




Petrifilm®

6404/6414/6444

## Product Instructions

 (EN) *E. coli* / Coliform Count Plate

 (FR) Test pour la numération des *E.coli* et Coliformes

**EC**

*E. coli* / Coliform Count

## Product Instructions

### ***E. coli* / Coliform Count Plate**

#### **Product Description and Intended Use**

The Neogen® Petrifilm® *E. coli* / Coliform Count (EC) Plate is a sample-ready-culture medium system which contains modified Violet Red Bile (VRB) nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, an indicator of glucuronidase activity, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (BCIG), and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. Neogen Petrifilm EC Plates are used for the enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*) and coliforms in the food and beverage industries. Neogen Petrifilm EC Plate components are decontaminated though not sterilized. Neogen Food Safety is certified to International Standards Organization (ISO) 9001 for design and manufacturing. Neogen Petrifilm EC Plate has not been evaluated with all possible food products, food processes, testing protocols or with all possible microorganism strains.

#### **Safety**

The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for Neogen Petrifilm EC Plate. Retain the safety instructions for future reference.

**⚠ WARNING:** Indicates a hazardous situation, which, if not avoided, could result in death or serious injury and/or property damage.

#### **⚠ WARNING**

**Do not use this plate for the detection of *E. coli* O157. Because most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and will not be detected on Neogen Petrifilm EC Plates.**

#### **To reduce the risks associated with exposure to biohazards and environmental contamination:**

- Follow current industry standards and local regulations for disposal of biohazardous waste.

#### **To reduce the risks associated with release of contaminated product:**

- Follow all product storage instruction contained in the instructions for use.
- Do not use beyond the expiration date.

#### **To reduce the risks associated with bacterial infection and workplace contamination:**

- Perform Neogen Petrifilm EC Plate testing in a properly equipped laboratory under the control of a skilled microbiologist.
- The user must train personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices<sup>1</sup>, ISO 17025<sup>2</sup> or ISO 7218<sup>3</sup>.

#### **To reduce the risks associated with misinterpretation of results:**

- Neogen has not documented Neogen Petrifilm EC Plates for use in industries other than food and beverage. For example, Neogen has not documented Neogen Petrifilm EC Plates for testing water, pharmaceuticals, or cosmetics.
- Do not use Neogen Petrifilm EC Plates in the diagnosis of conditions in humans or animals.
- The Neogen Petrifilm EC Plates do not differentiate any one microorganism strain from another.

Consult the Safety Data Sheet for additional information.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at [www.neogen.com](http://www.neogen.com) or contact your Neogen representative or authorized distributor.

#### **User Responsibility**

Users are responsible for familiarizing themselves with product instructions and information. Visit our website at [www.neogen.com](http://www.neogen.com), or contact your Neogen representative or authorized distributor for more information.

When selecting a test method, it is important to recognize that external factors such as sampling methods, testing protocols, sample preparation, handling, and laboratory technique may influence results.

It is the user's responsibility in selecting any test method or product to evaluate a sufficient number of samples with the appropriate matrices and microbial challenges to satisfy the user that the chosen test method meets the user's criteria.

It is also the user's responsibility to determine that any test methods and results meet its customers' and suppliers' requirements.

As with any test method, results obtained from use of any Neogen Food Safety product do not constitute a guarantee of the quality of the matrices or processes tested.



## Limitation of Warranties / Limited Remedy

EXCEPT AS EXPRESSLY STATED IN A LIMITED WARRANTY SECTION OF INDIVIDUAL PRODUCT PACKAGING, NEOGEN DISCLAIMS ALL EXPRESS AND IMPLIED WARRANTIES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR USE. If any Neogen Food Safety Product is defective, Neogen or its authorized distributor will, at its option, replace or refund the purchase price of the product. These are your exclusive remedies. You must promptly notify Neogen within sixty days of discovery of any suspected defects in a product and return it to Neogen. Please contact your Neogen representative or authorized Neogen distributor for any further questions.

## Limitation of Neogen Liability

NEOGEN WILL NOT BE LIABLE FOR ANY LOSS OR DAMAGES, WHETHER DIRECT, INDIRECT, SPECIAL, INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO LOST PROFITS. In no event shall Neogen's liability under any legal theory exceed the purchase price of the product alleged to be defective.

## Storage

Store unopened Neogen Petrifilm EC Plate pouches refrigerated or frozen at temperatures lower than or equal to 8°C (46°F). Just prior to use, allow unopened pouches to come to room temperature before opening. Return unused Neogen Petrifilm EC Plates to pouch. Seal by folding the end of the pouch over and applying adhesive tape. **To prevent exposure to moisture, do not refrigerate opened pouches.** Store resealed pouches in a cool dry place for no longer than four weeks. It is recommended that resealed pouches of Neogen Petrifilm EC Plates be stored in a freezer (see below) if the laboratory temperature exceeds 25°C (77°F) and/or the laboratory is located in a region where the relative humidity exceeds 50% (with the exception of air-conditioned premises).

To store opened pouches in a freezer, place Neogen Petrifilm EC Plates in a sealable container. To remove frozen Neogen Petrifilm EC Plates for use, open the container, remove the plates that are needed and immediately return remaining plates to the freezer in the sealed container for the remainder of the shelf life. Neogen Petrifilm EC Plates should not be used past their expiration date. The freezer that is used for open pouch storage must not have an automatic defrost cycle as this would repeatedly expose the plates to moisture which can damage the plates.

Do not use Neogen Petrifilm EC Plates that show discoloration. Expiration date and lot number are noted on each package of Neogen Petrifilm EC Plates. The lot number is also noted on individual plates Neogen Petrifilm EC Plates.

## ⚠ Disposal

After use, Neogen Petrifilm EC Plates may contain microorganisms that may be a potential biohazard. Follow current industry standards for disposal.

## Instructions for Use

### Sample Preparation

1. Use appropriate sterile diluents:

Butterfield's phosphate buffered dilution water<sup>4</sup>, 0.1% peptone water, peptone salt diluent, quarter-strength Ringer's solution, saline solution (0.85-0.90%), Neogen® Wide-Spectrum Neutralizer, bisulfite-free letheen broth or distilled water.

**Do not use diluents containing citrate, bisulfite or thiosulfate with Neogen Petrifilm EC Plates; they can inhibit growth.** If citrate buffer is indicated in the standard procedure, substitute with one of the buffers listed above, warmed to 40-45°C.

2. Blend or homogenize sample.
3. For optimal growth and recovery of microorganisms, adjust the pH of the sample suspension to 6.6 - 7.2. For acidic products, adjust the pH with 1N NaOH. For alkaline products, adjust the pH with 1N HCl.

### Plating

1. Place the Neogen Petrifilm EC Plate on a flat, level surface.
2. Lift the top film and with the pipette perpendicular to the inoculation area dispense 1 mL of sample suspension onto the center of bottom film.
3. Roll the top film down onto the sample to prevent trapping air bubbles.
4. Place the Neogen® Petrifilm® Spreader with the flat side down on the center of the plate. Press gently on the center of the Neogen Petrifilm Spreader to distribute the sample evenly. Spread the inoculum over the entire Neogen Petrifilm EC Plate growth area before the gel is formed. Do not slide the Neogen Petrifilm Spreader across the film.
5. Remove the Neogen Petrifilm Spreader and leave the Neogen Petrifilm EC Plate undisturbed for at least one minute to permit the gel to form.

### Incubation

Incubate Neogen Petrifilm EC Plates in a horizontal position with the clear side up in stacks of no more than 20 plates. Several incubation times and temperatures can be used depending on current local reference methods, some of which are listed in the "**Specific Instructions for Validated Methods**" section.



## Interpretation

1. Neogen Petrifilm EC Plates can be counted using a standard colony counter or other illuminated magnifier. Do not count colonies on the foam dam since they are removed from the selective influence of the medium. Do not count artifact bubbles that may be present.

The interpretation of *E. coli* colonies on the Neogen Petrifilm EC Plate is as follows:

AOAC Official Methods (998.08 and 991.14) – enumerate blue to red-blue colonies associated with entrapped gas, regardless of size or intensity of color, as confirmed *E. coli*. Blue colonies without gas are not counted as *E. coli*.

Other coliform colonies are red and closely associated (within one colony diameter) with entrapped gas. Colonies not associated with gas (a distance greater than one colony diameter between colony and gas bubble) are not counted as coliforms. The total coliform count consists of both the red and blue colonies associated with gas at 24 hours. Anytime within the validated method incubation period that a blue colony associated with gas appears, it is a confirmed *E. coli*.

## ▲ WARNING

**Do not use this plate for the detection of *E. coli* O157. Because most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and will not be interpreted as *E. coli* on Neogen Petrifilm EC Plates.**

2. The circular growth area is approximately 20 cm<sup>2</sup>. Estimates can be made on plates containing greater than 150 colonies by counting the number of colonies in one or more representative squares and determining the average number per square. Multiply the average number by 20 to determine the estimated count per plate.
3. When present in large numbers, Neogen Petrifilm EC Plates may have one or more of the following characteristics: a deepening of the gel color with many small, indistinct colonies; and many gas bubbles. High concentrations of *E. coli* will cause the growth area to turn blue, while high concentrations of coliforms (non-*E. coli*) will cause the growth area to turn dark red. When this occurs, record results as too numerous to count (TNTC). When an actual count is required, plate at a higher dilution.
4. Where necessary, colonies may be isolated for further identification. Lift the top film using proper testing technique and pick the colony from the gel. Test using standard procedures.
5. If the plates cannot be counted within 1 hour of removal from the incubator, they may be stored for later enumeration by freezing in a sealable container at temperatures lower than or equal to negative 15°C for no longer than one week.

For further information refer to the “Neogen® Petrifilm® *E. coli*/Coliform Count Plate Interpretation Guide”. If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at [www.neogen.com](http://www.neogen.com) or contact your Neogen representative or authorized distributor.

## Specific Instructions for Validated Methods

**AOAC® Official Methods<sup>SM</sup>** (998.08 Confirmed *Escherichia coli* Counts in Poultry, Meats and Seafood, Dry Rehydratable Film Method)

Incubate Neogen Petrifilm EC Plates 24 hours ± 2 hours at 35°C ± 1°C.

**AOAC® Official Methods<sup>SM</sup>** (991.14 Coliform and *Escherichia coli* Counts in Foods, Dry Rehydratable Film Methods)

For coliform results incubate Neogen Petrifilm EC Plates 24 hours ± 2 hours at 35°C ± 1°C.

For *E. coli* results incubate Neogen Petrifilm EC Plates an additional 24 hours ± 2 hours (48 hours ± 4 hours total) at 35°C ± 1°C.

## References

1. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
2. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
3. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
4. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th Edition, Revision A, 1998. Reagents Index for BAM found at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm055791.htm>.
5. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

## Explanation of Symbols

[info.neogen.com/symbols](http://info.neogen.com/symbols)

AOAC is a registered trademark of AOAC INTERNATIONAL  
Official Methods is a service mark of AOAC INTERNATIONAL

# Neogen Food Safety

## Neogen Corporation

620 Leshar Place  
Lansing, MI 48912 USA  
Neogen.com

## Neogen Europe Ltd.

The Dairy School  
Auchincruive  
Ayr, KA6 5HU  
Scotland, UK

## Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray  
Co. Wicklow  
A98YV29, Ireland



## Neogen Corporation

620 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA  
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.  
Neogen and Petrifilm are registered trademarks of Neogen Corporation.  
FS00850A

## Instructions relatives au produit

# Test pour la numération des *E.coli* et Coliformes

### Description du Produit et Utilisation Prévue

Le Test Neogen® Petrifilm® pour la numération des *E. coli* et Coliformes (EC) est un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient des éléments nutritifs VRB (cristal violet, rouge neutre, bile), un agent gélifiant soluble dans l'eau froide, un indicateur d'activité glucuronidase, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (BCIG), ainsi qu'un indicateur au tétrazolium facilitant le dénombrement des colonies. Les Tests Neogen Petrifilm EC sont utilisés pour la numération des *Escherichia coli* (*E. coli*) et des coliformes, dans les secteurs de l'alimentation et des boissons. Les composants du Test Neogen Petrifilm EC sont décontaminés, mais pas stérilisés. Neogen Sécurité Alimentaire respecte les normes ISO 9001 en matière de conception et de fabrication. Les Tests Neogen Petrifilm EC n'ont pas été testés avec la totalité des produits alimentaires, des processus de transformation des aliments, des protocoles d'analyse ou des souches possibles de micro-organismes.

### Consignes de Sécurité

L'utilisateur doit lire attentivement, comprendre et respecter toutes les consignes de sécurité fournies dans le mode d'emploi du Test Neogen Petrifilm EC. Conserver ces consignes de sécurité pour référence ultérieure.

**⚠ AVERTISSEMENT :** indique une situation dangereuse pouvant entraîner un décès, des blessures graves ou des dommages matériels.

### ⚠ AVERTISSEMENT

**Ne pas utiliser ce test pour la détection de la souche d'*E. coli* O157. Étant donné que la plupart des souches d'*E. coli* O157 sont atypiques, elles sont par exemple glucuronidase négatives, elles ne produiront pas de couleur bleue et ne seront pas détectées par les Tests Neogen Petrifilm EC.**

**Afin de réduire les risques associés à une exposition à des substances biologiques dangereuses et à une contamination de l'environnement :**

- Suivre les normes industrielles actuelles ainsi que la réglementation locale pour le traitement des déchets contaminés.

**Afin de réduire les risques associés à la diffusion de produits contaminés :**

- Suivre toutes les instructions relatives à la conservation du produit mentionnées dans les instructions d'utilisation.
- Ne pas utiliser au-delà de la date de péremption.

**Afin de réduire les risques associés à l'infection bactérienne et à la contamination du lieu de travail :**

- Effectuer les analyses au moyen du Test Neogen Petrifilm EC dans un laboratoire correctement équipé, sous la surveillance d'un microbiologiste compétent.
- L'utilisateur doit former le personnel de manière appropriée aux techniques d'analyse actuelles : par exemple, les bonnes pratiques de laboratoire<sup>1</sup>, les normes ISO 17025<sup>2</sup> ou ISO 7218<sup>3</sup>.

**Afin de réduire les risques associés à une mauvaise interprétation des résultats :**

- Neogen n'a pas documenté l'utilisation de ses Tests Neogen Petrifilm EC dans des secteurs autres que l'industrie alimentaire et les boissons. Neogen n'a, par exemple, pas documenté l'utilisation de ses Tests Neogen Petrifilm EC pour l'analyse de l'eau, des produits pharmaceutiques ou des cosmétiques.
- Ne pas utiliser les Tests Neogen Petrifilm EC pour réaliser des diagnostics sur l'homme ou l'animal.
- Les Tests Neogen Petrifilm EC ne permettent pas de faire de distinction entre différentes souches de micro-organismes.

Consulter la fiche de données de sécurité du produit pour plus de renseignements.

Si vous avez des questions au sujet d'applications ou de procédures spécifiques, veuillez visiter notre site Web à l'adresse [www.neogen.com](http://www.neogen.com) ou contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé.

### Responsabilité de L'utilisateur

Il incombe aux clients et aux utilisateurs de connaître les instructions et les informations. Visitez notre site Web à l'adresse [www.neogen.com](http://www.neogen.com) ou contactez votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé pour plus d'informations.

Lors du choix d'une méthode de test, il est important d'admettre que des facteurs externes comme les méthodes d'échantillonnage, les protocoles de test, la préparation des échantillons, la manipulation et les techniques de laboratoires peuvent influencer les résultats.

Il incombe à l'utilisateur de sélectionner une méthode d'analyse pour évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les épreuves microbiennes appropriées afin de garantir que la méthode d'analyse réponde aux critères de l'utilisateur.

Il incombe également à l'utilisateur de déterminer si une méthode d'analyse et ses résultats répondent aux exigences de ses clients ou fournisseurs.

Comme avec n'importe quelle méthode de test, les résultats obtenus avec ce produit ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou des processus testés.

### Limitation de garantie/Limites de Recours

SAUF SI EXPRESSÉMENT ÉTABLI DANS LA SECTION DE GARANTIE LIMITÉE D'UN EMBALLAGE DE PRODUIT INDIVIDUEL, NEOGEN RENONCE À TOUTE GARANTIE EXPLICITE ET IMPLICITE, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, TOUTE GARANTIE DE COMMERCIALISATION OU D'ADAPTATION POUR UN USAGE SPÉCIFIQUE. En cas de défaut de tout produit de Sécurité Alimentaire Neogen, Neogen ou son distributeur agréé s'engage, à son entière discrétion, au remplacement ou au remboursement du prix d'achat du produit. Il s'agit de vos recours exclusifs. Tout défaut supposé du produit devra être notifié à Neogen dans un délai de soixante jours et le produit renvoyé au fournisseur. Merci de contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé pour toute autre question.

### Limitation de Responsabilité de Neogen

NEOGEN NE SERA PAS TENUE RESPONSABLE DES PERTES OU DES DOMMAGES ÉVENTUELS, QU'ILS SOIENT DIRECTS, INDIRECTS, SPÉCIFIQUES, ACCIDENTELS OU CONSÉCUTIFS, Y COMPRIS, MAIS SANS S'Y LIMITER, LES PERTES DE PROFITS. En aucun cas et en aucune manière, la responsabilité de Neogens ne sera engagée au-delà du prix d'achat du produit prétendu défectueux.

### Stockage

Conserver les poches de Tests Neogen Petrifilm EC non ouvertes, réfrigérées ou congelées, à des températures inférieures ou égales à 8 °C (46 °F). Immédiatement avant utilisation, les laisser atteindre la température ambiante avant de les ouvrir. Replacer les Tests Neogen Petrifilm EC non utilisés dans leur poche. Refermer hermétiquement les poches ouvertes avec un ruban adhésif, après avoir plié sur lui-même le côté ouvert. **Ne pas réfrigérer les poches ouvertes pour éviter une exposition à l'humidité.** Conserver les poches refermées dans un endroit frais et sec quatre semaines au maximum. Lorsque la température d'un laboratoire dépasse 25 °C (77 °F), et/ou que ce laboratoire est situé dans une région où l'humidité relative dépasse 50 % (à l'exception des locaux climatisés), il est recommandé de conserver les poches de Tests Neogen Petrifilm EC refermées au congélateur, comme indiqué ci-dessous.

Pour conserver les poches ouvertes de Tests Neogen Petrifilm EC dans un congélateur, les placer dans un récipient étanche. Pour retirer les Tests Neogen Petrifilm EC congelées et les utiliser, ouvrez le récipient, retirez les plaques nécessaires et remettez immédiatement les plaques restantes au congélateur dans le récipient scellé pour le reste de la durée de conservation. Les Tests Neogen Petrifilm EC ne doivent pas être utilisés après leur date de péremption. Le congélateur utilisé pour la conservation des poches ouvertes ne doit pas posséder de cycle de dégivrage automatique ; en effet, les tests pourraient être endommagés en raison d'une exposition répétée à l'humidité.

Ne pas utiliser les Tests Neogen Petrifilm EC qui présentent des signes de décoloration. La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chacune des poches de Tests Neogen Petrifilm EC. Le numéro de lot est également indiqué sur chaque Test Neogen Petrifilm EC.

### ⚠ Mise au Rebut

Après usage, les Tests Neogen Petrifilm EC peuvent contenir des micro-organismes susceptibles de présenter un risque biologique. Respecter les normes en vigueur concernant l'élimination des déchets.

## Instructions D'utilisation

### Préparation de l'échantillon

1. Utiliser des diluants stériles appropriés :

Eau de dilution tamponnée au phosphate de Butterfield<sup>4</sup>, eau de peptone à 0,1 %, diluant de sel de peptone, solution de Ringer diluée au quart, solution saline (0,85-0,90 %), neutralisant à large spectre Neogen<sup>®</sup>, bouillon de letheen sans bisulfite ou eau distillée.

**Ne pas utiliser de diluants contenant du citrate, du bisulfite ou du thiosulfate avec les Tests Neogen Petrifilm EC, car ils peuvent inhiber la croissance.** Si une solution tampon au citrate est indiquée dans la procédure standard, la remplacer par l'un des tampons cités plus haut, réchauffé à une température de 40 à 45 °C.

2. Mélanger ou homogénéiser l'échantillon.

3. Pour obtenir des conditions de croissance et de recouvrement optimales des micro-organismes, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6,6 et 7,2. Pour les produits acides, ajuster le pH avec NaOH 1 N. Pour les produits alcalins, ajuster le pH avec HCl 1 N.

### Utilisation des tests

1. Placer le Test Neogen Petrifilm EC sur une surface de travail plane et régulière.

2. Soulever le film supérieur et, en tenant la pipette perpendiculairement à la zone d'inoculation, déposer 1 ml d'échantillon dilué au centre du film inférieur.



3. Recouvrir délicatement l'échantillon avec le film supérieur pour éviter de piéger des bulles d'air.
4. Placer le Neogen® Petrifilm® Diffuseur face plane au contact du test, et au centre du test. Répartir l'échantillon uniformément en exerçant une légère pression au centre du Neogen Petrifilm Diffuseur. Répartir l'inoculum sur la totalité de la zone de croissance du Test Neogen Petrifilm EC, avant que le gel ne se forme. Ne pas faire glisser le Neogen Petrifilm Diffuseur sur le film.
5. Retirer le Neogen Petrifilm Diffuseur et laisser reposer le Test Neogen Petrifilm EC durant au moins une minute, afin de laisser le gel se former.

### Incubation

Laisser incuber les Tests Neogen Petrifilm EC à l'horizontale, film transparent vers le haut, en veillant à ne pas empiler plus de 20 tests. Plusieurs durées et températures d'incubation peuvent être utilisées en fonction des méthodes de référence locales en vigueur. Certaines d'entre elles sont répertoriées dans la section « **Instructions spécifiques pour méthodes validées** ».

### Interprétation

1. La numération à l'aide des Tests Neogen Petrifilm EC peut se faire au moyen d'un compteur de colonies standard ou d'une autre loupe à éclairage. Ne pas dénombrer les colonies présentes sur le pourtour en mousse, la sélectivité du milieu y étant modifiée. Ne pas tenir compte des bulles artefacts qui étaient éventuellement présentes avant l'incubation.

L'interprétation des colonies d'*E. coli* à l'aide du Test Neogen Petrifilm EC s'effectue de la manière suivante :

AOAC Official Methods (998.08 et 991.14) : compter les colonies bleues à rouge-bleu associées à des bulles de gaz comme des *E. coli* confirmés, quelle que soit la taille ou l'intensité de la couleur. Les colonies bleues sans bulles de gaz ne sont pas des *E. coli*.

Les autres colonies de coliformes sont rouges et sont étroitement associées à des bulles de gaz (situées à une distance inférieure ou égale au diamètre de la colonie). Les colonies non associées à des bulles de gaz (ou qui sont éloignées des bulles d'une distance supérieure au diamètre de la colonie) ne sont pas comptées comme coliformes. Le nombre total de coliformes est égal à la somme des colonies rouges et bleues associées à des bulles de gaz après 24 heures. Au cours de la période d'incubation (variable selon la méthode validée choisie), toute colonie bleue associée à des bulles de gaz correspond à des *E. coli* confirmés.

## ▲ AVERTISSEMENT

**Ne pas utiliser ce test pour la détection de la souche d'*E. coli* O157. Étant donné que la plupart des souches d'*E. coli* O157 sont atypiques, elles sont par exemple glucuronidase négatives, elles ne produiront pas de couleur bleue et ne seront pas détectées comme étant des *E. coli* par les Tests Neogen Petrifilm EC.**

2. La zone de croissance circulaire est de 20 cm<sup>2</sup> environ. Des estimations sont possibles sur les tests contenant plus de 150 colonies en comptant le nombre de colonies dans un ou plusieurs carrés représentatifs et en déterminant le nombre moyen par carré. Multiplier ce nombre moyen par 20 pour déterminer le nombre estimé par test.
3. Lorsque le nombre de colonies est élevé, les Tests Neogen Petrifilm EC peuvent présenter une ou plusieurs des caractéristiques suivantes : un assombrissement de la couleur du gel, associé à un grand nombre de petites colonies indistinctes et de bulles de gaz. De fortes concentrations d'*E. coli* entraîneront une coloration bleue de la zone de croissance, tandis que de fortes concentrations de coliformes (autres que *E. coli*) entraîneront une coloration rouge foncé de la zone de croissance. Lorsque l'un de ces phénomènes se produit, enregistrer le résultat comme incomptable. Lorsqu'un dénombrement plus précis est requis, recommencer l'analyse sur des dilutions plus élevées de l'échantillon.
4. Si nécessaire, les colonies peuvent être isolées pour être identifiées. Soulever le film supérieur selon une technique d'analyse appropriée et prélever la colonie de la surface du gel. Utiliser les procédures standard d'analyse.
5. Si les tests ne peuvent pas être lus dans l'heure qui suit leur sortie de l'incubateur, ils peuvent être stockés congelés, dans un récipient étanche, à une température inférieure ou égale à -15 °C, pendant une semaine au maximum, pour permettre d'en différer la lecture.

Pour toute information complémentaire, se reporter au « Guide d'interprétation du Test Neogen® Petrifilm® pour la numération des *E. coli* et coliformes ». Si vous avez des questions au sujet d'applications ou de procédures spécifiques, veuillez visiter notre site Web à l'adresse [www.neogen.com](http://www.neogen.com) ou contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé.

### Instructions spécifiques pour méthodes validées

**AOAC® Official Methods<sup>SM</sup>** (998.08 Méthode de numération d'*Escherichia coli* confirmés, dans la volaille, la viande et les fruits de mer, sur film sec réhydratable)

Laisser incuber les Tests Neogen Petrifilm EC pendant 24 heures ± 2 heures à 35 °C ± 1 °C.

**AOAC® Official Methods<sup>SM</sup>** (991.14 Méthodes de numération des coliformes et des *Escherichia coli* dans tout type d'aliments sur film sec réhydratable)

Pour la détection de coliformes, incuber les Tests Neogen Petrifilm EC pendant 24 heures ± 2 heures à 35 °C ± 1 °C.

Pour la détection des *E. coli*, incuber les Tests Neogen Petrifilm EC pendant encore 24 heures ± 2 heures (soit 48 heures ± 4 heures au total) à 35 °C ± 1 °C.



## Références

1. U.S. Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations, Title 21, Part 58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies.
2. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
3. ISO 7218. Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations.
4. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), 8th Edition, Revision A, 1998. Reagents Index for BAM found at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm055791.htm>.
5. ISO 6887. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.

## Explication des Symboles

[info.neogen.com/symbols](http://info.neogen.com/symbols)

AOAC est une marque déposée d'AOAC INTERNATIONAL

Official Methods est un service déposé de l'AOAC INTERNATIONAL

# Neogen Food Safety

## Neogen Corporation

620 Leshar Place  
Lansing, MI 48912 USA  
Neogen.com

## Neogen Europe Ltd.

The Dairy School  
Auchincruive  
Ayr, KA6 5HU  
Scotland, UK

## Neogen Ireland, Ltd.

Bray Business Park, Bray  
Co. Wicklow  
A98YV29, Ireland



## Neogen Corporation

620 Leshar Place Lansing, MI 48912 USA  
www.neogen.com

© Neogen Corporation 2024. All rights reserved.  
Neogen and Petrifilm are registered trademarks of Neogen Corporation.  
FS00850A



Petrifilm®

# Interpretation Guide

The Neogen® Petrifilm® *E. coli*/Coliform Count Plate is a sample-ready culture medium system which contains modified Violet Red Bile (VRB) nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, an indicator of glucuronidase activity, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-glucuronide (BCIG), and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates are used for the enumeration of *Escherichia coli* (*E. coli*) and coliforms in the food and beverage industries.



**EC**

*E. coli*/Coliform Count Plate

The United States Food and Drug Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual (BAM) defines coliforms as Gram-negative rods, which produce acid and gas from lactose fermentation.

Most *E. coli* (about 97%) produce beta-glucuronidase which produces a blue precipitate associated with the colony indicated by the blue to red-blue colonies. The top film traps gas produced by the lactose fermenting coliforms and *E. coli*. About 95% of *E. coli* produce gas, as indicated by colonies associated with entrapped gas (within approximately one colony diameter). Blue colonies without gas are not counted as *E. coli*.<sup>\*</sup> Other coliform colonies are red and closely associated with entrapped gas. The total coliform count consists of both the red and blue colonies associated with gas.<sup>\*</sup>

Most *E. coli* O157 strains are atypical, for example they are glucuronidase negative, they will not produce a blue color, and will not be interpreted as *E. coli* on Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates.

<sup>\*</sup>Validated through AOAC® Official Methods of Analysis<sup>SM</sup> program. The definition of *E. coli* and coliform varies by regional method. In particular, the confirmation of *E. coli* may vary by country.

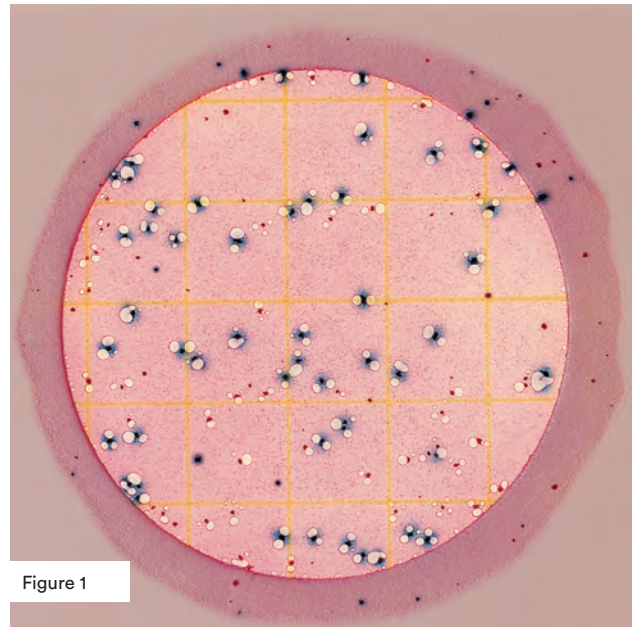


Figure 1

***E. coli* count = 49 (blue colonies with gas)**  
**Total coliform count = 87 (red and blue colonies with gas)**

All figures have been counted according to AOAC® Official Methods of Analysis<sup>SM</sup> #998.08 and #991.14. The confirmation of *E. coli* may vary by country.

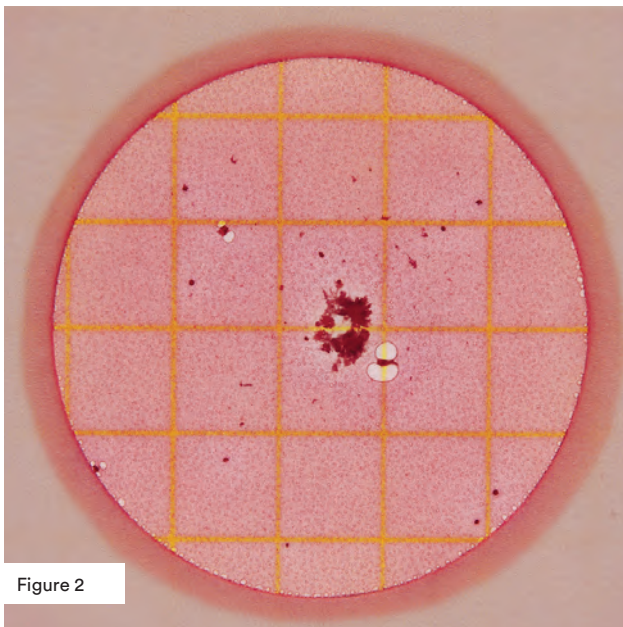


Figure 2

**Total coliform count = 3 (red colonies with gas)**

Food particles are irregularly shaped and are not associated with gas bubbles.

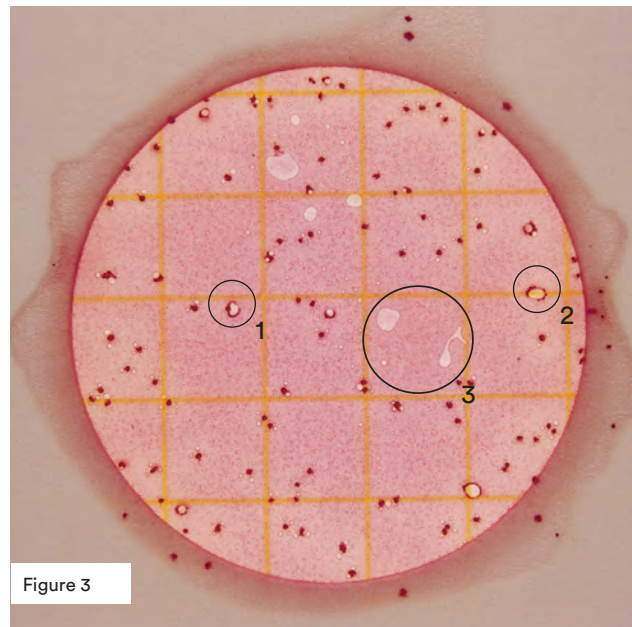


Figure 3

**Estimated total coliform count = 150**

The recommended counting limit on a Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plate is 150 colonies. Bubble patterns may vary. Gas may disrupt the colony so that the colony “outlines” the bubble. See Circles 1 and 2. Artifact bubbles may result from improper inoculation or from trapped air within the sample. They are irregularly shaped and are not associated with a colony. See Circle 3.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

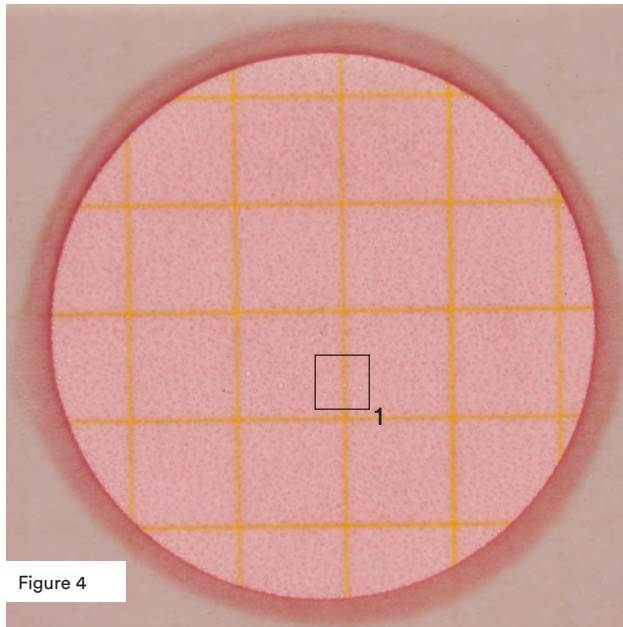


Figure 4

**No growth = 0**

Notice the changes in gel color in Figures 4 through 10. As the *E. coli* or coliform count increases, the color of the gel turns to dark red or purple-blue. Background bubbles are a characteristic of the gel and are not a result of *E. coli* or coliform growth. See Square 1.

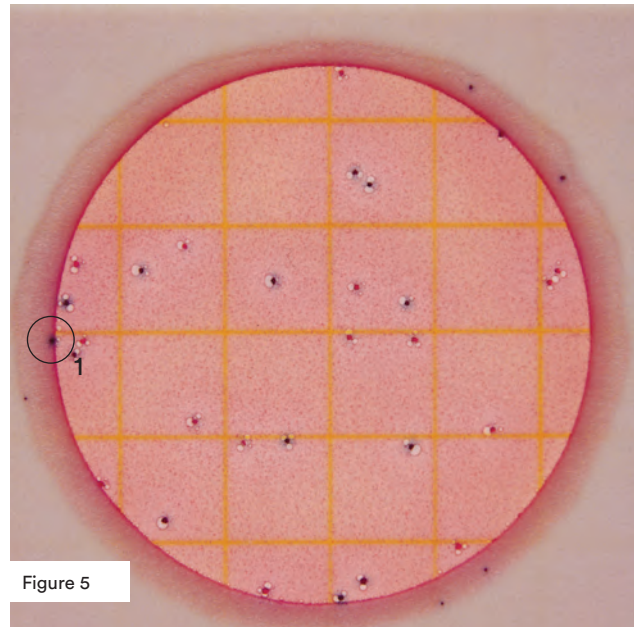


Figure 5

***E. coli* count = 13 (blue colonies with gas)**

**Total coliform count = 28 (red and blue colonies with gas)**

Do not count colonies that appear on the foam barrier because they are removed from the selective influence of the medium. See Circle 1.

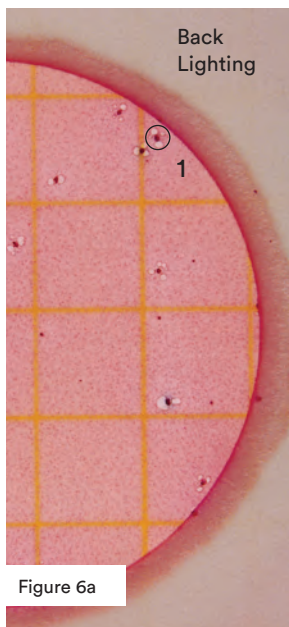


Figure 6a

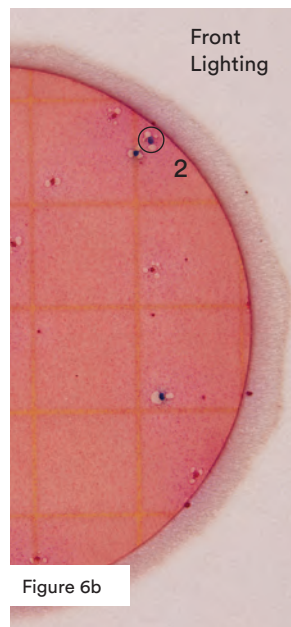


Figure 6b

***E. coli* count = 3 (blue colonies with gas)**

Any blue in a colony (blue to red-blue) with gas indicates the presence of *E. coli*. Front lighting may enhance the detection of blue precipitate formed by a colony. Circle 1 shows a red-blue colony counted using back lighting. Circle 2 shows the same colony with front lighting. The blue precipitate is more evident in Circle 2.

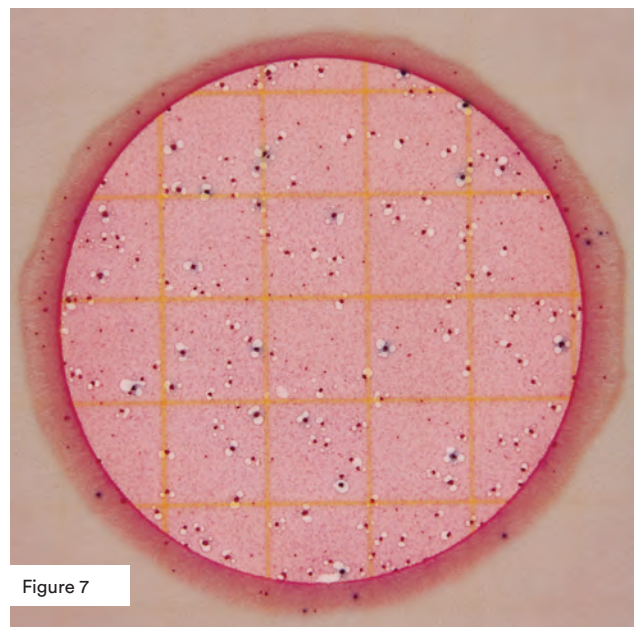


Figure 7

**Estimated *E. coli* = 17 (blue colonies with gas)**

**Estimated total coliform count = 150**

The circular growth area is approximately 20cm<sup>2</sup>. Estimates can be made on plates containing greater than 150 colonies by counting the number of colonies in one or more representative squares and determining the average number per square. Multiply the average number by 20 to determine the estimated count per plate.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

# Too Numerous to Count (TNTC)

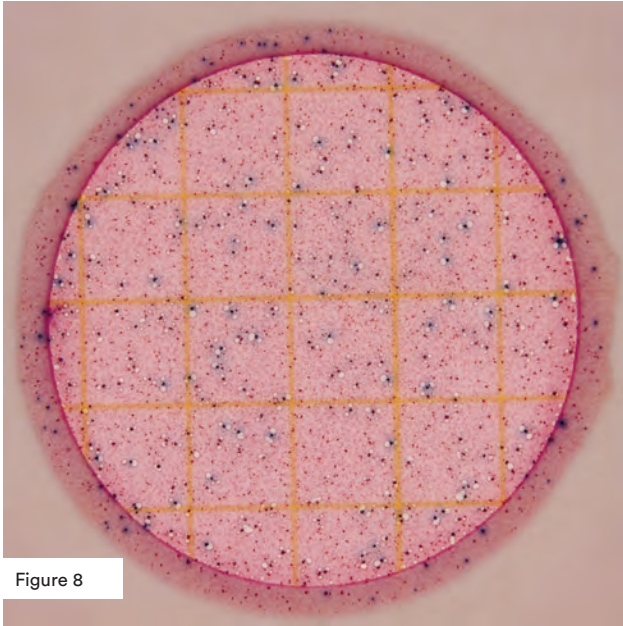


Figure 8

## Total coliform count = TNTC

Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates with colonies that are too numerous to count (TNTC) have one or more of the following characteristics: many small colonies, many gas bubbles and a deepening of the gel color from red to purple-blue.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

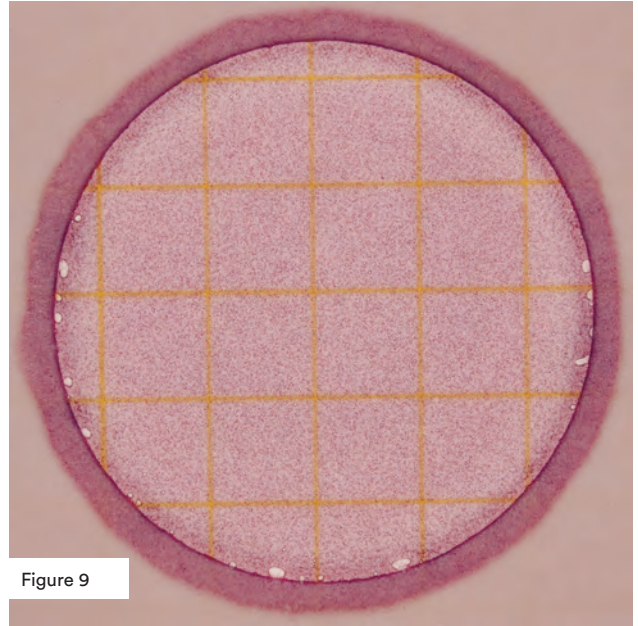


Figure 9

## Total coliform count = TNTC

High concentrations of *E. coli* may cause the growth area to turn purple-blue.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

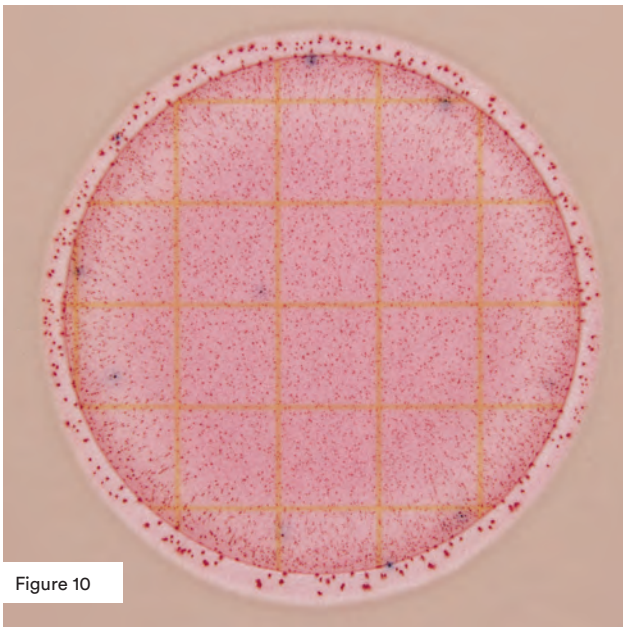


Figure 10

## Total coliform count = TNTC

High concentration of coliforms may cause a deepening of the gel color and many small, indistinct colonies.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

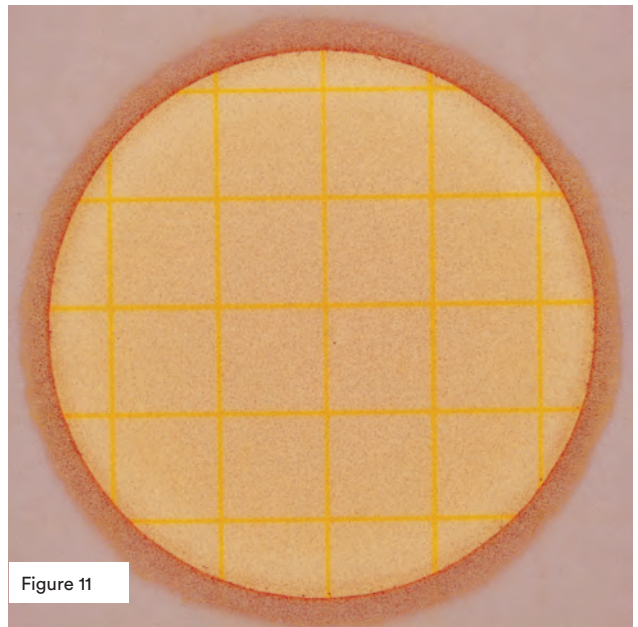


Figure 11

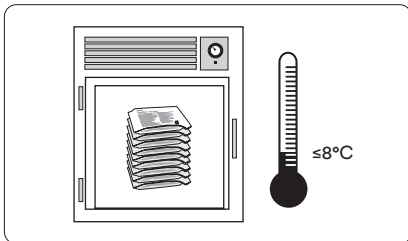
## Total coliform count = TNTC

When high numbers of non-coliform organisms such as *Pseudomonas* are present on Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates, the gel may turn yellow.

*For a more accurate count, further dilution of the sample may be necessary.*

# Reminders For Use

## Storage



**01**

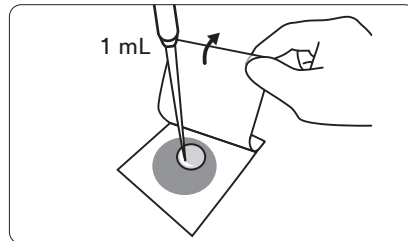
Store the unopened pouches of plates at frozen or refrigerated temperatures  $\leq 8^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 46^{\circ}\text{F}$ ). Use before expiration date on package. It is best to allow pouches to reach room temperature before opening.



**02**

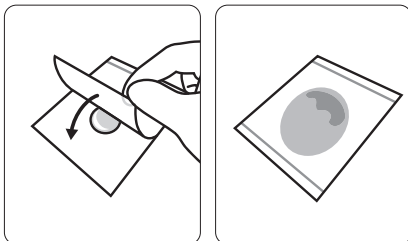
Seal by folding the end of the pouch over and applying adhesive tape. **To prevent exposure to moisture, do not refrigerate opened pouches.** Store sealed pouches in a cool dry place for no longer than four weeks.

## Inoculation



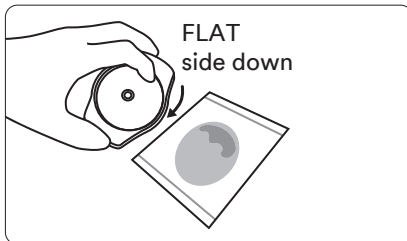
**03**

Place the Petrifilm *E.coli*/Coliform Count Plate on a level surface. Lift the top film and, with the pipette perpendicular to the inoculation area, dispense 1 mL of sample suspension onto the center of the bottom film.



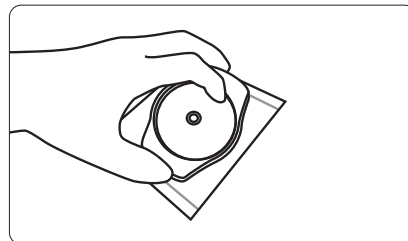
**04**

Roll the top film down onto sample gently to prevent pushing sample off film and to avoid entrapping air bubbles.



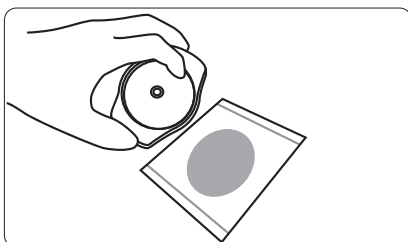
**05**

With flat side down, place Petrifilm Spreader on the center of the Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plate.



**06**

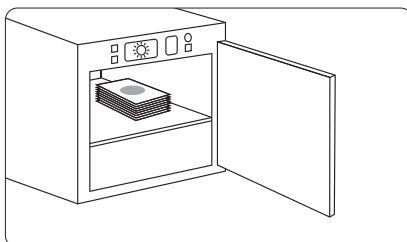
Press firmly on the center of the spreader to distribute the sample evenly. Spread the inoculum over the growth area before the gel is formed. Do not slide the spreader across the top film.



**07**

Remove the spreader and leave the plate undisturbed for one minute to permit the gel to form.

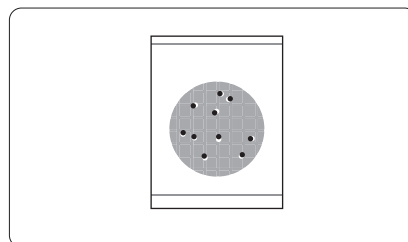
## Incubation



**08**

Incubate Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates with clear side up in stacks of up to 20. It may be necessary to humidify incubator to minimize moisture loss. **Please refer to the product instructions for third party validated methods.**

## Interpretation



**09**

Petrifilm *E. coli*/Coliform Count Plates can be counted using the Petrifilm Plate Reader Advanced, on a standard colony counter or other illuminated magnifier. Colonies may be isolated for further identification. Lift top film and pick the colony from the gel.

## Use Appropriate Sterile Diluents

Butterfield's phosphate buffered dilution water, 0.1% peptone water, peptone salt diluent, quarter-strength Ringer's solution, saline solution (0.85–0.90%), Wide-Spectrum Neutralizer, bisulfite-free letheen broth or distilled water.

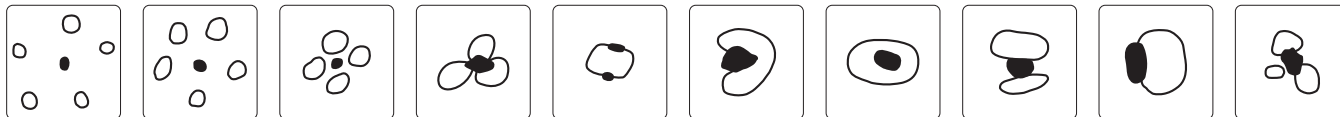
For optimal growth and recovery of the microorganisms, adjust the pH of the sample suspension to 6.6–7.2.

**Do not use diluents containing citrate, bisulfite or thiosulfate with the Petrifilm *E. coli*/Coliform Plates, they can inhibit growth.**

If citrate buffer is indicated in the standard procedure, substitute with one of the buffers listed above, warmed to 40–45°C.

# Bubbles

The illustrations below show examples of various bubble patterns associated with gas producing colonies. All should be enumerated.



Neogen offers a full line of products to accomplish a variety of your microbial testing needs.

For more product information, visit [info.neogen.com/petrifilm](https://info.neogen.com/petrifilm)

**User's Responsibilities:** Neogen Petrifilm Plate performance has not been evaluated with all combinations of microbial flora, incubation conditions and food matrices. It is the user's responsibility to determine that any test methods and results meet the user's requirements. Should re-printing of this Interpretation Guide be necessary, user's print settings may impact picture and color quality.

For detailed CAUTIONS, DISCLAIMER OF WARRANTIES/LIMITED REMEDY and LIMITATION OF NEOGEN LIABILITY, STORAGE AND DISPOSAL information and INSTRUCTIONS FOR USE, see product instructions.



Neogen Corporation, 620 Leshar Place, Lansing, MI 48912 USA.

© Neogen Corporation 2023. All rights reserved. Neogen and Petrifilm are registered trademarks of Neogen Corporation.

FS00580\_0823