



ペトリフィルム™

リステリア環境微生物測定用プレート

(ELプレート)

Petrifilm™ Environmental Listeria Plate (EL Plate)

この解説書はペトリフィルム™ リステリア環境微生物測定用プレート（以下「本プレート」という）に現れた結果をよく理解していただくためのものです。

本プレートは、選択成分、栄養、冷水可溶性ゲル化剤を含むできあがり培地です。本プレートに含まれる指示薬でコロニーの識別を容易にします。本プレートは環境中のリステリア属菌の測定に使用します。

本プレートはリステリア属菌 (*Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*) を検出します。リステリア属菌の種類を区別して検出することはできません。

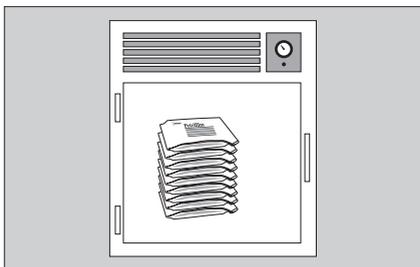
環境中の多くの菌は環境条件下や消毒剤でストレス（損傷）を受けています。緩衝ペプトン水は菌を回復させる培地として本プレートと共に使用します。それらは、あらかじめお客様がご用意いただくか、滅菌済みの製品をご購入ください。緩衝ペプトン水で菌を回復させることと増菌とは異なります。

本プレートは定性試験、半定量試験、定量試験に使用できます。

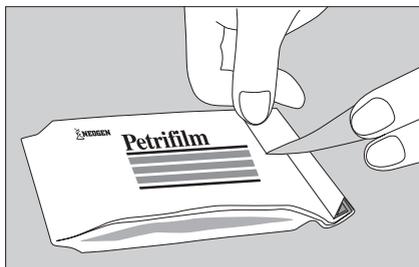
- | | |
|--------------|--|
| 定性試験 | 色の濃淡にかかわらず赤紫色のコロニーが検出されたか（陽性）、検出されなかったか（陰性）で結果を判定します。 |
| 半定量試験 | 色の濃淡にかかわらず、現れた赤紫色のコロニーが相対的に多数・中程度・少数、として結果を判定します。多数・中程度・少数という判定は、サンプルの場所や個々の工場の基準で判断します。 |
| 定量試験 | 色の濃淡にかかわらず全ての赤紫色のコロニーを数えてください。フォームダム上には選択成分が無いいため、フォームダム上に生育したコロニーは測定しないでください。 |

使用手順概要

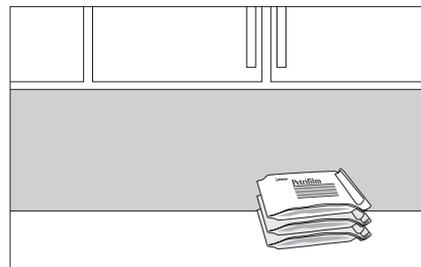
保管



- 1 未開封の本プレートは、8°C以下で保管してください。ご使用の際には、開封前に製品を室温に戻してください。

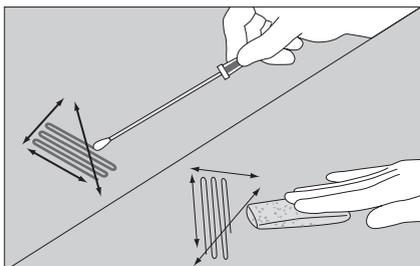


- 2 開封したパウチは開口部を折ってテープで封をしてください。

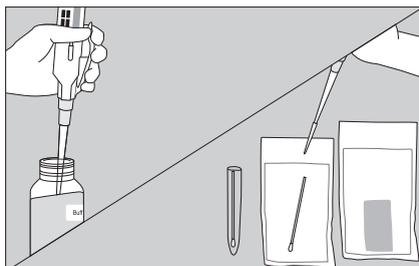


- 3 開封後のパウチは25°C以下、相対湿度50%以下で保管してください。
開封したパウチは冷蔵しないでください。
開封後の本プレートは1ヶ月以内に使用してください。

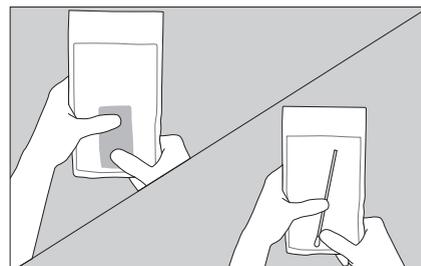
検体の調製



- 4 10mL以下の希釈液で湿らせた綿棒やスポンジ等で、測定箇所の表面をよくふきとります。ふき取り器具は、滅菌水やリージンプロスのような中和希釈液で湿らせます。

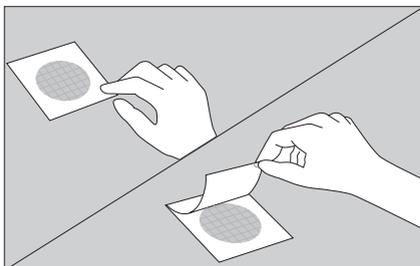


- 5 サンプルに滅菌緩衝ペプトン水 (BPW) を無菌的に5mL加えます。UVM、Fraser broth、LEB、BLEB等リステリア用培地は使用できません。

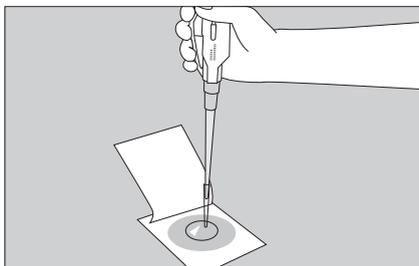


- 6 サンプルを約1分間混ぜて均質化します。**サンプルを室温 (20~30°C) で1時間から1.5時間放置します。1.5時間以上放置しないでください。**この段階でリステリア属菌の回復を行いません。

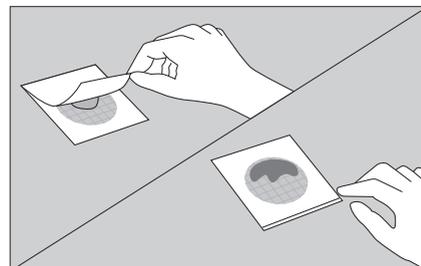
接種



- 7 本プレートを平らな台の上に置いて上部フィルムを持ち上げます。



- 8 検体を3mL下部フィルムの中央部に接種します。

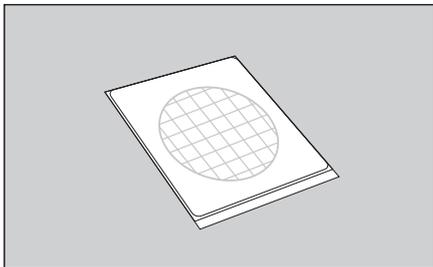


- 9 上部フィルムを液面に沿わせ、気泡が混入しないようにかぶせます。

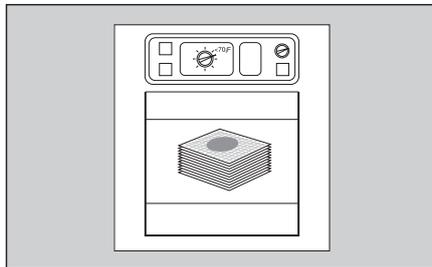
使用者の責任：ペトリフィルム™培地の性能は、全ての微生物、培養条件、食品マトリクスについて評価されたわけではありません。試験方法とその結果がお客様の必要条件を満たすかどうかの判断は、お客様ご自身の責任となります。本判定ガイドの複製が必要な場合、お客様の印刷設定が画像や色の質に影響する場合があります。

培養

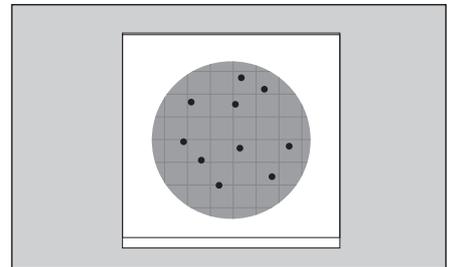
判定



10 ゲルが固化するまで少なくとも**10分間**放置します。



11 透明フィルム側を上にして培養してください。10枚まで重ねて培養することができます。35°C±1°Cまたは37°C±1°Cで**28時間±2時間**培養します。本プレートの乾燥を最小限に抑えるような湿度を保って培養してください。

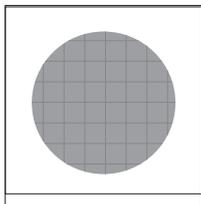


12 本プレートは標準的なコロニーカウンターまたは拡大鏡を用いて測定できます。フォームダム上には選択物質が無いため、フォームダム上に生育したコロニーは測定しないでください。

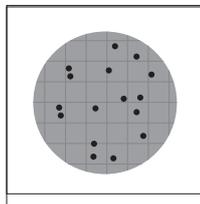
本プレートは定性試験、半定量試験、定量試験の判定が可能です。

13 定性試験

色の濃淡にかかわらず赤紫色のコロニーが検出されたか（陽性）検出されなかったか（陰性）で結果を判定します。



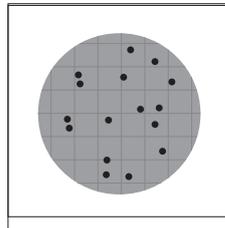
陰性



陽性

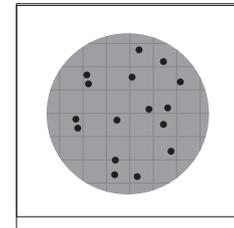
14 半定量試験

色の濃淡にかかわらず、現れた赤紫色のコロニーが相対的に多数・中程度・少数、として結果を判定します。多数・中程度・少数という判定は、検体採取の場所や個々の工場の基準で判断します。

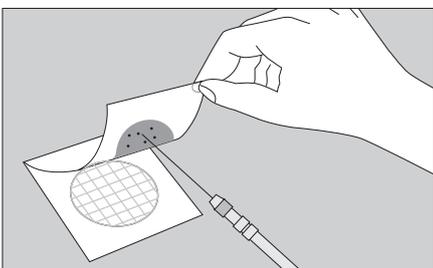


15 定量試験

色の濃淡にかかわらず全ての赤紫色のコロニーを数えてください。面積あたりのコロニー数の計算方法については、このガイド内「定量試験の検査手順について」をよくお読みください。



釣菌



16 本プレートを平らな台の上に置いて上部フィルムを持ち上げます。

定量試験の検査手順

定量検査を行なう場合には、下記の方法で面積あたりのコロニー数を計算します。

以下の点にもご注意ください。

- 検査方法の安定が環境検査から得られる情報の有用性の鍵となります。サンプルを採取する際には、いつも同じ方法で行なってください。可能であれば、同じ技術者が同じタイプの採取器具、定型の面積、同じ採取方法でサンプルを採取するようお勧めします。
- 採取する面積は公的規制、企業内の基準、もしくは、採取する場所などによって決定されますが、最終製品を製造するラインの採取面積は、より広く取ることをお勧めします。
- 環境検査のサンプル採取方法については、下記の文献により詳しい情報があります。

- ◇ 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

定量検査には以下の項目を記録する必要があります。

- サンプル採取場所の面積 (cm²)
- サンプル採取器具 (滅菌綿棒や滅菌綿など) を湿らせた希釈液の量 (mL)
- 加えた緩衝ペプトン水の量 (mL)
- 本プレートに接種した検体の量 (mL)
- 測定したコロニー数

以下の計算式が計算表に当てはめると面積あたりのコロニー数を計算することができます。

計算式

面積あたりのコロニー数 (/cm²) = (測定したコロニー数 × (希釈液の量 (mL) + 緩衝ペプトン水の量 (mL)) ÷ 3 (mL) ÷ 採取場所の面積 (/cm²))

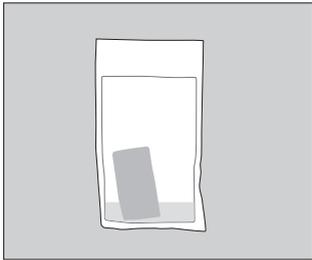
計算表

A. 緩衝ペプトン水の量 + 希釈液の量	
B. 本プレートに接種した量	3
C. A ÷ B	
D. 測定したコロニー数	
E. C × D	
F. 採取した面積	
G. E ÷ F	

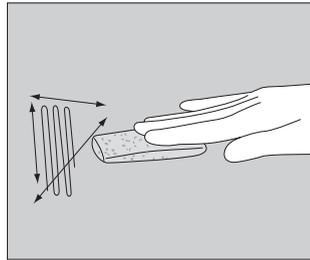
—————→ 面積あたりのコロニー数

定量試験 計算例

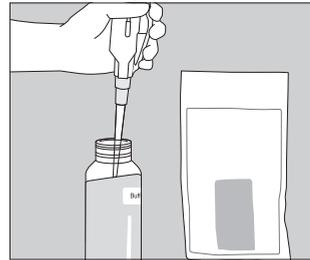
例：スポンジを用いた方法



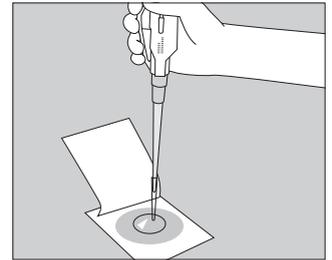
- 1 滅菌バックを用いて10mLの希釈液でスポンジを湿らせます。



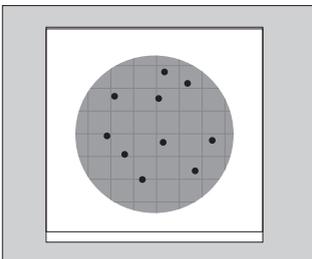
- 2 湿らせたスポンジで30cm四方をふき取ります。



- 3 スポンジを滅菌バックに戻し、5mLの緩衝ペプトン水を加え、約1分間混ぜます。



- 4 サンプルを室温 (20~30°C) で1時間から1.5時間放置し、3mLを本プレートに接種します。

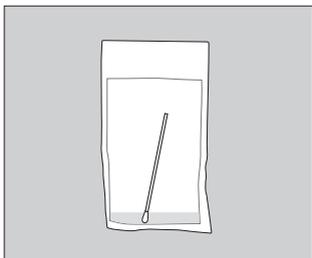


- 5 培養後コロニー数を測定します。(例として測定値を150とします。)

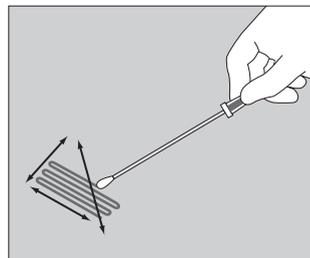
計算表

A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	5+10
B. 本プレートに接種した量	3
C. A÷B	5
D. 測定したコロニー数	150
E. C×D	750
F. 採取した面積	900
G. E÷F	面積あたりのコロニー数：0.8または1 (/cm ²)

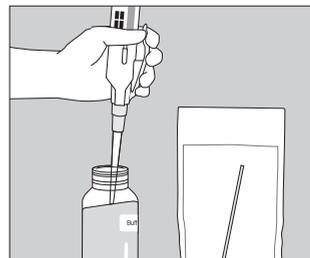
例：綿棒を用いた方法



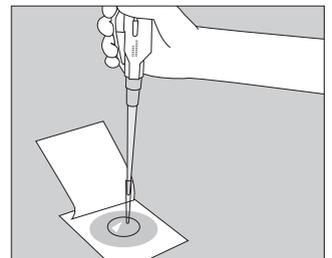
- 1 滅菌バック等を用いて1mLの希釈液で綿棒を湿らせます。



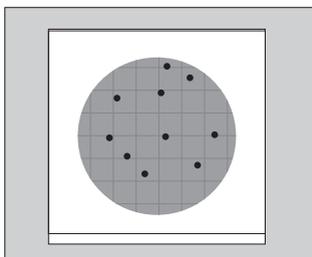
- 2 湿らせた綿棒で10cm四方をふき取ります。



- 3 綿棒を滅菌バックに戻し、5mLの緩衝ペプトン水を加え、約1分間混ぜます。



- 4 サンプルを室温 (20~30°C) で1時間から1.5時間放置し、3mLを本プレートに接種します。



- 5 培養後コロニー数を測定します。(例として測定値を90とします。)

計算表

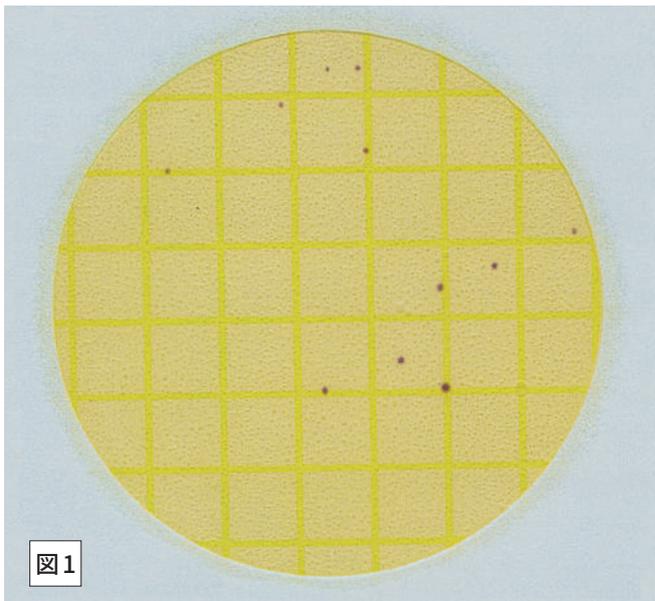
A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	5+1
B. 本プレートに接種した量	3
C. A÷B	2
D. 測定したコロニー数	90
E. C×D	180
F. 採取した面積	100
G. E÷F	面積あたりのコロニー数：1.8または2 (/cm ²)

●ふき取り面積は、以下の資料を参考にしています。

COMPLIANCE GUIDELINES TO CONTROL *Listeria monocytogenes* IN POST-LETHALITY EXPOSED READY-TO-EAT MEAT AND POULTRY PRODUCT, Food Safety and Inspection Service, Washington D.C.,2004

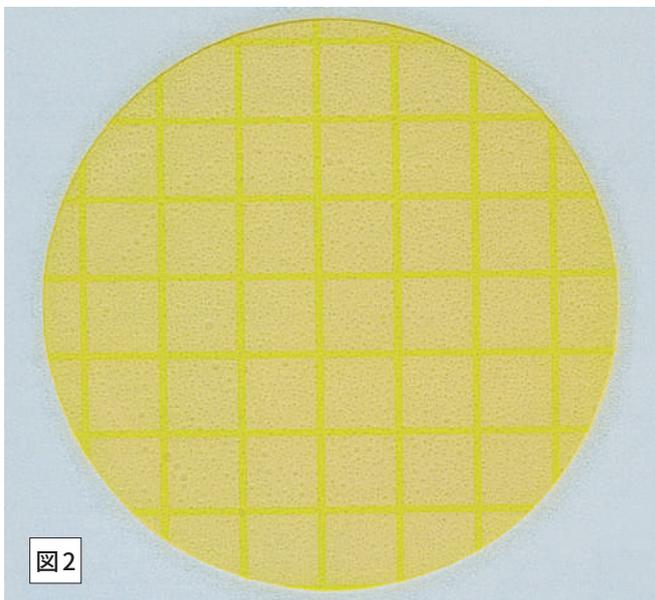
TNTC (Too Numerous to Count : 測定不能多数)

より正確に測定するには、検体をさらに希釈します。



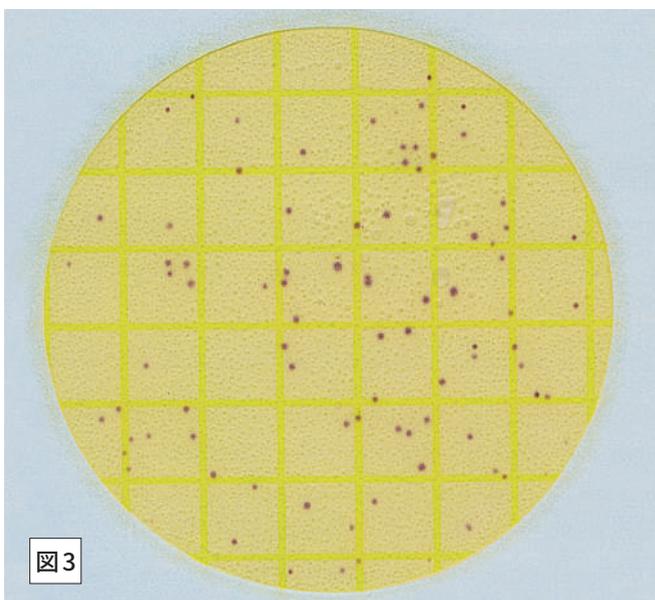
- 定性試験** リステリア属菌陽性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
(例：高い、中程度など)
定量試験 リステリア属菌数 = 11

典型的なリステリア属菌のコロニーが出現した本プレートです。
全ての赤紫色のコロニーを測定します。
本プレートを最長の培養時間より短時間 (26時間~29時間) で培養した後に、薄いピンク色や灰色のコロニーが育生している場合は、これらのコロニーが赤紫色に変化することがあるため最長の培養時間 (30時間) まで培養を続けます。
薄いピンク色や灰色のコロニーが赤紫色に変化する場合があるからです。
30時間の培養後に薄いピンク色や灰色のまま変化の無かったコロニーはリステリア属菌ではありません。
フォームダム上には選択物質が無いため、フォームダム上に育生したコロニーは測定しないでください。



- 定性試験** リステリア属菌陰性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
(例：低い、合格など)
定量試験 リステリア属菌数 = 1未満

30時間培養後でコロニーの無い状態です。
検査は終了です。



- 定性試験** リステリア属菌陽性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
定量試験 リステリア属菌数 = 84

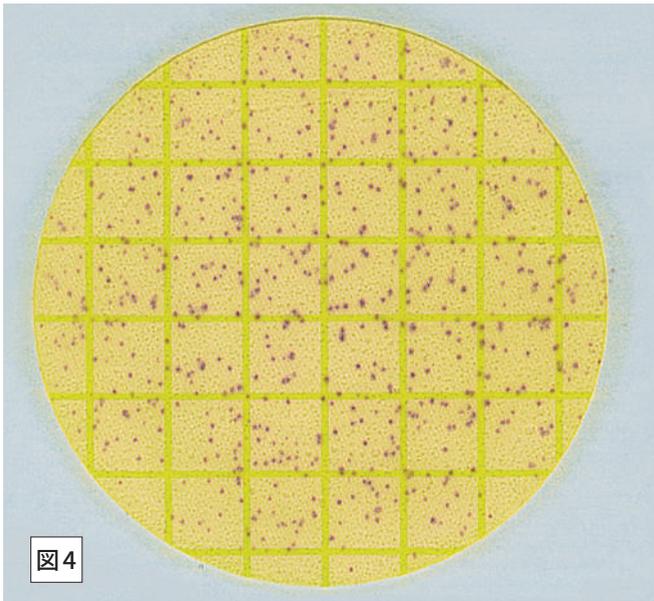


図4

定性試験 リステリア属菌陽性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
定量試験 リステリア属菌の推定菌数 = 600

2つ以上の格子 (1 cm²) のコロニー数を平均し、42倍することで、推定総数を計算します。
 本プレートの接種面積は42cm²です。

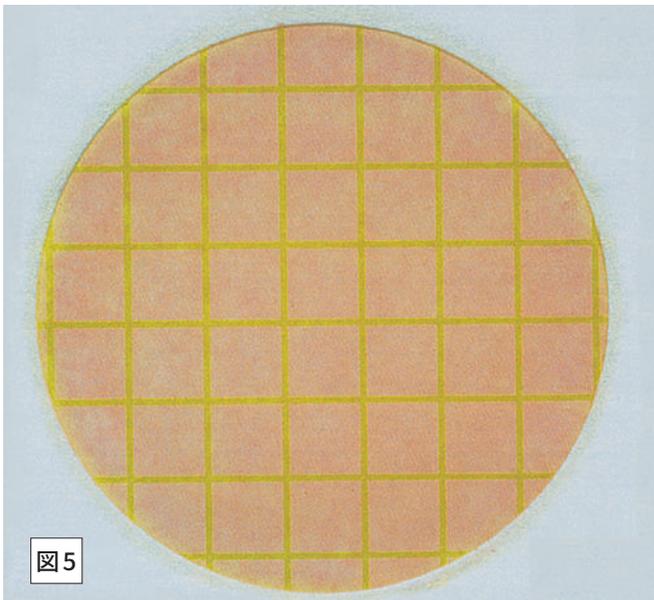


図5

定性試験 リステリア属菌陽性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
定量試験 TNTC (リステリア属菌の推定菌数 = 10⁴)

測定不能多数の本プレートです。本プレート上に多くのコロニーが見える場合や、全体が褐色がかったピンク色に変化する場合もあります。

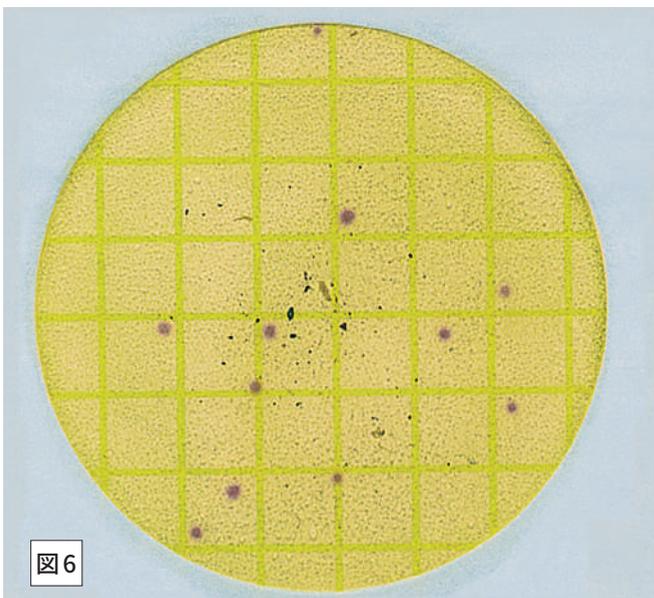


図6

定性試験 リステリア属菌陽性
半定量試験 お客様の判断基準に従って、レベルを記録します。
定量試験 リステリア属菌数 = 11

背景の色は検体の採取方法や、緩衝ペプトン水のメーカーの違いに左右されます。

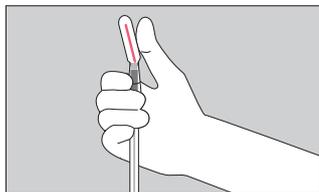
赤紫色のコロニーを測定してください。

残渣は、不規則な形状として認められます。

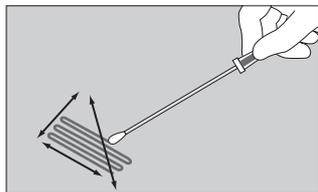
定量試験 計算例

例：クイックスワブを用いた方法

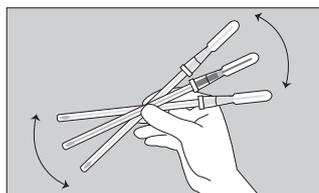
A 湿らせた状態でのふき取り



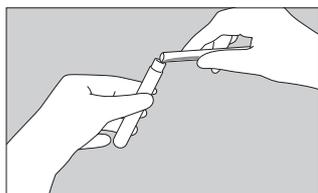
- 1** パウチを開けるまで冷蔵保管してください。有効期限内に使用してください。有効期限はパウチ裏面に印字されています。(製造日より18ヶ月間)



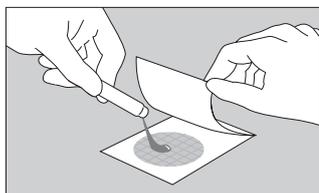
- 2** 湿らせたスワブ部を取り出し、10cm四方をふき取ります。



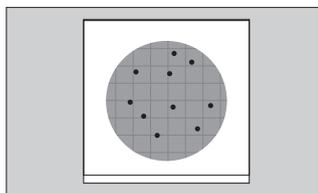
- 3** スワブ部をチューブに戻し、よく振ります。



- 4** 2mLの緩衝ペプトン水にふき取り溶液を全て加えます。

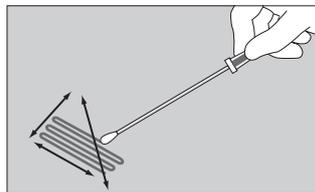


- 5** 溶液を室温(20~30°C)で1時間から1.5時間放置し、全ての溶液を本プレートに接種します。

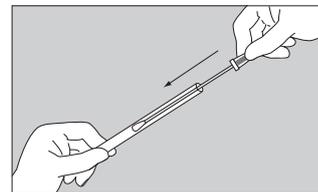


- 6** 培養後コロニー数を測定します。(例として測定値を100とします。)

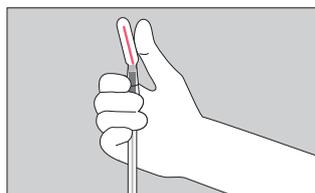
B 乾いた状態でのふき取り



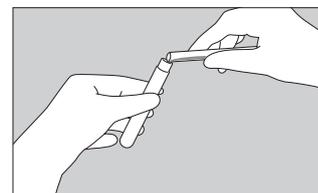
- 1** クイックスワブのスワブ部を取り出し、10cm四方をふき取ります。



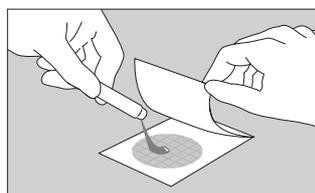
- 2** スワブ部をチューブに戻します。



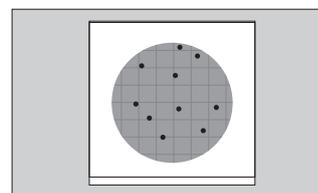
- 3** 上部の赤色スナップバルブを45度まで(またはパチンと音がするまで)曲げ、バルブを絞って下部チューブにリージンを全て流しこみ、よく振ります。



- 4** 2mLの緩衝ペプトン水にふき取り溶液を全て加えます。



- 5** 溶液を室温(20~30°C)で1時間から1.5時間放置し、全ての溶液を本プレートに接種します。



- 6** 培養後コロニー数を測定します。(例として測定値を100とします。)

計算表

A. 緩衝ペプトン水の量+希釈液の量	2+1
B. 本プレートに接種した量	3
C. A÷B	1
D. 測定したコロニー数	100
E. C×D	100
F. 採取した面積	100
G. E÷F	面積あたりのコロニー数：1 (/cm ²)

取