Petrifilm™

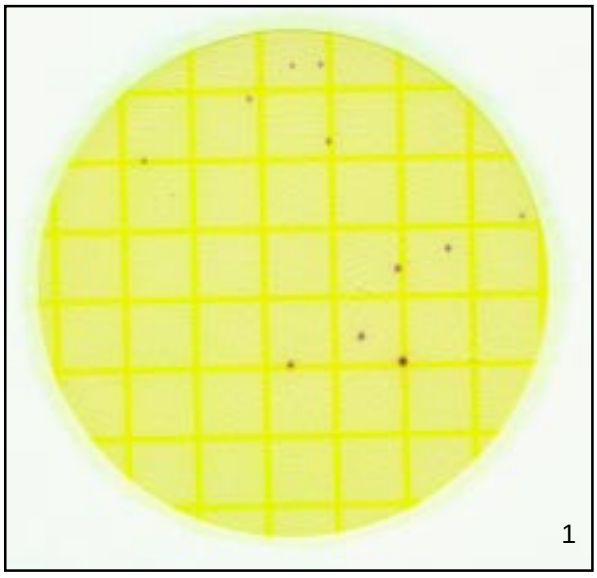
Environmental Listeria Plate

该手册能指导你掌握 3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片的使用。
如需更多信息，请与 3M 微生物产品代表联系。

3M Petrifilm™ 环境李斯特菌(Environmental Listeria, EL) 测试片是一种预先制备好的培养基，含有选择性试剂，营养成分，冷水可溶性凝胶和有助于菌落检测的显色指示剂。Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片可用于检测或计数环境样本中的李斯特菌数。Petrifilm 环境李斯特菌测试片检测的李斯特菌包括单核增生李斯特菌(*L.monocytogenes*)，英诺克李斯特菌 (*L.innocua*)，威尔李斯特菌(*L.welshimeri*)，但不能区分各种菌。

环境条件和消毒剂可能会抑制或损伤微生物。缓冲蛋白胨水溶液(Buffered Peptone Water, BPW) 能用作修复肉汤和Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片结合使用。但李斯特菌在缓冲蛋白胨水溶液中的修复过程**不是**增菌步骤。

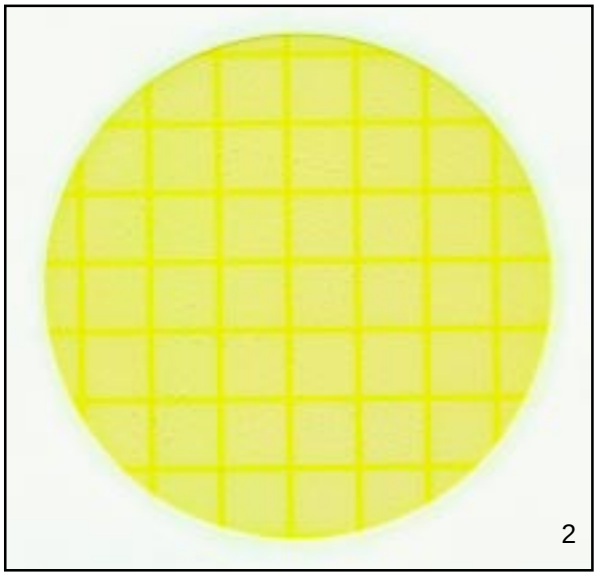
Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片测试片可用于定性，半定量，定量检测。需要进一步的指导，请参考使用部分的提示。



1. **图 1** 为长有李斯特菌的典型 Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片。判读或计数所有的紫红色菌落为李斯特菌。如果在 26-29 小时，有灰色或淡粉红色菌落存在，需继续培养。在培养时间内，由灰色或淡粉红色加深为紫红色的菌落应判定为李斯特菌。在最大培养时间(30 小时)仍保持灰色或淡粉红色的菌落不应判读为李斯特菌。不考虑或计数圆形轮廓上的菌落，因为它们不受选择性培养基的作用。

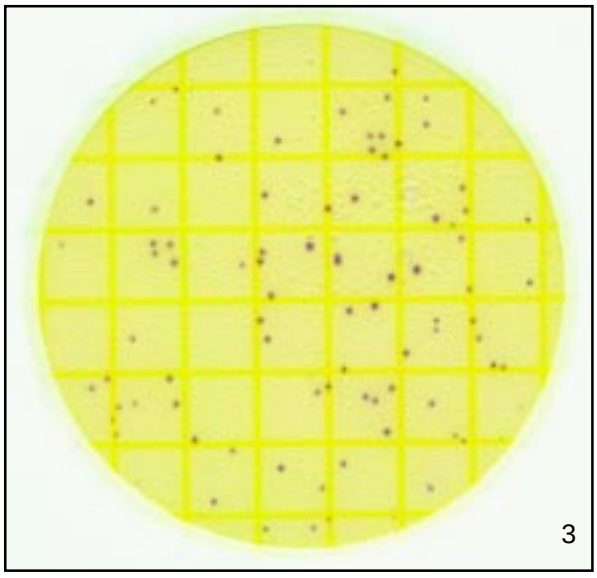
   定性判读： 测试片检出李斯特菌。
   半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
   定量判读： 测试片上的李斯特菌数: 11。
   请参考判读手册的“定量采样与判读”部分来计算每个环境样本中的李斯特菌数。

3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片



2. 该Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片在培养30小时后没有菌落生长，实验结束。

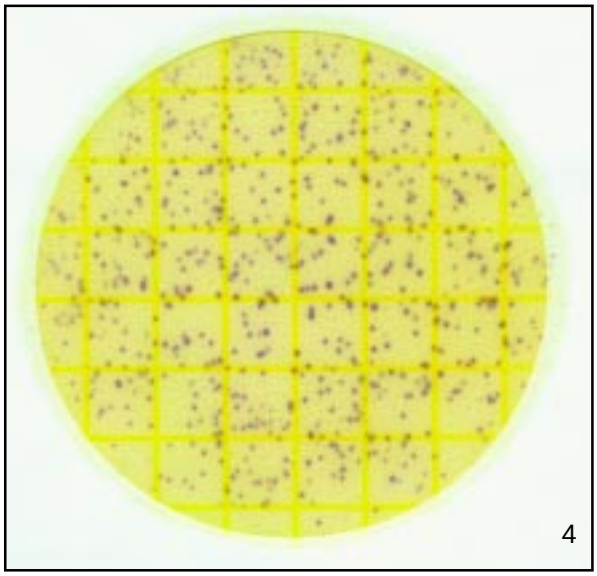
定性判读： 测试片上未检出李斯特菌。
半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
定量判读： 测试片上的李斯特菌数: < 1。
请参考判读手册的“定量采样与判读”部分来计算每个环境样本中的李斯特菌数。



3. Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片对李斯特菌具有选择性，其菌落显示为紫红色。

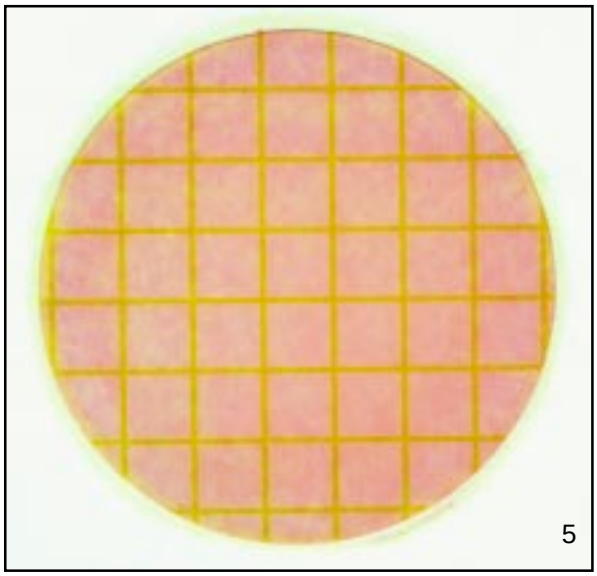
定性判读： 测试片上检出李斯特菌。
半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
定量判读： 测试片上的李斯特菌数: 84 。
请参考判读手册的“定量采样与判读”部分来计算每个环境样本中的李斯特菌数。

3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片

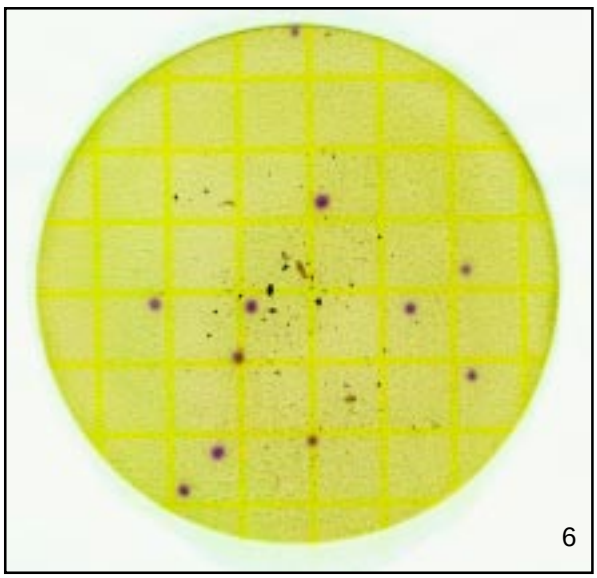


4. 由于 Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片的判读方式有三种，所以没有建议的计数范围。当菌落密集时，按以下方式判读定性或半定量的结果，或估算定量的结果。

定性判读： 测试片上检出李斯特菌。
半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
定量判读： 测试片上估算的李斯特菌数: 约460
当大量李斯特菌存在时，通过计数两个或两个以上的具有代表性方格的菌落数来估算。计算每个方格的平均菌落数后乘以 42。Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片的接种面积近似 42cm^2。



5. 当菌落数很多时，测试片上可能有许多小的，不清楚的菌落，和(或) 呈现全部的粉红色至棕色。
定性判读： 测试片上检出李斯特菌。
半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
定量判读： 测试片上的李斯特菌数为多不可计(Too Numerous To Count, TNTC)。该图中的菌落数近似 10^4。

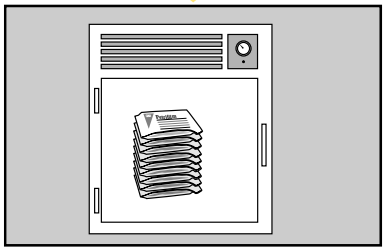


6. 背景颜色可能会因为环境样本中的灰尘、泥土、砂子、或其它沉淀物而发生变化，也可能是因为采样设备和(或) 缓冲蛋白胨水(修复液)的品牌不同而引起。紫红色菌落判读为李斯特菌。

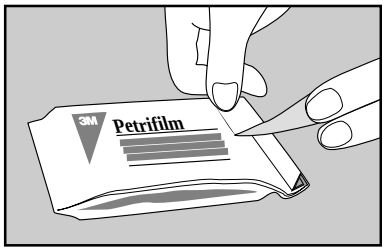
定性判读： 测试片上检出李斯特菌。
半定量判读： 李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)。
定量判读： 测试片上的李斯特菌数：11。
请参考判读手册的“定量采样与判读”部分来计算每个环境样本中的李斯特菌数。

3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片 操作说明

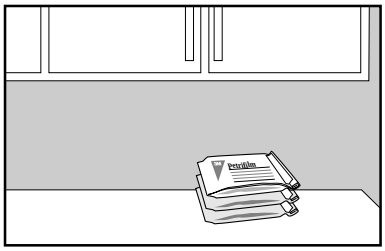
贮藏



1. 将未开封的测试片贮藏在≤8℃(46℉)的环境下，并在包装上标示的有效期内使用。在高湿度的地方，最好在使用前将测试片回复到室温，以防止水气凝结。

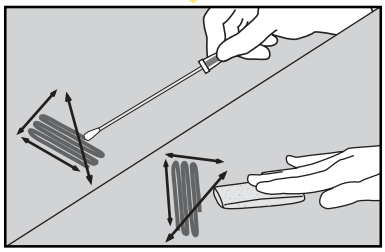


2. 已开封的测试片，将开口反折，用胶带封好。



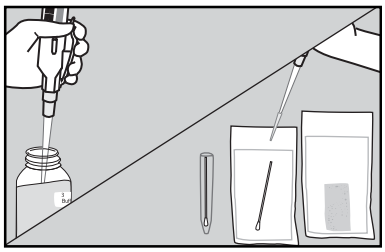
3. 为防止暴露于潮湿的环境中，请不要冷藏已开封的测试片。将胶带封好的测试片贮藏在低温干燥的地方，保持时间不超过1个月。请勿将测试片放在温度>25℃ (77℉)和(或)相对湿度>50% 的环境中。

样品制备



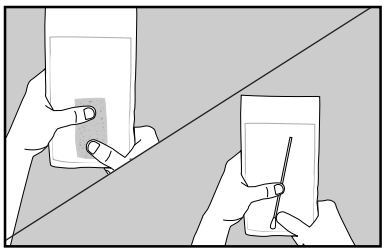
4. 用涂抹棒、海棉或其它采样设备收集环境样本。湿润采样设备的液体应≤ 10 mL。

湿润剂可以是无菌水、缓冲蛋白胨水(Buffered Peptone Water, BPW), 或中和缓冲液, 如 Letheen 肉汤或 Dey/Engley (DE)中和肉汤。



5. 在无菌环境下在收集的样品中添加 5mL，20-30℃，灭过菌的缓冲蛋白胨水(BPW)溶液。

不要将Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片与 Vermont 培养基 (UVM)、Fraser 肉汤、李斯特菌增菌培养基 (LEB)或缓冲李斯特菌增菌培养基(BLEB)共用。

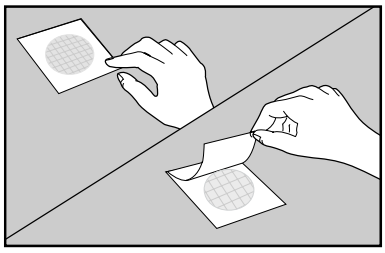


6. 混合，蠕动或旋转样品与 BPW 的混合液将近一分钟。将样品置于**室温(20-30℃) 1h，最久不超过 1.5 h**，以修复损伤的李斯特菌。

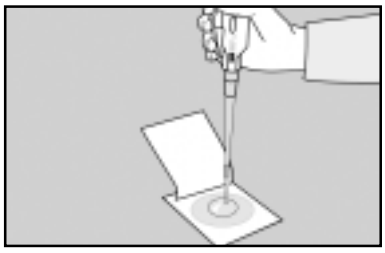
3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片

接种

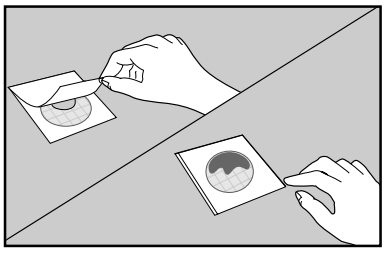
切记在操作下一张测试片前接种并用压板压好每张测试片。



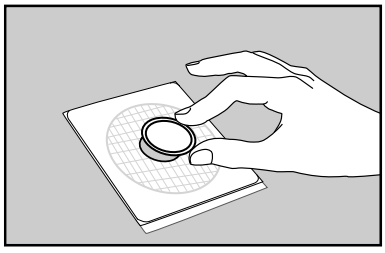
7. 将测试片放在平坦处，掀起上层膜。



8. 用 3M 电子移液枪或其它移液器垂直滴加3 mL样品到下层膜的中央。

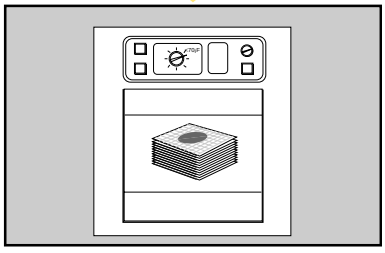


9. 将上层膜缓慢盖下，以免产生气泡。



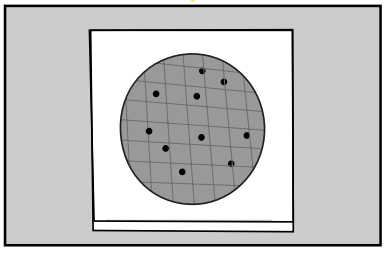
10. **轻轻地**将塑料压板放在位于接种区上层膜上。**不要压**，扭转或滑动压板。提起压板。等至少 10 分钟，以使胶体凝固。

培养



11. 将测试片透明面朝上，可叠放至10片，在35℃ ± 1℃或37℃ ± 1℃下培养 **28h** ± 2h。

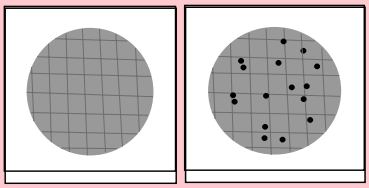
判读



12. Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片能够用标准的菌落计数器或其它光学放大器计数或判读。不要计数圆形轮廓上的菌落，因为它们不受选择性培养基的作用。

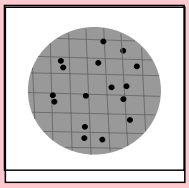
Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片法可用于定性、半定量及定量检测

13. 对于定性检测，根据紫红色菌落的存在与否，将结果计为检出和未检出。
如果是 / 否的结果已经能够满足报告要求，那么你可以选择定性检测。



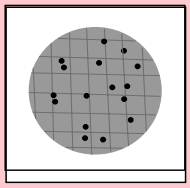
未检出　　检出

14. 对于半定量检测，根据出现紫红色菌落的相对量来记录结果。
如果你是根据菌落数的相对含量来采取相应的措施，并且没必要记录实际菌落数，那么你可以选择半定量检测。



李斯特菌的含量应记录为对采样区域和企业标准有指导意义的形式(如低，中，高，或可接受和不可接受)

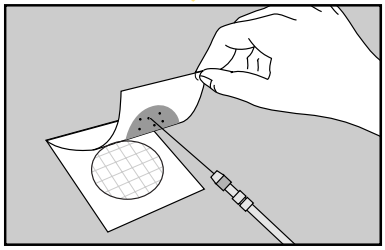
15. 对于定量检测，计数所有紫红色菌落。
如 果你根据实际菌落数量来采取相应的措施，你可以采用定量检测。



测试片上李斯特菌数：16

请参考判读手册的“定量采样与判读”部分来计算每个环境样本中的李斯特菌数。

可选



16. 可挑取菌落进行进一步鉴定。
掀起上层膜，从胶上挑取菌落。

3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片

定量采样与判读

如果你以定量方式使用 3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片，请参考产品的包装插件，然后按下述方式计算单位面积的菌落数(Colony Forming Units, CFU)。同时，你也要注意以下几点:

- 稳定性是在环境监控过程中获得有用信息的关键点，所以在采样过程中应使用相同的步骤。理想情况下，应使用相同类型的取样设备，模板面积，技术员和采样技术。
- 采样面积的大小可根据法规，内部标准，和(或)监控地点的不同来设定，例如考虑到较低的细菌数，对成品线应采用较大的采样面积。
- 更多关于环境采样的信息，请见如下的参考文献，或参考 3M Petrifilm™ 测试片环境监控手册。

为了测定单位采样面积的李斯特菌数，你需要记录以下数据:

1. 采样面积
2. 湿润采样设备的液体量
3. 添加缓冲蛋白胨水的体积
4. 接种体积
5. 测试片上的李斯特菌数

运用如下的等式和表格来计算单位采样面积的菌落数 (CFU/area sampled)。实例请见下页。方法的详细内容请见包装插件和操作说明。

你也可以测定单位样本的结果，如 CFU/ 每份排放水。

CFU/ 面积 = (菌落数 × [mL 湿润液 + mL BPW] ÷ 3 mL) ÷ 采样面积

或

A. 湿润液和 BPW 的总体积(mL) _____

B. 接种量(mL) _____ 3

C. A 除以 B _____

D. 测试片上的菌落数 _____

E. C 乘以 D _____

F. 采样面积 _____

G. E 除以 F _____

G 横线等于 CFU/ 面积

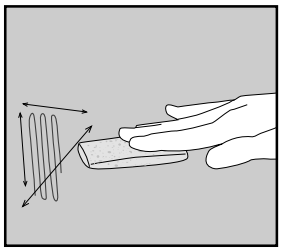
环境定量采样符合以下文献:

- Standard Methods for the Examination of Dairy Products, Section 3.7D, American Public Health Association, Washington D. C., 1992.
- Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Section 3.512 and 3.521, American Public Health Association, Washington D. C., 2001

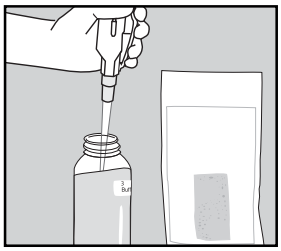
3M Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片

定量判读

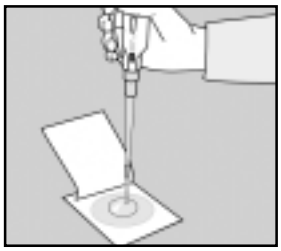
例：海绵采样法



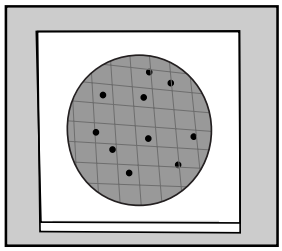
1. 用 10 mL 液体湿润海绵，涂抹采样面，如面积为1平方英尺(1 ft^2)。



2. 将海绵放回无菌容器，加入 5 mL 缓冲蛋白胨水(BPW)。



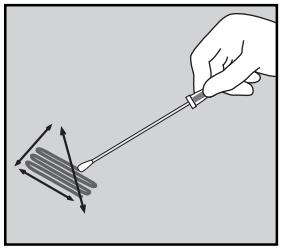
3. 修复完成后，吸取 3 mL 混合液接种到Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片。



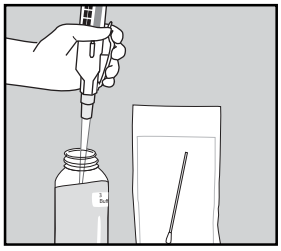
4. 培养后，进行菌落计数 (在本例中，假设菌落数为 90)。

A. 湿润液和 BPW 的总体积(mL)	5+10 = 15
B. 接种量(mL)	3
C. A 除以 B	5
D. 测试片上的菌落数	90
E. C 乘以 D	450
F. 采样面积	1 ft^2
G. E 除以 F	450 CFU/ft^2

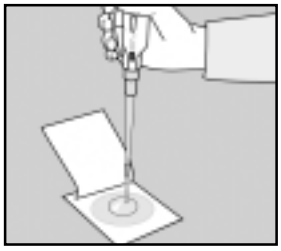
例：涂抹棒采样法



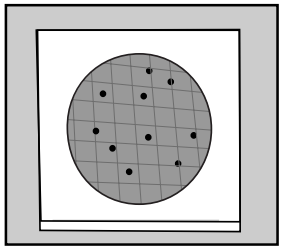
1. 用 1 mL 液体湿润涂抹头，涂抹采样面，如面积为 50 平方厘米(50 cm^2).



2. 将涂抹棒放回无菌容器中，添加 5 mL 缓冲蛋白胨水(BPW)。



3. 修复完成后，吸取 3 mL 混合液接种到Petrifilm™ 环境李斯特菌测试片。



4. 培养后，进行菌落计数 (在本例中，假如菌落数为 90)。

A. 湿润液和 BPW 的总体积(mL)	5 + 1 = 6
B. 接种量(mL)	3
C. A 除以 B	2
D. 测试片上的菌落数	90
E. C 乘以 D	180
F. 采样面积	50 cm^2
G. E 除以 F	3.6 或 4 CFU/cm^2