσκευασία τους μέχρι τη στιγμή της χρήσης τους. Παρατεταμένη φύλαξη σε θερμοκρασία κάτω των 2 °C δημιουργεί αρκετή υγρασία μέσα στο υλικό με κίνδυνο επιμόλυνσης. Η κατάψυξη ακόμα και στιγμιαία, καταστρέφει το υλικό. Επίσης 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 4 ημέρες ή στους 25 - 40 °C για 48 ώρες, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Εμβολιάστε και διασπείρετε το δείγμα όσο το δυνατό συντομότερα μετά την παραλαβή του από το εργαστήριο. Εναλλακτικά, εφόσον το δείγμα πρόκειται να καλλιεργηθεί μετά από λήψη με στυλεό, η διαδικασία που μπορεί να ακολουθηθεί είναι η εξής:

- 1) Περάστε τον στυλεό πάνω στο άγαρ διαγράφοντας στην επιφάνειά του ένα μεγάλο Z. Με τον τρόπο αυτό αφήνεται, για ικανοποιητικό χρόνο έκθεσης ο στυλεός στο θρεπτικό μέσο επιτυγχάνοντας καλύτερη μεταφορά των μικροοργανισμών.
- 2) Διασπείρεται το υλικό με τη βοήθεια αποστειρωμένου κρίκου και με διεύθυνση σταυρωτή στο αρχικό Z. Η διαδικασία αυτή είναι προτιμότερο να γίνεται με τη λήψη δείγματος. Αν βέβαια δεν έχει γίνει τότε λαμβάνει χώρα στο εργαστήριο.
- 3) Τοποθετήστε τις καλλιέργειες όσο το δυνατό συντομότερα σε αερόβιο περιβάλλον εμπλουτισμένο με 10% CO₂.
- 4) Επώαστε στους 35-37 °C και εξετάστε τις καλλιέργειες μετά από ολονύχτια επώαση, σε πρώτη φάση και μετά από περίπου 48 ώρες σε τελική φάση.
- 5) Ανακαλλιεργείστε για ταυτοποίηση της *N. gonorrhoeae* μέσα στο διάστημα των επόμενων 18-24 ωρών.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

CHOCOLATE AGAR:

Ο *Haemophilus influenzae* σχηματίζει αποικίες μικρές, υγρές, με ελαφριά οσμή.

Ο *Streptococcus pneumoniae* σχηματίζει αποικίες μικρές, επίπεδες, που εμφανίζουν πράσινο χρώμα.

Η *Neisseria meningitidis* σχηματίζει μεγάλες αποικίες, χρώματος γκρι, μπλέ.

Η *Neisseria gonorrhoeae* σχηματίζει μικρές, γκρι, λευκές, άχρωμες, βλεννώδης αποικίες.

GARDNERELLA AGAR:

Η *Gardnerella vaginalis* σχηματίζει μικρές, γκρι, λευκές, αποικίες με β-αιμόλυση.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η τελική ταυτοποίηση πρέπει να γίνεται με βιοχημικούς και ορολογικούς ελέγχους. (π.χ., δοκιμή συγκόλλησης Latex Test και μπορεί να εκτελούνται απευθείας από τις ύποπτες αποικίες.

ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

CHOCOLATE AGAR

Μικρόβιο	ATCC	Αποικίες
<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	Μικρές, υγρές, με ελαφριά οσμή.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Μικρές, επίπεδες, που εμφανίζουν πράσινο χρώμα.
<i>Neisseria meningitidis</i>	13090	Μεγάλες αποικίες, χρώματος γκρι, μπλέ.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43069	Μικρές, γκρι, λευκές, άχρωμες, βλεννώδης.



Haemophilus influenzae ATCC 10211

GARDNERELLA AGAR

Μικρόβιο	ATCC	Ανάπτυξη	Αιμόλυση
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14018	Άριστη	βήτα
<i>Candida albicans</i>	10231	Αναστέλλεται	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Αναστέλλεται	-



Gardnerella vaginalis ATCC 14018

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.

ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ

CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR – **CE**

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο διχοτομημένο 9cm	020140	10 τεμάχια	2 – 12 °C	2 μήνες

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

ΒΑΣΙΚΟ UDI-DI: 5212037714010490X8. EDMA: (14 01 04 90) Other Prepared Media in Plates.

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

CHOCOLATE AGAR

Sng, E.H., Rajan, V.S., and Lim, A.L. (1977) Simplified media for isolating *Neisseria gonorrhoeae* J. Clin. Microbiol., 5 (4), 387.

Sottnek, F. O., Biddle, J. W., Kraus, S. J., Weaver, R. E., And Stewart, J. A. (1980) Isolation and Identification of *Haemophilus ducreyi* in a clinical study. J. Clin. Microbiol., 12 (2), 170.

Lewis, J. S., and Wiesner, P.J. (1980) Gonorrhea: Current laboratory methods. Lab. Management, Sept., p.33.

GARDNERELLA AGAR

Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E and Vasi, F. (1966). A new culture medium for medical bacteriology. Amer. J. Clin Pathol., 45:502-504.

Goldberg, R.L., and Washington, J.A., (1976). Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from m Peptone-Starch-Dextrose Agar and Columbia Colistin-Nalidixic Acid Agar. J. Clin. Microbiol., 4:245-247.

Thayer, D.D. and Martin, H. E. (1966). An improved medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Publ. Hlth. Report, 81:559-562.

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.bioprepere.gr

**TECHNICAL DATA SHEET**

PRODUCT: **CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR**
 REFERENCE: **020140**



Date 1st Edition:
 7th 2009
 Date 4th Revision:
 6th 2024

DESCRIPTION

A bifurcated Chocolate Agar – Gardnerella Agar plate for the cultivation of bacteria with specific nutritional requirements, such as *Haemophilus* and *Neisseria* (Chocolate Agar), and for the selective isolation of *Gardnerella vaginalis* (Gardnerella Agar).

PRINCIPLE OF THE METHOD

Chocolate Agar is an enriched medium used for qualitative procedures in the isolation and cultivation of pathogenic microorganisms, particularly *Neisseria* and *Haemophilus* species, from various clinical samples.

FORMULA	g/litre
CHOCOLATE AGAR	
Columbia Peptone Mixture	23.0
Corn Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Agar No. 2	12.0
Horse Blood	60ml

Appearance: Brown–chocolate, opaque due to the addition of blood.

Final pH 7.3 ± 0.2 at 25 °C

GARDNERELLA AGAR is a selective nutrient medium used for the isolation of *Gardnerella vaginalis*. It is incubated in 10% CO₂. The Columbia base is a nutritionally rich formula essential for the growth of fastidious bacteria. The enzymatic digests of casein, meat, and beef extract provide the necessary amino acids and other nitrogenous compounds. Yeast extract mainly supplies vitamin B. Cornstarch helps neutralize fatty acids, which may have a toxic effect on *G. vaginalis*. Sodium chloride (NaCl) maintains osmotic balance. Colistin, nalidixic acid, and amphotericin B are added to the medium to promote the selective growth of *G. vaginalis* from clinical samples. Colistin and nalidixic acid inhibit most Gram-negative bacteria, while amphotericin B suppresses most fungi. The addition of horse blood enhances the medium's nutritional quality and aids in the identification of *G. vaginalis* due to its β -hemolysis on red blood cells.

FORMULA	g/litre
GARDNERELLA AGAR	
Peptone Mixture	20.0
Beef Extract	3.0
Corn Starch	1.0
Sodium chloride	5.0
Bacteriological Agar	15.0
Horse Blood	100ml
Colistin	10mg
Nalidixic acid	15mg
Amphotericin B	3mg

Appearance: Red–burgundy, opaque due to the addition of blood.

Final pH 7.3 ± 0.2 at 25 °C.

PRECAUTIONS

CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR is an in-vitro laboratory diagnostic material and should only be handled by qualified people in the laboratory. This material contains peptones and extracts of animal origin. The certificates regarding the origin and health status of the animals do not fully guarantee the absence of transmissible pathogens. For this reason, it is recommended that these materials be treated as potentially infectious, with the usual safety precautions (avoiding ingestion or inhalation). Plates should always be handled with gloves and in Laminar flow Class II, to avoid contamination mainly by saprophytic fungi. If the plate is cracked or the bag has a hole, do not use it. Do not use petri dishes if there are signs of microbial contamination. The thickness of the agar must be 4 - 5 mm and the material without cracks, dryness or other signs of deterioration. After the expiry date the material is unfit for use. In case of contact with the skin, wash immediately with plenty of water and soap. Positive samples must be destroyed according to the hygienic rules prescribed for the management of contaminated samples.

STORAGE AND TRANSPORT CONDITIONS

The plates should be stored at **2–12°C** in their packaging until use. Prolonged storage below **2°C** can create excessive moisture within the medium, increasing the risk of contamination. Freezing, even momentarily, destroys the medium. Excessive heating should also be avoided. The plates can be used until the expiration date indicated on the label. For transport, stability studies have shown that the plates can remain at **6–25°C** for up to **4 days** or at **25–40°C** for up to **48 hours** without affecting product performance.

USAGE INSTRUCTIONS

Inoculate and spread the sample as soon as possible after receiving it in the laboratory. If the sample is collected using a swab and will be cultured later, follow these steps:

1. Swab Streaking: Glide the swab over the agar surface in a large "Z" pattern. This allows sufficient exposure time for the swab to transfer microorganisms effectively to the nutrient medium.
2. Streaking for Isolation: Use a sterile loop to spread the material in a cross-streak pattern over the initial "Z". This step is preferably performed at the time of sample collection. If not, it should be done in the laboratory.
3. Incubation Setup: Place the cultures as soon as possible in an aerobic environment enriched with 10% CO₂.
4. Incubation Conditions: Incubate at 35–37°C and examine the cultures after overnight incubation (first phase) and again at approximately 48 hours (final phase).
5. Subculturing for Identification: Re-culture to identify *Neisseria gonorrhoeae* within 18–24 hours after the initial incubation.

INTERPRETATION OF RESULTS

CHOCOLATE AGAR:

Haemophilus influenzae: Forms small, moist colonies with a slight odor.

Streptococcus pneumoniae: Forms small, flat colonies with a greenish color.

Neisseria meningitidis: Forms large colonies with a gray-blue color.

Neisseria gonorrhoeae: Forms small, gray, white, colorless, mucous-like colonies.

GARDNERELLA AGAR:

Gardnerella vaginalis: Forms small, gray, white colonies with β -hemolysis.

LIMITATIONS OF THE METHOD

Final identification should be confirmed using biochemical and serological tests (e.g., Latex Agglutination Test), which can be performed directly on suspected colonies.

QUALITY CONTROL

CHOCOLATE AGAR

Microorganism	ATCC	Colonies
<i>Haemophilus influenzae</i>	10211	Small, moist, with a slight odor.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6305	Small, flat, with a greenish color.
<i>Neisseria meningitidis</i>	13090	Large colonies, gray-blue in color.
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	43069	Small, gray, white, colorless, mucous-like.



Haemophilus influenzae ATCC 10211

GARDNERELLA AGAR

Microorganism	ATCC	Growth	Hemolysis
<i>Gardnerella vaginalis</i>	14018	Excellent	B
<i>Candida albicans</i>	10231	Inhibited	-
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	Inhibited	-



Gardnerella vaginalis ATCC 14018

WASTE DISPOSAL OF WASTE

Materials that show no growth can be considered as non-hazardous waste and disposed of accordingly. Materials that show colony growth must be disposed of according to the guidelines for infectious or potentially infectious waste. The laboratory is responsible for the proper management of infectious waste according to its nature and level of risk and must handle and dispose of it (or assign its management and disposal) in compliance with the applicable regulations.

SPECIFICATIONS

CHOCOLATE AGAR – GARDNERELLA AGAR – 

ITEM	CODE	PACKAGE	STORAGE	SHELF LIFE
Bi - plate 9cm	020140	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 / EN ISO 13485:2016 DY8d/1348/2004

LITERATURE REFERENCES

CHOCOLATE AGAR

Sng, E.H., Rajan, V.S., and Lim, A.L. (1977) Simplified media for isolating *Neisseria gonorrhoeae* J. Clin. Microbiol., 5 (4), 387.

Sottnek, F. O., Biddle, J. W., Kraus, S. J., Weaver, R. E., And Stewart, J. A. (1980) Isolation and Identification of *Haemophilus ducreyi* in a clinical study. J. Clin. Microbiol., 12 (2), 170.

Lewis, J. S., and Wiesner, P.J. (1980) Gonorrhea: Current laboratory methods. Lab. Management, Sept., p.33.

GARDNERELLA AGAR

Ellner, P.D., Stoessel, C.J., Drakeford, E and Vasi, F. (1966). A new culture medium for medical bacteriology. Amer. J. Clin Pathol., 45:502-504.

Goldberg, R.L., and Washington, J.A., (1976). Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginale*) from Peptone-Starch-Dextrose Agar and Columbia Colistin-Nalidixic Acid Agar. J. Clin. Microbiol., 4:245-247.

Thayer, D.D. and Martin, H. E. (1966). An improved medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Publ. Hlth. Report, 81:559-562.

IN VITRO MANUFACTURER'S DATA



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