

ΕΠΗΚΑΙΡΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ
ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
Listeria monocytogenes
ΚΑΤΑ

ISO 11290-1

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΔΥΤΙΚΗΣ ΑΤΤΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Υπό ασηπτικές συνθήκες λαμβάνουμε αντιπροσωπευτικό δείγμα
25 g



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

1ος ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

25 g δείγματος + 225 ml εμπλουτιστικού υγρού **Half Fraser (1/2 Fraser)**

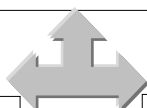
Η ανάμιξη γίνεται σε stomacher bag και η ομογενοποίηση σε
Stomacher για 1 min



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

1η ΕΠΩΑΣΗ

Οι σακκούλες Stomacher τοποθετούνται στον επωαστικό κλίβανο και παραμένουν στους
30°C / 24h



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

2ος ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ

0,1 ml του εμπλουτισμένου δείγματος
μεταφέρονται σε σωλήνες που περιέχουν
10 ml Fraser

**2η ΕΠΩΑΣΗ**

Οι σωλήνες επωάζονται
35-37°C / 48 h



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

2ο ΠΕΡΑΣΜΑ ΣΤΑ ΤΡΥΒΑΙΑ

Με κρίκο εμβολιασμού μεταφέρουμε από τον
2ο προεμπλουτισμό και απλώνουμε σε:

- ALOA agar
- PALCAM ή OXFORD agar



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

3η ΕΠΩΑΣΗ

Τα τρυβλία επωάζονται ως εξής:

- ALOA agar (30°C / 24 h)
- PALCAM ή OXFORD agar (30°C/ 24-48 h)

**2η ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ**

Όπως και η 1η απομόνωση



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

1ο ΠΕΡΑΣΜΑ ΣΤΑ ΤΡΥΒΑΙΑ

Με κρίκο εμβολιασμού μεταφέρουμε από τον
1ο προεμπλουτισμό και απλώνουμε σε:

- ALOA agar
- PALCAM ή OXFORD agar



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

2η ΕΠΩΑΣΗ

Τα τρυβλία επωάζονται ως εξής:

- OXFORD agar (30°C / 24 – 48 h)
- PALCAM agar (30°C / 24 – 48 h)



ΗΜΕΡΑ: ΩΡΑ:

1η ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ

- **ALOA agar:** Οι πιθανές (presumptive) αποικίες *L. monocytogenes* παρουσιάζονται ως γκρι-μπλε αποικίες με χαρακτηριστική διαυγή ζώνη γύρω τους.
- **PALCAM agar:** Στις 24 h οι αποικίες *Listeria* spp. έχουν γκριζο ή γκριζοπράσινο χρώμα με μαύρο περίγραμμα. Στις 48 ώρες οι αποικίες έχουν αποκτήσει πράσινο χρώμα με μαύρο περίγραμμα.

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ

Από το υπόστρωμα ALOA απομονώνονται 5 αποικίες οι οποίες θεωρούνται ως *Listeria monocytogenes*
 Από ένα από τα υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί (PALCAM ή OXFORD) απομονώνονται 5 αποικίες οι οποίες θεωρείται ότι ανήκουν στο είδος *Listeria*.
 Κάθε μια από τις αποικίες απλώνεται στο ακόλουθο υπόστρωμα και ακολουθεί ταυτοποίηση.

- TSYEA (Tryptone Soya Yeast Extract Agar)

**4η ΕΠΩΑΣΗ**

Τα τρυβλία TSAYE επώάζονται
35-37°C / 18-24 h

**ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΟ ΤΕΣΤ**

- Δοκιμή καταλάσης: Τα είδη *Listeria* είναι θετικά στην καταλάση

**ΒΑΣΙΚΑ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΤΕΣΤ**

- Δοκιμή αιμόλυσης: *L. monocytogenes* δίνει θετική δοκιμή (-)
- Αποικοδόμηση υδατανθράκων: Ραμνόζη, ξυλόζη (*L. monocytogenes*, αρνητικά και τα δύο).
- CAMP test

ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ**ΗΜΕΡΕΣ**

1η	2η	3η	4η	5η	6η	7η
Δειγματοληψία	-	-	→ Πέρασμα σε TSAYE	→ Πέρασμα σε TSAYE	→ Πέρασμα σε TSAYE	→ Πέρασμα σε TSAYE
1ος εμπλουτισμός	2ος εμπλουτισμός	→ 1η απομόνωση από ALOA PALCAM OXFORD	2η απομόνωση από PALCAM OXFORD	→ 1η απομόνωση από PALCAM OXFORD	2η απομόνωση από PALCAM OXFORD	
1η επώαση	2η επώαση 1ο πέρασμα σε τρυβλία		2ο πέρασμα σε τρυβλία			