

ALOA®寒天培地

Listeria monocytogenes および *Listeria* 属菌の選択培地

For microbiological control only



AES 10/5-09/06

ALOA® COUNT Method (Enumeration)

ALTERNATIVE METHODS FOR AGRIBUSINESS ANALYSIS

Certified by AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

あらゆる食品(ヒト用)に適用可能

有効期限: 2014/09/15



AES 10/3-09/00

ALOA® ONE DAY (Detection)

ALTERNATIVE METHODS FOR AGRIBUSINESS ANALYSIS

Certified by AFNOR Certification

www.afnor-validation.org

あらゆる食品(ヒト用)に適用可能

有効期限: 2016/09/27

組成

理論値

性能を確保するため、若干変更される場合があります:

動物組織由来酵素消化物	18.00g
カゼイン酵素消化物	6.00g
酵母エキス	10.00g
ピルビン酸ナトリウム	2.00g
ブドウ糖	2.00g
グリセロリン酸マグネシウム	1.00g
硫酸マグネシウム	0.50g
塩化ナトリウム	5.00g
塩化リチウム	10.00g
無水リン酸水素二ナトリウム	2.50g
X-グルコシド	0.05g
寒天	13.50g
精製水	1000mL
ナリジクス酸 ^(a)	0.02g
セフトアジジム ^(a)	0.02g
ポリミキシン B ^(a)	76700U
アンフォテリシン B ^(a)	0.01g
ホスファチジルイノシトール ^(b)	2.00g

pH7.2

(a) ALOA®選択サプリメント中に含有(AEB620088SS / AEB684420SS)

(b) ALOA®増菌サプリメント中に含有(AEB620088ES / AEB684420ES)

警告: ALOA®選択サプリメント (AEB620088SS / AEB684420SS) は、下記物質を含むため有害(Xn)です。

ナリジクス酸<8%、セフトアジジム<8%、硫酸ポリミキシンB<4.5%、アムホテリシンB<4%

R42/43: 吸入や皮膚接触により感作を起こす可能性があります

S23: ガス、煙、蒸気、スプレーを吸い込まないで下さい。

S24: 皮膚に付着させないで下さい。

S35: 本試薬およびその容器は安全な方法で廃棄して下さい。

S36/37: 適切な防護服および保護手袋を着用して下さい。

S45: 万一気分が悪くなった場合、すぐに医療機関で受診して下さい。

(可能であれば製品のラベルを提示して下さい。)

S51: 必ず換気の良い場所でご使用下さい。

必要な器材および試薬

器材:

- ふ卵器
- 滅菌済みまたは無菌シャーレ
- 煮沸用ウォーターバス
- 恒温ウォーターバス

試薬:

- ハーフフラザバイオン(例: Ref.42048, Ref.42615)
- フラザバイオン(Ref.42046)
- ペプトン緩衝溶液(例: ボトル Ref.42043)

Listeria monocytogenes の確認用:

- ALOA® Confirmation (Ref. AEB120100)
- アピ リステリア(Ref. 10300)
- バイダス アッセイキット リステリア モノサイトゲネス 2 (Ref. 30704)
- ペプトン水(NaCl 含有) (Ref. AEB111499)

用途

本培地は食品や環境検体中に存在する *Listeria monocytogenes* およびその他の *Listeria* 属菌を検出するための選択培地です。食品中に存在する *Listeria monocytogenes* の菌数測定も可能です。また本培地は、ISO11290 標準プロトコールにおいて食品および動物用飼料に存在する *L. monocytogenes* の検出や菌数測定にも使用されます。(1,2,3,4,5)

原理

本培地で *Listeria* は青緑色の円形コロニーを形成します(特異的な発色基質によるβ-グルコシダーゼの検出)。また、*Listeria monocytogenes* はコロニー周囲に不透明なハローを形成する特徴があり、他の *Listeria* 属菌と容易に判別できます。このハローは、病原性 *Listeria* の感染サイクルに関連するフォスホオリパーゼ活性に由来します。培地の選択性は塩化リチウム、抗菌剤および抗真菌剤の組み合わせにより得られます。

調製済み培地

AEB520080	20 枚(90mm)
AEB520079	120 枚(90mm)
AEB620088	ALOA® Count キット base+サプリメント(200 mL×5)

粉末培地

AEB150072	500g ボトル
AEB684420	500mL(6 組パック) (AEB684420ES および AEB684420SS) 各 6 パック

ALOA*

* 各シャーレに印字

その他 *Listeria* 属の確認用:

- BHI ブイヨン (Ref. AEB110101)
- *Listeria* species Confirmation Strips (Ref. 416477)

追加試薬:

- パルカム寒天培地 (Ref. AEB522050)
- オックスフォード寒天培地 (Ref. AEB522000)
- TSYE 寒天培地 (Ref. AEB522865)

使用上の注意

- 微生物試験にのみご使用下さい。
- 熟練者のみご使用下さい。
- 本培地は動物由来の原料を含みます。由来に関する知識、由来動物の衛生状態は感染性のある病原体がないことを保証するものではありません。したがって、これらは潜在的に感染の可能性があるものとして、充分ご注意の上お取り扱い下さい(摂取または吸入しないで下さい)。
- 全ての検体、培養物および検体を接種した製品は感染性があるものとして適切にお取り扱い下さい。被検菌の無菌操作および通常操作の留意事項は以下のガイドラインをご参照下さい。安全ガイドライン: “CLSI® M-29A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline – Current revision*” 操作留意事項 “Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - CDC/NIH – Latest edition” または各国の最新のガイドラインに従って下さい。
- 本培地を製造原料として使用しないで下さい。
- 使用期限切れの製品は使用しないで下さい。
- 包装の破損した製品は使用しないで下さい。
- コンタミネーションの起きている、または水分の浸出している平板培地は使用しないで下さい。
- コンタミネーションの疑われるボトルまたは試験管は使用しないで下さい。
- 凝集が認められるなど、均質でない乾燥培地は使用しないで下さい。
- ご使用になる前に、ボトルのスクリューキャップの不正開封防止リングに破損がないことを確認して下さい。
- 本培地は取扱い説明書に記載されている操作方法に従って使用して下さい。操作方法を変更すると結果に影響を及ぼすことがあります。

貯蔵条件

- シャーレ・キット・サプリメントは箱未開封の状態です。2~8°C下で使用期限まで保存可能です。
- 粉末培地は 1~30°C下で使用期限まで保存可能です。湿気を避けて保存して下さい。
- 粉末培地およびサプリメントから調製した本培地は、密封袋に入れるかフィルムで封をすることで、2~8°C下で2週間保存可能です。
- キットから作製した本培地は、密閉容器または密封パックに入れることで、2~8°C下で1週間保存可能です。
- 暗所に保管して下さい。

検体

検体の収集および準備をするにあたっては、最新の標準法の推奨などに従って下さい。

ALOA® Countキットの事前準備

1. ALOA® base flask (品番 AEB620088B) を 100°C のオートクレーブで溶解します。ただし、加熱し過ぎないで下さい。培地の温度を 44~47°C まで下げます。

2. ALOA® 増菌サプリメント (品番 AEB620088ES) を 44~47°C で温めます。
3. ALOA® 選択サプリメント (品番 AEB620088SS) を 2mL の 50% エタノール溶液 (溶媒: 滅菌精製水) で溶解します。
4. 十分に攪拌した上記二つのサプリメント (増菌および選択) を 200mL の本培地に添加し、さらによくかき混ぜます。培地は全体が一様にごく薄い乳白色を示します。調製後の培地は平板培地の作製または ALOA® COUNT 法に基づく混釈法による菌数測定をする際に使用できます。

粉末培地の事前準備

- 精製水またはそれと同等の処理水を使用し、1L あたり 70.6g の粉末を溶解します。
- 粉末が完全に溶解し、培地内で均一となるよう攪拌を続けて下さい。
- 25°C で pH7.2±0.2 に調整して下さい。
- 121°C で 15 分間、滅菌して下さい。
- 48~50°C に冷却して下さい。
- あらかじめ 44~47°C に温めておいた選択サプリメント (SS) および調製済み増菌サプリメント (ES) を必要量追加して下さい。
AEB684420 (SS): 50% エタノール溶液 (滅菌精製水使用) を 5mL 添加して下さい。
- 直径 90mm シャーレ 1 枚あたりに 18±1mL または直径 140mm シャーレ 1 枚あたりに 60±3mL の本培地を分注して下さい。
- 平らな場所にシャーレを上向きにし、培地が固まるまで静置して下さい。
- 作製した培地を 2~8°C の冷蔵庫でフタを下にして保存して下さい。

使用法標準法による *Listeria monocytogenes* の検出および菌数測定:

EN ISO 11290-1 および-2 の amendment 1 (2004) を参照して下さい(5)。

NF VALIDATION 承認取得済みの *Listeria monocytogenes* および *Listeria* 属菌の検出: ALOA® ONE DAY 法

使用法

ハーフフラザブイヨン中で 30±1°C で 24±2 時間増菌培養した検体を 90mm シャーレの表面に 0.1mL 塗抹または画線します。37±1°C で培養し、24 時間から 48 時間後に判定を行って下さい。結果は培養 24 時間で得られますが、48 時間まで読取りを延長することが可能です(試験室の検査体制等に応じて適宜調整して下さい)。

NF VALIDATION では、培養後のハーフフラザブイヨンは本培地に接種する前に 5±3°C で 72 時間まで保管可能とされています。

判定*Listeria monocytogenes* の検出:

Listeria monocytogenes の特徴: コロニーは円形で青色から青緑色を呈し、直径 1~2mm で不透明なハローを形成します。

Listeria monocytogenes 株は 24 時間以内に特徴的なコロニーを形成します。

NF VALIDATION に従い、陽性と判定された結果は全て、下記いずれかの方法で確認する必要があります。

1. ISO または CEN の標準法に規定されている、本培地で分離された特徴的コロニーを用いた従来からの方法分離されたコロニーの単離作業が必要です。最新の EN ISO7218 標準法を参照して下さい(6)。
- 2a. ALOA® CONFIRMATION 法による確認試験 (ALOA® CONFIRMATION の添付文書を参照して下さい。)
- 2b. アピ リステリア ストリップの使用 (アピ リステリアの添付文書を参照して下さい)。
- 2a-2b. 推定されるコロニーは、よく分離され、かつ *Listeria monocytogenes* に特徴的な外観を示していれば、直接同定に用いることができます。特徴的なコロニーがよく分離されなかった場合、同定試験を実施する前に新たな本培地、血液寒天培地またはトリプケースソイ寒天培地 (TSA) で継代培養し純化して下さい。当該コロニーは本培地で得られた特徴的コロニーで同定試験の対象であることを、選択した継代用培地で検証する必要があります。
- 2c. バイダス アッセイキット リステリア モノサイトゲネス 2 本培地で分離された、または未分離の特徴的なコロニーを用います。エーゼで釣菌したコロニーを 2mL のペプトン水に懸濁させます。その懸濁液 0.5mL をバイダス アッセイキット リステリア モノサイトゲネス 2 の試薬ストリップのサンプルウェルへ分注し、バイダスで測定します。陽性の場合、*L. monocytogenes* が存在したことになります。
3. NF VALIDATION で承認された、ALOA® ONE DAY 法とは原理が異なる試験法
この第二のバリデートされた方法については、指示通りに実施する必要があります。ALOA® ONE DAY 法と共通のステップがある場合は、両法の最後の共通ステップから開始して下さい(例: ハーフフラザバイオン)。

ALOA® ONE DAY 検出法で陽性結果が得られた場合で、すでに ALOA® COUNT 法により菌数測定が行われ *Listeria monocytogenes* 陽性であることを確認している場合は、さらなる確認試験を実施する必要はありません。

Listeria 属菌の検出:

Listeria 属菌の特徴: コロニーは円形で青色から青緑色を呈し、直径 1~2mm で不透明なハローを形成するものとし**ないものがあります。**

NF VALIDATION に従い、陽性と判定された結果は全て、下記いずれかの方法で確認する必要があります。

1. ISO または CEN の標準法に規定されている、本培地で分離された特徴的コロニーを用いた従来からの方法分離されたコロニーの単離作業が必要です。最新の EN ISO7218 標準法を参照して下さい(6)。
2. ALOA® ONE DAY による *Listeria* 属菌の確認法:
オプション 1: 5 時間プロトコール本培地上でよく分離されたコロニーを用い、*Listeria species Confirmation Strip* による免疫クロマトグラフィーを実施します (*Listeria species Confirmation Strip* の添付文書を参照して下さい)。
オプション 2: 24 時間プロトコール本培地上でよく分離されたコロニーを PALCAM 寒天培地に穿刺植菌し、37°C ± 1°C で 24 ± 2 時間培養します。PALCAM 寒天培地 1 枚に対し、12 まで穿刺可能です。24 時間培養後、*Listeria* 属菌は黒色ハローを有し緑色(または光沢のあるグレー)を呈します。
3. NF VALIDATION で承認された、ALOA® ONE DAY 法とは原理が異なる試験法

この第二のバリデートされた方法については、指示通りに実施する必要があります。ALOA® ONE DAY 法と共

通のステップがある場合は、両法の最後の共通ステップから開始して下さい(例: ハーフフラザバイオン)。

ALOA® ONE DAY 検出法で陽性結果が得られた場合で、すでに ALOA® COUNT 法により菌数測定が行われ *Listeria* 属菌陽性であることを確認している場合は、さらなる確認試験を実施する必要はありません。

NF VALIDATION 承認取得済みの *Listeria monocytogenes* および *Listeria* 属菌の菌数測定: ALOA® COUNT 法

使用法

ALOA® COUNT 法に基づき、以下のとおり一次溶液を準備して下さい:

- 選択剤を含むハーフフラザバイオンに接種(培養なし)
- 選択剤無添加のハーフフラザバイオンに接種し、20 ± 2°C で 60 ± 5 分培養
- BPW に接種(20 ± 2°C で 60 ± 5 分培養、または培養なし) 一次溶液 0.1mL を 90mm シャーレの表面に塗抹して下さい(一次溶液は必要に応じて 10 倍希釈を行って下さい)。または、1mL を分注し混釈法を実施して下さい。表面塗抹法を実施する場合で菌数が少ないことが見込まれる際には、直径 140mm の大きなシャーレの表面に 1mL を接種するかまたは 90mm シャーレ 3 枚に分種することも可能です。
37 ± 1°C で培養して下さい。最終的な測定結果は、48 ± 3 時間後に確認できます。高濃度に汚染された検体においては、24 時間培養後に最初の読取りを実施することで迅速に検出することができます。

判定

Listeria monocytogenes の菌数測定:

Listeria monocytogenes の特徴: コロニーは円形で青色から青緑色を呈し、直径 1~2mm で不透明なハローを形成します。

NF VALIDATION に従い、陽性と判定された結果は全て、下記いずれかの方法で確認する必要があります。

1. ISO または CEN の標準法に規定されている、本培地で分離された特徴的コロニーを用いた従来からの方法分離されたコロニーの単離作業が必要です。最新の EN ISO7218 標準法を参照して下さい(6)。
- 2a. ALOA® CONFIRMATION 法による確認試験 (ALOA® CONFIRMATION の添付文書を参照して下さい。)
- 2b. アピ リステリア ストリップの使用 (アピ リステリアの添付文書を参照して下さい)。
- 2a-2b. 推定されるコロニーは、よく分離され、かつ *Listeria monocytogenes* に特徴的な外観を示していれば、直接同定に用いることができます。特徴的なコロニーがよく分離されなかった場合、同定試験を実施する前に新たな本培地、血液寒天培地またはトリプケースソイ寒天培地 (TSA) で継代培養し純化して下さい。当該コロニーは本培地で得られた特徴的コロニーで同定試験の対象であることを、選択した継代用培地で検証する必要があります。
- 2c. バイダス アッセイキット リステリア モノサイトゲネス 2 本培地で分離された、または未分離の特徴的なコロニーを用います。エーゼで釣菌したコロニーを 2mL のペプトン

水に懸濁させます。その懸濁液 0.5mL をバイダス アッセイキット リステリア モノサイトゲネス 2 の試薬ストリ

ップのサンプルウェルへ分注し、バイダスで測定します。陽性の場合、*L. monocytogenes* が存在したことになります。

計算方法および結果の表記方法については、NF EN ISO 7218 標準法を参照して下さい(6)。

ALOA® COUNT 菌数測定法で陽性結果が得られた場合で、すでに ALOA® ONE DAY による検出法で *Listeria monocytogenes* 陽性であることを確認している場合は、さらなる確認試験を実施する必要はありません。

Listeria monocytogenes ではなく、かつ特徴的なコロニーが混在すると測定結果が過剰となる恐れがあるため、5 つ以上のコロニーで確認試験を実施して下さい。

Listeria属菌の菌数測定:

Listeria 属菌の特徴: コロニーは円形で青色から青緑色を呈し、直径 1~2mm で不透明なハローを形成するものとし**ないものがあります。**

NF VALIDATIONに従い、陽性と判定された結果は全て、下記いずれかの方法で確認する必要があります。

1. ISO または CEN の標準法に規定されている、本培地で分離された特徴的なコロニーを用いた従来からの方法
分離されたコロニーの単離作業が必要です。最新の EN ISO7218 標準法を参照して下さい(6)。
2. ALOA® ONE DAY による *Listeria* 属菌の確認法:
オプション 1: 5 時間プロトコール本培地上でよく分離されたコロニーを用い、*Listeria species Confirmation Strip* による免疫クロマトグラフィーを実施します (*Listeria species Confirmation Strip* の添付文書を参照して下さい)。
オプション 2: 24 時間プロトコール本培地上でよく分離されたコロニーを PALCAM 寒天培地に穿刺植菌し、 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24 ± 2 時間培養します。PALCAM 寒天培地 1 枚に対し、12 まで穿刺可能です。24 時間培養後、*Listeria* 属菌は黒色ハローを有し緑色(または光沢のあるグレー)を呈します。

計算方法および結果の表記方法については、NF EN ISO 7218 標準法を参照して下さい(6)。

ALOA® COUNT 菌数測定法で陽性結果が得られた場合で、すでに ALOA® ONE DAY による検出法で *Listeria* 属菌陽性であることを確認している場合は、さらなる確認試験を実施する必要はありません。

*Listeria*属菌ではなくかつ特徴的なコロニーが混在すると測定結果が過剰となる恐れがあるため、5 つ以上のコロニーで確認試験を実施して下さい。

留意事項

- GLP(Good Laboratory Practice)を遵守して下さい(最新版 ISO 7218 標準法など参照のこと(6))。
- 結果が一致しない場合には(代替法で陽性、確認試験では陰性)、必ず他の方法で十分な検証を行って下さい。
- NF VALIDATION の承認に基づく ALOA® ONE DAY 法で試験できる検体量は最大 25g です。
- ALOA® ONE DAY 法においては、高濃度に汚染された検体に関しては本培地上での分離培養を推奨します。
- ALOA® COUNT 法では、最初の読取りを 24 時間で実施することで、高濃度に汚染された検体からの迅速な検出が

可能です。

- 菌数が多い場合には、平板の中心と周囲(コロニーが存在しない部分)、または未接種の本培地とで寒天の不透明さを比較することにより判定がしやすくなります。
- 菌数が多い場合でも、*L. monocytogenes* は培地の不透明さの程度により特徴づけることができます。これにより、*L. monocytogenes* の存在の有無は容易に判別可能です(存在する場合: 培地は不透明/存在しない場合: 培地は透明)。疑わしい場合には、未使用の本培地で継代培養して下さい。
- 24 時間培養後、*Listeria ivanovii* の一部の株はわずかなハローを形成します。48 時間培養後、*Listeria ivanovii* は *L. monocytogenes* と同じ特徴を示します。これらの菌種を区別するために、必ず確認試験を実施して下さい。
- 本培地は、48 時間培養後冷蔵庫で保存可能です。ハローおよびコロニーの色は、低温で影響を受けません。NF VALIDATION によると、ALOA® COUNT 法を用いた場合、培養後の本培地を冷蔵庫で 72 時間まで保存することができます。ハローおよびコロニーの色は影響を受けません。
- *Bacillus cereus* の一部の株は本培地で発育し、平らで周縁不規則なラフ型コロニーを形成します。白色から青色の不均一な色を呈し、大きく明瞭なハローを有します。
- ALOA® Count キット(base+サプリメント)を使用する際、サプリメントを含まない base のフラスコについては、培地中の増菌および選択性に影響を与えることなく再度冷却と溶解を行います。
- サプリメントを追加した ALOA® base は、 $44 \sim 47^{\circ}\text{C}$ で 7 時間まで液状に保つことが可能です。
- ALOA® base を加熱し過ぎないで下さい。

品質管理

本培地は厳格な品質への要望を満たすよう開発・製造されています。

細菌活性に関する菌株試験の結果は、ロットごとに品質管理が保証されおり、試験成績書に記載されています(ご要望により提供致します)。

廃棄処理

未使用の有害試薬類は、有害化学物質の廃棄処理手順に従って処理して下さい。

未使用の無害試薬類は、通常の化学物質の廃棄処理手順に従って処理して下さい。

使用済み試薬およびその他の汚染廃棄物は全て、感染性もしくは感染の危険のある製品の取扱い方法に従って処理して下さい。

廃棄物や汚染水については、それぞれの性質または有害性の度合いに応じ、各施設の責任の下、適切な規制に従い、取扱いおよび廃棄処理を行って下さい。

参考文献

- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Differential agar Medium for *Listeria monocytogenes*. In "Quimper froid. Symposium proceedings" P6 A.D.R.I.A. Quimper (F) 16-18 June, 1997.
- Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997) Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes*. Industrie Alimentari
- Vlaemynck, G., Lafarge, V., Scotter, S. (2000) Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. Journal of Applied Microbiology, 88 : 430-441.
- Artault, S., Bind, J.L., Delaval, Y., Gaillard, N. Validation AFNOR de la méthode ALOA pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires. Colloque Société Française de Microbiologie, 19-20 octobre 2000.
- NF EN ISO 11290 parties 1 et 2 – Amendement 1 (2004) : Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.
- NF EN ISO 7218 : Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations.

記号

記号	内容
	品番
	製造元
	保管温度
	使用期限
	ロット番号
	添付文書を参照
	<n> 回分の試験を含む
	遮光
	湿気厳禁

(問い合わせ先)

製品関連

シスメックス株式会社 CSセンター

〒651-2241 神戸市西区室谷1丁目3番地の2

TEL: 0120-265-034

注文・納期・在庫関連

シスメックス・ビオメリュー株式会社

〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号

大崎セントラルタワー8階

TEL: 03-6834-2669(代表)



シスメックス・ビオメリュー株式会社

東京都品川区大崎一丁目2番2号

大崎セントラルタワー8階

Tel: 03-6834-2666 / Fax: 03-6834-2667

<http://www.biomerieux.co.jp>



bioMérieux SA

69280 Marcy-l'Étoile/France

Tel.33(0)4 78 87 20 00 /

Fax33(0)4 78 87 20 90

<http://www.biomerieux.com>