

取扱説明書

One Broth One Plate リステリア定性試験用培地（OBOP-L）

使用目的

One Broth One Plate リステリア定性試験用培地（OBOP-L）は、食品および環境検体中のリステリア属菌およびリステリア・モノサイトゲネスを 1 種類の増菌培地および 1 種類の分離培地を用いて迅速検出する試験法です。

製品概要と説明

1926 年に Murray、Webb、Swan によって初めて報告されたリステリア・モノサイトゲネスは、公衆衛生および食品産業において重要な危害菌の一つです。この微生物は特に免疫不全の人や妊婦の病気や死亡の原因となり、リステリア症のアウトブレイクに関する疫学的な調査結果では、主な感染経路はリステリア・モノサイトゲネスに汚染された食品の摂取であること、また原因食品としては、肉、卵、鶏肉、野菜、乳製品などが挙げられることが示されています。

リステリア属菌は、グラム陽性、無芽胞、微好気性、非莢膜性、非分岐性、運動性の短桿菌です。未加工の食品、土壌、下水、河川水など、自然界に広く存在しており、またリステリア属菌のいくつかの菌種は、乳製品の製造過程や熟成過程を生き延びることができます。また pH5.0～9.6 の範囲で増殖し、この範囲外の pH の食品でも生存できます。さらにリステリア属菌の運動性は 20 °C で顕著になります。

One Broth One Plate リステリア定性試験用培地は、ネオジェン独自の LESS Plus ブロスを増菌に使用し、食品および環境検体中においてリステリア属菌の優れた回収を実現します。続いて、ISO 11290-1:2017 に示される、食品および関連する材料からのリステリア・モノサイトゲネスの分離および推定に用いられる Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地（ALOA 寒天培地）を用いて、リステリア属菌およびリステリア・モノサイトゲネスを検出します。なお、リステリア属菌のみを検出する場合には、パルカム寒天培地を使用することも可能です。

対象使用者

この方法は適切なトレーニングを受けた技術者による使用を対象としています。

製品情報

製品名	形態	容量	カタログ製品番号
LESS Plus ブロス	粉末培地	500 g	NCM0202A
Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地（ALOA 寒天培地）	粉末培地	500 g	NCM1004A
		69.5 g	NCM1004S
ALOA 寒天培地リステリア検出用サプリメント	液体サプリメント	10 バイアル	NCM4001-0.5

ALOA 寒天培地リステリア 選択用サプリメント	粉末サプリメント	10 バイアル	NCM4002-0.5
-----------------------------	----------	---------	-------------

注：各サプリメントは、Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地（ALOA 寒天培地）500 mL に対して 1 バイアルを使用します

注：内容量の異なる製品もございます。個別にお問い合わせください

一般的な組成

組成、調製、品質管理用微生物、判定、保管方法の詳細につきましては、各製品の仕様書（Technical Specification Sheet、英文）をご覧ください。

LESS Plus プロス	g/L
ペプトン	15.0
緩衝剤	15.7
増殖促進剤	8.3
選択剤	5.0
pH	7.2±0.2 (25 °C)

Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地（ALOA 寒天培地）	g/L
動物組織酵素分解産物	18.0
カゼイン酵素分解産物	6.0
酵母エキス	10.0
ピルビン酸ナトリウム	2.0
ブドウ糖	2.0
グリセロリン酸マグネシウム	1.0
硫酸マグネシウム（無水）	0.5
塩化ナトリウム	5.0
塩化リチウム	10.0
リン酸水素二ナトリウム（無水）	2.5
5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-グルコピラノシド	0.05
寒天	12.5
pH	7.2±0.2 (25 °C)

必要な器具と材料の例

- ・ ストマッカーまたは同等品
- ・ 増菌用ストマッカー袋（フィルターバッグの使用を推奨）
- ・ メスシリンダー 250 mL 用
- ・ 精製水 1 L

準備

LESS Plus ブロス

LESS Plus ブロス (NCM0202) 44 g をあらかじめ 36 °C に温めた滅菌精製水 1 L に溶解します。もしくは、LESS Plus ブロス 44 g を未滅菌精製水に溶解し、110 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌します。

ALOA 寒天培地リステリア検出用サプリメント

使用する前に、リステリア診断用サプリメント (NCM4001-0.5) をあらかじめ 48～50 °C に加温します。

ALOA 寒天培地リステリア選択用サプリメント

1. リステリア選択用サプリメント (NCM4002-0.5) のバイアルのキャップとゴム栓を無菌的に取り外します。
2. 5 mL の滅菌精製水を加えます。
3. ゴム栓を再度取り付け、バイアルを穏やかに振とうもしくは反転させ、内容物を溶解させます。

Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地 (ALOA 寒天培地)

1. Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地 (ALOA 寒天培地) (NCM1004) 69.5 g を精製水 950 mL 加温溶解します。
2. 121 °C で 15 分間高圧蒸気滅菌します。
3. 45～50 °C に冷却します。
4. 培地 950 mL に対し、検出用サプリメント (NCM4001-0.5)、選択用サプリメント (NCM4002-0.5) をそれぞれ 2 バイアルずつ無菌的に加えます。
5. 穏やかに混合し、滅菌シャーレに注ぎます。

試験手順

1. 検体 X g をストマッカー袋に秤量します。
注：NF Validation では、最大 25 g の検体について試験が行われています。
2. 9 倍量 (9 x X mL) の LESS Plus ブロスを加え 10 倍に希釈します。(例：25 g もしくは 25 mL の検体に 225 mL の LESS Plus ブロスを加えます)
注：ふき取り検体の場合には、スワブを十分に覆う量のブロスを加えてください。
3. ストマッカーにてホモジナイズします。
注：試験を行う際に、検体を室温で 2 時間まで保持することが可能です。
4. ホモジナイズした試料液を 30±1 °C、25±3 時間 (リステリア属菌の試験) もしくは 30±1 °C、27±3 時間 (リステリア・モノサイトゲネスの試験) 培養します。
注：30 °C で増菌培養した LESS Plus ブロスは、2～8 °C で 72 時間まで保持することが可能です。
5. 増菌培養した LESS Plus ブロスを 0.1 mL (100 μL) 採取し、滅菌済みの白金耳を使用して選択分離培地 (ALOA 寒天培地) に画線塗抹します。塗抹方法は、次ページの試験フローの図を参照してください。
6. ALOA 寒天培地を 37±2 °C で培養し、24 時間から 48 時間の間に判定します。24 時間の段階で判定した後、48 時間まで培養を継続する必要はありません。
注：培養後、判定および確認試験の前に 2～8 °C で 72 時間まで冷蔵保管することが可能です。

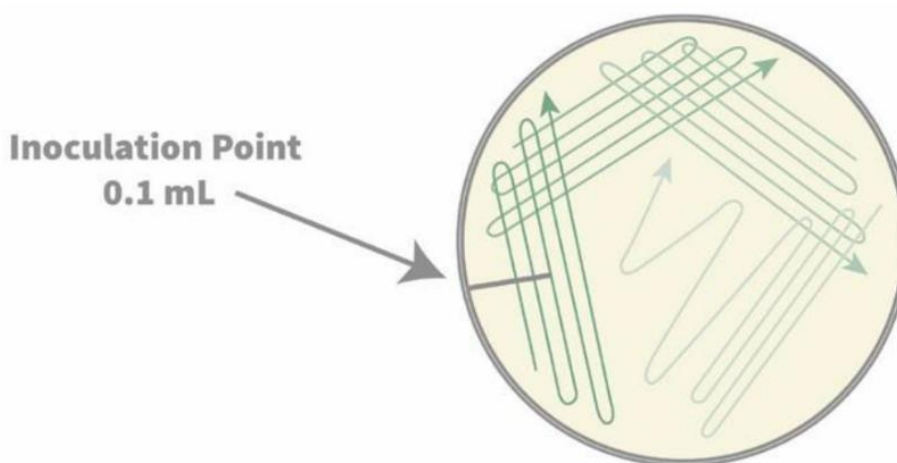
注：リステリア属菌の試験では、選択分離培地としてパルカム寒天培地を使用することも可能です。その場合には 48 時間まで培養を継続して最終判定を行ってください。またパルカム寒天培地では、*B. cereus*、*Enterococci*、*Staphylococcus* のような一部の微生物が灰色から緑色のコロニーを形成することがあります。NF Validation に従う場合には確認試験を実施してください。

試験フロー

X g もしくは X mL の検体に 9 倍量 ($9 \times X$ mL) の LESS Plus ブロスを加え、 30 ± 1 °C にて、リステリア属菌の試験では 25 ± 3 時間、リステリア・モノサイトゲネスの試験では 27 ± 3 時間培養します。



1 枚の ALOA 寒天培地に 0.1 mL (100 μ L) を画線塗抹し、 37 ± 2 °C で 24 時間培養します。(48 時間まで延長可能)



必要に応じてリステリア・モノサイトゲネス（定型コロニー：周囲にハローを伴う緑色のコロニー）の確認試験を実施します。

判定と確認試験

ALOA 寒天培地上では、リステリア・モノサイトゲネスは周囲にハローを伴う緑色のコロニー、リステリア属菌は周囲にハローを伴わない緑色のコロニーを形成します。

注：判定方法詳細は、培地仕様書（Technical Specification Sheet、英文）もあわせてご覧ください。

注：ALOA 寒天培地上では、*L. ivanovii* が小さな沈殿のゾーンを伴う緑色コロニー、*B. cereus* が緑色のコロニーを形成することがあります。NF Validation に従う場合には確認試験を実施してください。

確認試験を行う場合は、CEN や ISO 等に示される標準試験法や、ISO 16140-6 に基づき妥当性確認され認証を取得した試験法などを用いてください。

注：試験結果と確認試験の結果が一致しなかった場合には、試験室がそれぞれの結果の有効性を確認する必要があります。

菌種	増殖	コロニーの色
リステリア・モノサイトゲネス	良好な増殖	周囲にハローを伴う緑色のコロニー
リステリア属菌	良好な増殖	周囲にハローを伴わない緑色のコロニー

品質管理

サプリメント（NCM4001-0.5 および NCM4002-0.5）を添加した Ottaviani and Agosti リステリア寒天培地（ALOA 寒天培地）を 37 ± 2 °C で 44～52 時間好気培養した場合、以下の結果が期待されます。

菌種	WDCM 番号	期待される結果
<i>Listeria monocytogenes</i>	00021	良好な増殖を示し、周囲にハローを伴う緑色のコロニーを形成する
<i>Listeria monocytogenes</i>	00109	良好な増殖を示し、周囲にハローを伴う緑色のコロニーを形成する
<i>Listeria innocua</i>	00017	周囲にハローを伴わない緑色のコロニーを形成する
<i>Escherichia coli</i>	00012 or 00013	抑制される
<i>Enterococcus faecalis</i>	00009 or 00087	抑制される

注意事項と制限

ISO 7218 のような微生物試験室における適切な慣行に従ってください。

妥当性確認

One Broth One Plate リステリア定性試験用（OBOP-L）は、ISO 16140-2 に基づき、ISO 11290-1 を参照法とする食品および環境試料中のリステリア属菌の検出の代替試験法として NF Validation により認証されています。認証の詳細については認証 NEO: 35/05-07/16 をご参照ください。

One Broth One Plate リステリア・モノサイトゲネス定性試験用（OBOP-LMO）は、ISO 16140-2 に基づき、ISO 11290-1 を参照法とする食品および環境試料中のリステリア・モノサイトゲネスの検出の代替試験法として NF Validation により認証されています。認証の詳細については認証 NEO: 35/06-07/16 をご参照ください。

安全性

関連する製品安全データシート（SDS）を参照してください。

保管・使用期限

製品名	状態	保管条件
LESS Plus ブロス	調製前 (粉末)	容器の蓋をしっかりと閉じ、2～30 °Cで低湿度の環境に保管します。湿気と光を避けてください。
	調製後 (液体)	滅菌精製水に溶解させた場合は2～8 °Cの暗所で保管し当日中に使用します。
ALOA 寒天培地	調製前 (粉末)	容器の蓋をしっかりと閉じ、2～30 °Cで低湿度の環境に保管します。湿気と光を避けてください。
	調製後 (寒天平板)	2～8 °Cの暗所で保管し、調製から7日以内に使用します。

注：調製前の培地類の使用期限は、容器に記載の使用期限をご確認ください。なお、本期限はそのままの容器で指示通りに保管された場合に適用されます。

注：異常が認められた場合（例：吸湿してしまった場合や色調が変化した場合など）は、使用せず廃棄してください。

廃棄

培養後の培地はバイオハザード廃棄物として処分してください。バイオハザード廃棄物の処理方法としてはオートクレーブが適しています。オートクレーブできない物品の処理には漂白剤による消毒が有効です。詳細な手順につきましては使用者の施設の安全管理者にご相談ください。

利用規約

ご利用規約全文は以下のリンクからご覧いただけます。 <https://www.neogen.com/terms-and-conditions>

保証

NEOGEN Corporation は、製品の原材料が標準的な品質であることを除き、明示または黙示を問わずいかなる保証も行いません。材料に欠陥がある場合、NEOGEN は製品を交換いたします。購入者は、本製品の使用に関するすべてのリスクと責任を負うものとします。本製品の商品性、またはいかなる目的に対する製品の適合性も保証しません。NEOGEN は、本製品の使用により直接的または間接的に生じる特別損害もしくは結果的損害、または費用を含むいかなる損害についても責任を負わないものとします。

参考文献

1. Murray, E. G. D., R. A. Webb, and M. B. R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. J. Path. Bact. 29:407-439.
2. Monk, J. D., R. S. Clavero, L. R. Beuchat, M. P. Doyle, and R. E. Brackett. 1994. Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in low and high fat, frozen refrigerated ground beef. J. Food Prot. 57:969-974.
3. Bremer, P. J., and C. M. Osborne. 1995. Thermal-death times of *Listeria monocytogenes* in green shell mussels prepared for hot smoking. J. Food Prot. 58:604-608.



4. Grau, F. H., and P. B. Vanderlinde. 1992. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. J. Food Prot. 55:4-7.
5. Patel, J. R., C. A. Hwang, L. R. Beuchat, M. P. Doyle, and R. E. Brackett. 1995. Comparison of oxygen scavengers for their ability to enhance resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 58:244-250.
6. Fraser, J., and W. Sperber. 1988. Rapid detection of *Listeria* in food and environmental samples by esculin hydrolysis. J. Food Prot. 51:762-765.
7. Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser (eds.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
8. Marshall, R. T. (ed.). Standard methods for the examination of dairy products 16th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
9. www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm.
10. United States Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. (2011). Microbiology Laboratory Guidebook, Laboratory Quality Assurance Division, Athens, GA.

NEOGEN は、Neogen 社の商標です
ネオジェンジャパン株式会社

<https://www.neogen.jp/>

NEO-387-B (202608)

Technical Product Sheet

AFNOR_032021.

