

リステリア・モノサイトゲネスの定性試験(ステージ1：原案)NIHSJ-08-ST1
(ISO11290-1:1996/Amd.1 2004(E)を基礎とする)

1. 検体の調整

試料 25g にハーフフレーザーブイオン 225mL を加え、1 分間ストマッカー処理する。

2. 一次増菌培養

調整した検体を 30°C で 24±3 時間一次増菌培養する。

3. 二次増菌培養

一次増菌培養液 0.1mL をフレーザーブイオン 10mL に接種し、35°C 又は 37°C で 48±3 時間培養する。

4. 選択分離培養

① 2.の一次増菌培養液から、ALOA 培地とパルカム寒天培地又はオックスフォード寒天培地のうち 1 種類に、それぞれ 1 白金耳量を画線塗抹する。

② 3.の二次増菌培養液から、ALOA 培地とパルカム寒天培地又はオックスフォード寒天培地のうち 1 種類に、それぞれ 1 白金耳量を画線塗抹する。

③接種後、ALOA 培地は 37°C で 24±3 時間培養する。集落の形成が悪い場合は、更に 37°C ・ 24±3 時間培養する。リステリア・モノサイトゲネス(以下 Lm)の典型的集落は不透明なハローを伴った緑青色集落である。パルカム寒天培地及びオックスフォード寒天培地は 30°C 又は 35°C 又は 37°C で 24~48 時間培養する。パルカム寒天培地及びオックスフォード寒天培地上でのリステリア属菌の典型的集落は、黒色ハローを伴う灰緑色又はオリーブグリーン集落である。

5. 純培養

各選択分離培地に形成された典型的集落（各培地の判定方法を参照）を 5 個ずつ釣菌して、TSYEA 培地に画線塗抹し、35°C 又は 37°C で 18~24 時間培養する。

6. 同定試験

- (1) カタラーゼ試験：スライドガラスに滴下した 3%過酸化水素水に純培養した菌を懸濁させる。気泡が発生すれば陽性とする。
- (2) グラム染色：常法に従う。リステリア属菌はグラム陽性短桿菌である。
- (3) 糖発酵試験：TSYEA 培地より糖発酵試験培地(キシロース及びラムノース)に接種し、35℃又は 37℃で 5 日間培養する。陽性の場合にはほぼ 24~48 時間以内に培地が黄変する。Lm はラムノース陽性、キシロース陰性である。
- (4) CAMP テスト：CAMP テスト用培地に、*Staphylococcus aureus* 及び *Rhodococcus equi* を平行に画線塗沫する。次いで両菌株から 1~2mm 離して直交するように供試菌を画線塗沫する。同時にコントロールとして、*L.monocytogenes*、*L.innocua* 及び *L.ivanovii* の標準株を供試菌と同様に画線塗沫し、35℃又は 37℃で 12~18 時間培養する。塗沫線に沿って弱い β -溶血を示し、*S.aureus* の β -溶血部分で鮮明に増強されるものを Lm とする。
注：*L.innocua* には β -溶血は見られない。*L.ivanovii* は塗沫線に沿って幅広い β -溶血が見られ、*R.equi* の塗沫線近くで錨状に増強される。

