

リステリア・モノサイトゲネスの定量試験(ステージ1：原案)NIHSJ-09-ST1  
(ISO11290-2:1998/Amd.1 2004(E)を基礎とする)

1. 検体の調製

- ①試料 Xg をハサミ、ピンセットを用いて無菌的に採取する。ストマッカー袋に入れ、9倍量のサブプリメントを添加しないハーフプレーザーブイオン（又はBPW）を加え、1分間ストマッキング処理を行う。損傷菌の蘇生のため  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  で1時間 $\pm$ 5分置く。
- ②得られた懸濁液を10倍乳剤として菌分離に用いる。また、10倍乳剤の10段階希釈液（100倍、1,000倍）を作成する。

2. 選択分離培養

10倍乳剤1mLを分取後3枚のALOA培地において塗抹したものを2組作成する。また、10倍段階希釈液0.1mLをそれぞれ2枚のALOA培地に塗抹し、 $37^{\circ}\text{C}$ で $24 \pm 3$ 時間培養する。集落の形成が悪い場合は、更に $37^{\circ}\text{C}$ で $24 \pm 3$ 時間培養し、典型的集落数を計測する。リステリア・モノサイトゲネス(以下Lmとする)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。

3. 純培養

ALOA培地上に形成された典型的集落を2段階希釈分それぞれ5個ずつ釣菌して、TSYEA培地に画線塗抹し、 $35^{\circ}\text{C}$ 又は $37^{\circ}\text{C}$ で18~24時間培養する。

4. 同定

- (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、 $35^{\circ}\text{C}$ 又は $37^{\circ}\text{C}$ 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*を平行に画線塗抹する。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抹する。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抹し、 $35^{\circ}\text{C}$ 又は $37^{\circ}\text{C}$ で12~18時間培養する。塗抹線に沿って弱い $\beta$ -溶血を示し、*S.aureus*の $\beta$ -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 $\beta$ -溶血は見られない。*L.ivanovii*は塗抹線に沿って幅広い $\beta$ -溶血が見られ、*R.equi*の塗抹線近くで錨状に増強される。

