

**ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ**

ΠΡΟΪΟΝ: **Non-Nutrient Agar (Page Amoeba Saline)** 
(NN Agar)

ΚΩΔΙΚΟΣ: **010392**



Ημ. 1^{ης} Έκδοσης:
7ος 2009
Ημ. 4^{ης} Αναθεώρησης:
6ος 2025

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Ένα μη-θρεπτικό μέσο για την καλλιέργεια της *Ακανθαμοιβάδας*.

ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η καλλιέργεια είναι η κύρια διαγνωστική μέθοδος. Βγαίνει συχνότερα θετική από ότι η μικροσκοπική εξέταση. Η τεχνική της στηρίζεται στην ιδιότητα της αμοιβάδας αυτής όπως και των άλλων αμοιβάδων που αναπτύσσονται παρουσία μικροβίων (*E. coli*, *E. aerogenes*) και σε βάρος αυτών. Η *Ακανθαμοιβάδα* αναπτύσσεται και χωρίς την παρουσία *E. coli*.

ΣΥΝΘΕΣΗ	
Sodium chloride(NaCl)	120mg
Magnesium sulphate(MgSO ₄ .7H ₂ O)	4mg
Calcium chloride(CaCl ₂ .2H ₂ O)	4mg
Disodium hydrogen phosphate(Na ₂ HPO ₄)	142mg
Potassium dihydrogen phosphate(KH ₂ PO ₄)	136mg
Distilled Water	1000ml
Bacteriological Agar	15g

Εμφάνιση: Μπεζ ανοιχτό διαυγές

Τελικό pH 7,0 ± 0.2 στους 25 °C.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Το Non Nutrient Agar είναι in vitro εργαστηριακό διαγνωστικό υλικό και πρέπει να χειρίζεται μόνο από εξειδικευμένα άτομα του εργαστηρίου. 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

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 αποφεύγετε την υπερβολική θέρμανση. Τα τρυβλία είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν μέχρι την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Εάν ανοίξετε την αεροστεγή συσκευασία του τρυβλίου κατά λάθος, μπορείτε να το φυλάξετε στο ψυγείο για **5 – 7 μέρες** αφού το σφραγίσετε με παραφίλμ ή με σακουλάκι. Για την μεταφορά οι μελέτες σταθερότητας μας έδειξαν ότι τα τρυβλία μπορούν να παραμείνουν στους **17 - 25 °C** για **7 ημέρες** ή στους **27 - 40 °C** για **48 ώρες**, χωρίς να επηρεαστεί η απόδοση του προϊόντος.

ΤΡΟΠΟΣ ΧΡΗΣΗΣ

Παρασκευάζουμε ένα παχύ εναιώρημα *E. coli* σε 0,5ml buffer page. Τοποθετούμε δύο έως τρεις σταγόνες του εναιωρήματος στο κέντρο ενός τρυβλίου Non Nutrient Agar και απλώνονται σε όλη την επιφάνεια του άγαρ. Στη συνέχεια τοποθετούμε 1-2 σταγόνες του εξεταστέου δείγματος στο κέντρο του άγαρ. Επωάζουμε το τρυβλίο στους 35 - 37 °C χωρίς να το αναστρέψουμε μέχρι και 7 ημέρες.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Ανάγνωση: Το τρυβλίο μικροσκοπείται καθημερινά με τον ξηρό φακό μικρής μεγέθυνσης (10 x 10) επί 7 ημέρες. Όλη η επιφάνεια του τρυβλίου πρέπει να είναι σκεπασμένη με ένα συνεχές λεπτό στρώμα από το εναιώρημα της *E. coli*. Αν στο εξεταστέο δείγμα υπάρχει *Ακανθαμοιβάδα* αυτή θα έχει προχωρήσει από εκεί που αφήσαμε το εξεταστέο σχηματίζοντας διαφανές αυλάκι που δείχνει την πορεία της. Στο άκρο της αυλάκας θα δούμε ένα διαθλαστικό σωματίο που είναι η *Ακανθαμοιβάδα*. Με τον μαρκαδόρο σημειώνουμε το σημείο όπου εντοπίσαμε την αμοιβάδα για να κάνουμε την ανακαλλιέργεια. Ανακαλλιέργεια: Με ένα μαχαιράκι κόβουμε το κομμάτι του άγαρ που σημειώσαμε και το τοποθετούμε με την καλλιεργημένη όψη σε επαφή με την επιφάνεια του νέου Non Nutrient Agar. Επωάζουμε και εξετάζουμε όπως εξηγήσαμε πιο πάνω. Παρατηρούνται *Ακανθαμοιβάδες* σε όλη την έκταση του τρυβλίου μετά από 24 ώρες. Μετά από 2 έως 3 ημέρες επώασης στους 37 °C αρχίζει η εγκύτωση. Μετά από 4-5 ημέρες βλέπουμε ταυτόχρονα τροφοζώιτες και κύστει. Οι κύστει αναπτύσσονται όταν αρχίζουν να λιγοστεύουν οι *E. coli*.



Acanthamoebae trophozoites.



Acanthamoebae cysts.

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

Non Nutrient Agar (Page Amoeba Saline) (NN Agar)

ΕΙΔΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΥΣΚΕΥΑΣΙΑ	ΦΥΛΑΞΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΖΩΗΣ
Τρυβλίο 90mm	010392	10 τεμάχια	2 – 12 °C	5 μήνες

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

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

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

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Κλινική Μικροβιολογία & εργαστηριακή διάγνωση λοιμώξεων. Αντιγόνη Αρσένη. Τόμος 2. Σελ. 982-985. *Acanthamoeba* spp. ATCC Medium 1323 Page's Amoeba Saline, Page, f.c.1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside. Practical's & Viva in Medical Parasitology by Sehgal-2003.

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.bioprepare.gr

PRODUCT: **Non-Nutrient Agar (Page Amoeba Saline)**
(NN Agar)
REFERENCE: **010392**



Date 1st Edition:
7th 2009
Date 4th Revision:
6th 2025

DESCRIPTION

A non-nutrient medium for the cultivation of Acanthamoeba.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Culture is the primary diagnostic method and tends to yield positive results more frequently than direct microscopic examination. The technique is based on the ability of this amoeba, like other amoebae, to grow in the presence of bacteria (e.g., *E. coli*, *E. aerogenes*) and to feed them. *Acanthamoeba* can also grow in the absence of *E. coli*.

COMPOSITION	
Sodium chloride(NaCl)	120mg
Magnesium sulphate(MgSO ₄ .7H ₂ O)	4mg
Calcium chloride(CaCl ₂ .2H ₂ O)	4mg
Disodium hydrogen phosphate(Na ₂ HPO ₄)	142mg
Potassium dihydrogen phosphate(KH ₂ PO ₄)	136mg
Distilled Water	1000ml
Bacteriological Agar	15g

Appearance: Light beige, clear

Final pH 7,0 ± 0.2 at 25 °C.

PRECAUTIONS

Non-Nutrient Agar is an in vitro diagnostic laboratory material and must be handled only by trained laboratory personnel. All manipulations involving the plates should be performed wearing gloves and under a Class II Laminar Flow Hood to prevent contamination, especially from saprophytic fungi. Do not use plates that are cracked or whose packaging is punctured. Plates showing signs of microbial contamination should not be used. The agar thickness should be 4–5 mm, and the surface must be free of cracks, dryness, or other signs of deterioration. After the expiration date, the medium is no longer suitable for use. In case of skin contact, wash immediately with plenty of water and soap. Positive samples must be disposed of according to established biohazard waste management protocols.

STORAGE CONDITIONS

Plates must be stored at **2–12 °C** in their original packaging until use. Prolonged storage below **2 °C** may result in excessive moisture, increasing the risk of contamination. Freezing, even briefly, damages the product. Excessive heat should also be avoided. Plates can be used up to the expiration date stated on the label. If the airtight packaging is accidentally opened, the plate can be stored in the refrigerator for **5–7 days** if sealed with Parafilm or placed in a sealed bag. Stability studies have shown that the plates can remain at **17–25 °C** for **7 days** or at **27–40 °C** for **48 hours** during transport without affecting product performance.

INSTRUCTIONS FOR USE

Prepare a dense suspension of *E. coli* in 0.5 ml of Page's buffer. Place two to three drops of the suspension in the center of a Non-Nutrient Agar plate and spread evenly across the surface of the agar. Then add 1–2 drops of the test specimen onto the center of the agar. Incubate the plate at 35–37 °C, upright (do not invert), for up to 7 days.

INTERPRETATION OF RESULTS

Reading: Examine the plate daily under a low-power dry microscope objective (10 x 10) for 7 days. The entire surface of the plate should be covered with a uniform thin layer of the *E. coli* suspension. If *Acanthamoeba* is present in the specimen, it will have migrated from the site of inoculation, forming a clear track or groove that indicates its path. At the end of this track, a refractile body—representing the amoeba—will be visible. Mark the location with a marker to proceed with subculturing.

Subculturing: Using a sterile scalpel, cut out the marked piece of agar and place it face-down (culture side) onto the surface of a fresh Non-Nutrient Agar plate. Incubate and examine as described above.

Acanthamoebae are usually observed throughout the plate after 24 hours. After 2 to 3 days of incubation at 37 °C, encystment begins. By 4–5 days, both trophozoites and cysts can be observed. Cyst formation typically begins as the available *E. coli* becomes depleted.



Acanthamoebae trophozoites.



Acanthamoebae cysts.

DISPOSAL OF MATERIALS IN WASTE

Materials that show no growth can be considered non-hazardous waste and disposed of accordingly. Materials that show colony growth must be disposed of in accordance with 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 manage and dispose of (or assign the management and disposal of) it according to the applicable regulations.

SPECIFICATIONS

Non Nutrient Agar (Page Amoeba Saline) (NN Agar)

ITEM	CODE	PACKAGE	STORAGE	SHELF LIFE
Petri Dish 90mm	010392	10 pieces	2 – 12 °C	5 months

Manufactured in Greece by Bioprep in accordance with Regulation (EU) 2017/746. Basic UDI-DI: 5212037714010490X8 EDMA Code: (14 01 04 90) Other Prepared Media in Plates. Bioprep is certified under the following standards: EN ISO 9001:2015 / EΛOT EN ISO 13485:2016 / Ministerial Decision ΔΥ86/1348/2004.

REFERENCES

Clinical Microbiology & Laboratory Diagnosis of Infections, Antigoni Arsenis, Volume 2, pp. 982–985: *Acanthamoeba* spp.
 ATCC Medium 1323: Page's Amoeba Saline, Page, F.C., 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside.
 Practicals & Viva in Medical Parasitology by Sehgal, 2003.

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