



Petrifilm®

6420/6421

Product Instructions

 (EN) *Enterobacteriaceae* Count Plate

 (FR) Test *Enterobacteriaceae*

EB
Enterobacteriaceae

Product Instructions

Enterobacteriaceae Count Plate

Product Description and Intended Use

The Neogen® Petrifilm® *Enterobacteriaceae* Count (EB) Plate is a sample-ready-culture medium system which contains modified Violet Red Bile Glucose (VRBG) nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. Neogen Petrifilm EB Plates are used for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in the food, beverage, and bottled water industries. *Enterobacteriaceae* are oxidase-negative, Gram-negative rods that ferment glucose to produce acid and/or gas. On Neogen Petrifilm EB Plates, *Enterobacteriaceae* will appear as red colonies with yellow zones, red colonies with gas bubbles, or red colonies with yellow zones and gas bubbles. Neogen Petrifilm EB Plate components are decontaminated though not sterilized. Neogen Food Safety is certified to International Organization for Standardization (ISO) 9001 for design and manufacturing. Neogen Petrifilm EB Plates have not been evaluated with all possible food products, food processes, testing protocols or with all possible strains for *Enterobacteriaceae* or other bacteria.

Safety

The user should read, understand, and follow all safety information in the instructions for the Neogen Petrifilm EB 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

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 use by date.

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

- Perform Neogen Petrifilm EB Plate testing in a properly equipped laboratory under the control of a skilled microbiologist.
- The user must train its personnel in current proper testing techniques: for example, Good Laboratory Practices¹, ISO/EIC 17025² or ISO 7218³.

To reduce the risks associated with misinterpretation of results:

- Neogen has not documented Neogen Petrifilm EB Plates for use in industries other than food and beverages including bottled water. For example, Neogen has not documented Neogen Petrifilm EB Plates for testing pharmaceuticals, or cosmetics. Neogen has not documented Neogen Petrifilm EB Plates for testing surface and municipal waters, or waters used in the pharmaceutical or cosmetic industries.
- The use of Neogen Petrifilm EB Plates to test water samples in compliance with local water testing regulations is at the sole discretion and responsibility of the end-user. Neogen Petrifilm EB Plates have not been tested with all possible bottled water samples, testing protocols or with all possible strains of microorganisms.
- Do not use Neogen Petrifilm EB Plates in the diagnosis of conditions in humans and animals
- Neogen Petrifilm EB Plates do not differentiate any one *Enterobacteriaceae* strain from another.

If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at 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, 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 EB Plate pouches refrigerated or frozen at temperatures lower than or equal to 8°C (46°F). Just prior to use, allow unopened Neogen Petrifilm EB Plate pouches to come to room temperature before opening. Return unused Neogen Petrifilm EB 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 Neogen Petrifilm EB Plate pouches in a cool, dry place for no longer than four weeks. It is recommended that resealed pouches of Neogen Petrifilm EB 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 EB Plates in a sealable container. To remove frozen Neogen Petrifilm EB 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. 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 EB Plates that show discoloration. Use by date and batch number are noted on each package of Neogen Petrifilm EB Plates. The lot number is also noted on individual Neogen Petrifilm EB Plates. The Neogen Petrifilm EB Plates should not be used past their use by date.

△ Disposal

After use, Neogen Petrifilm EB Plates may contain microorganisms that may be a potential biohazard. Follow local, regional, and national regulations for disposal requirements.

Instructions for Use

Follow all instructions carefully. Failure to do so may lead to inaccurate results.

Preparation and Incubation of Samples from Food and Beverage Industries (Bottled Water Excepted) Including Environmental Samples

Sample Preparation

1. Use appropriate sterile diluents:

Butterfield's phosphate-buffered dilution water⁴, peptone salt diluent⁵, 0.1% peptone water⁴, buffered peptone water⁵, dipotassium hydrogen phosphate solution⁵, saline solution (0.85 – 0.90%), Neogen® Wide-Spectrum Neutralizer, bisulfate-free letheen broth or distilled water. See section "**Specific Instructions for Validated Methods**" for specific requirements.

Do not use diluents containing citrate, bisulfite or thiosulfate with Neogen Petrifilm EB 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 (104-113°F).

2. Blend or homogenize sample.
3. For optimal growth and recovery of microorganisms, adjust the pH of the sample suspension to 6.5-7.5. For acidic products, adjust the pH with 1 N NaOH. For alkaline products, adjust the pH with 1 N HCl.

Plating

1. Place the Neogen Petrifilm EB 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 Neogen Petrifilm EB Plate. Press gently on the center of the Neogen Petrifilm Spreader to distribute the sample evenly. Spread the inoculum over the entire Neogen Petrifilm EB 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 EB Plate undisturbed for at least one minute to permit the gel to form.

Incubation

Incubate Neogen Petrifilm EB Plates in a horizontal position with the clear side up in stacks of no more than 20 - Neogen Petrifilm EB Plates. Incubate Neogen Petrifilm EB Plates 24 hours ± 2 hours. Several incubation times and temperatures can be used depending on current local reference methods, some of which are listed in the section below titled “Specific Instructions for Validated Methods”.

Preparation and Incubation of Bottled Water Samples

Neogen Petrifilm EB Plate Hydration

1. Place the Neogen Petrifilm EB Plate on a flat, level surface.
2. Lift the top film and dispense 1 mL of an appropriate sterile hydration diluent onto the center of bottom film. Appropriate sterile hydration diluents include distilled water, deionized (DI) water and reverse osmosis (RO) water.
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 spreader to distribute the diluent evenly. Spread the diluent over the entire Neogen Petrifilm Plate growth area before the gel is formed. Do not slide the spreader across the film.
5. Remove the Neogen Petrifilm Spreader and allow the plates to remain closed for a minimum of 1 hour before use.
6. Store hydrated Neogen Petrifilm EB Plates in a sealed pouch or plastic bag. Protect plates from light and refrigerate at 2-8°C (36-46°F) for up to 7 days.

Water Filtration and Plate Incubation

1. Following standard procedures for water analysis, membrane filter water sample using a 47 mm, 0.45 micron pore size Mixed Cellulose Ester (MCE) filter.
2. Carefully lift the top film of the Neogen Petrifilm EB Plate. Avoid touching the circular growth area. Place the filter in the center of the hydrated area.
3. Slowly replace top film onto the membrane filter. Minimize trapping air bubbles and creating gaps between the filter and the Neogen Petrifilm EB Plate.
4. Lightly apply pressure by using the Neogen Petrifilm Spreader or sliding a finger lightly across the entire disk area (including edges) to ensure uniform contact of the filter with the gel and to eliminate any air bubbles.

Incubation

Incubate Neogen Petrifilm EB Plates at 34°C to 37°C for 24 hours ± 2 hours in a horizontal position with the clear side up in stacks of no more than 20.

Interpretation

1. Neogen Petrifilm EB 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.

2. *Enterobacteriaceae* are red colonies with yellow zones and/or red colonies with gas bubbles with or without yellow zones. Colonies not associated with gas (a distance greater than on colony diameter between colony and gas bubble) and not associated with a yellow zone are not counted as *Enterobacteriaceae*.
3. The circular growth area is approximately 20cm². Estimates can be made on Neogen Petrifilm EB Plates containing greater than 100 colonies by counting the number of colonies in two or more representative squares and determining the average number per square. Multiply the average number by 20 to determine the estimated count per plate.
4. When colonies are present in large numbers, Neogen Petrifilm EB Plates will have a deepening of the gel color or the plate may turn completely yellow, and either or both of the following characteristics: many small, indistinct colonies and/or many gas bubbles. When this occurs, record results as too numerous to count (TNTC). When an actual count is required, plate at a higher dilution.
5. 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.
6. If the Neogen Petrifilm EB 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 (5°F) for no longer than one week.

Note: Delayed counting of Neogen Petrifilm EB Plates with membrane filters is not recommended.

For further information refer to the “Neogen® Petrifilm® *Enterobacteriaceae* Plate Interpretation Guide.” If you have questions about specific applications or procedures, please visit our website at www.neogen.com or contact your Neogen representative or authorized distributor.

Specific Instructions for Validated Methods

AOAC® Official MethodsSM

Scope of the validation: 2003.01 Enumeration of *Enterobacteriaceae* in Selected Foods

Incubation:

Incubate Neogen Petrifilm EB Plates 24 hours ± 2 hours at 37°C ± 1°C.

NF Validation by AFNOR Certification

NF Validation certified method 3M 01/06–09/97 is in compliance with ISO 16140-2⁶ in comparison to ISO 21528-2⁷

Use the following details when implementing the above Instructions for Use:

Scope of the validation: For testing all human food products, animal feed and industrial environmental samples.

Sample preparation: Use only ISO listed dilutents⁵.

Incubation:

Incubate Neogen Petrifilm EB Plates 24 hours ± 2 hours at 30°C ± 1°C or 37°C ± 1°C.

Interpretation:

The Petrifilm EB Plate has been validated for enumeration using the Petrifilm Plate Reader Advanced (PPRA) and visual interpretation per the general method instructions. Refer to the NF Validation Certificate below for the PPRA software version used in the context of the NF Validation. For instructions on using the PPRA and software, please refer to the user manual. For the latest version visit neogen.com.

*Freezing Petrifilm EB Plates prior to enumeration is not included in the scope of the NF Validation.

Precautions:

Use good microbiology laboratory practices, such as ISO 7218. Enumeration using a single plate and a single dilution is an option certified in the NF Validation by AFNOR Certification. In this context, the requirements of ISO 7218 concerning the use of two successive dilutions or two plates of the same dilution cannot be applied (see paragraphs “Inoculation” and “Calculation and expression of results”). For sample preparation, refer to ISO 6887 series as specified in the standards. Matrices with a high level of particulate may influence Petrifilm Plate Reader Advanced (PPRA) enumeration and should be reviewed by the user.

For more information about end of validity, please refer to NF Validation certificate available on the website mentioned below.



3M 01/06 – 09/97
ALTERNATIVE ANALYTICAL METHODS FOR AGRIBUSINESS
<http://nf-validation.afnor.org/en>

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 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
3. ISO 7218. Microbiology of the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations.
4. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), Reagents Index for BAM found at: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm055791.htm>.
5. ISO 6887 (all parts) Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination.
6. ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain – Method Validation -- Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
7. ISO 21528-2:2017 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: colony count method.

Refer to the current versions of the standard methods listed above.

Explanation of Symbols

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 2025. All rights reserved.
Neogen and Petrifilm are registered trademarks of Neogen Corporation.
FS00841C-1

Instructions relatives au produit

Test *Enterobacteriaceae*

Description et utilisation du produit

Le Test Neogen® Petrifilm® *Enterobacteriaceae* (EB) est un milieu de culture prêt à l'emploi qui contient des éléments nutritifs VRBG modifié (du cristal violet, du rouge neutre, de la bile et du glucose), un agent gélifiant soluble dans l'eau froide et un indicateur au tétrazolium facilitant le dénombrement des colonies. Les Tests Neogen Petrifilm EB sont utilisés pour la numération des *Enterobacteriaceae* dans les industries alimentaires, des boissons et de l'eau en bouteille. Les *Enterobacteriaceae* sont des bâtonnets Gram négatif et oxydase négative qui fermentent le glucose et produisent de l'acide et/ou du gaz. Sur les Tests Neogen Petrifilm EB, les *Enterobacteriaceae* apparaissent sous forme de colonies rouges entourées de zones jaunes, sous forme de colonies rouges associées à des bulles de gaz ou sous forme de colonies rouges entourées de zones jaunes et associées à des bulles de gaz. Les composants du Test Neogen Petrifilm EB sont décontaminés, mais pas stérilisés. La conception et la fabrication Neogen Sécurité Alimentaire sont certifiées par l'Organisation internationale de normalisation (ISO) 9001. Les Tests Neogen Petrifilm EB n'ont pas été testés avec la totalité des produits alimentaires, des processus de transformation des aliments, des protocoles d'analyses ou des souches possibles d'*Enterobacteriaceae* ou d'autres bactéries.

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 EB. Conserver ces consignes de sécurité pour s'y référer ultérieurement.

⚠ **AVERTISSEMENT** : indique une situation dangereuse qui, si elle n'est pas évitée, pourrait entraîner un décès, des blessures graves et/ou des dommages matériels.

⚠ AVERTISSEMENT

Afin de réduire les risques associés à l'exposition aux dangers biologiques et à la pollution 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 EB dans un laboratoire correctement équipé, sous la surveillance d'un microbiologiste compétent.
- L'utilisateur doit former son personnel de manière appropriée aux techniques d'analyse actuelles : par exemple, les bonnes pratiques de laboratoire¹, ISO/EIC 17025² ou ISO 7218³.

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

- Neogen n'a pas documenté l'utilisation des Tests Neogen Petrifilm EB dans les secteurs autres que l'industrie alimentaire et les boissons comprenant l'eau en bouteille. Neogen n'a, par exemple, pas documenté l'utilisation des Tests Neogen Petrifilm EB pour l'analyse des produits pharmaceutiques ou des cosmétiques. Neogen n'a pas documenté les Tests Neogen Petrifilm EB pour l'analyse des eaux de surface ou de ville, ni pour l'analyse des eaux utilisées dans les industries pharmaceutiques ou cosmétiques.
- L'utilisation des Tests Neogen Petrifilm EB pour analyser des échantillons d'eau conformément à la réglementation locale sur l'analyse de l'eau est effectuée à la seule discrétion et responsabilité de l'utilisateur final. Les Tests Neogen Petrifilm EB n'ont pas été testés avec la totalité des échantillons d'eau en bouteille, protocoles d'analyse ou des souches possibles de micro-organismes.
- Ne pas utiliser les Tests Neogen Petrifilm EB pour réaliser des diagnostics sur l'homme et l'animal.
- Les Tests Neogen Petrifilm EB ne permettent pas de faire de distinction entre différentes souches d'*Enterobacteriaceae*.

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 ou contacter votre représentant Neogen ou votre distributeur Neogen agréé.

Responsabilité de l'utilisateur

Les utilisateurs sont tenus de se familiariser avec les instructions et les informations sur les produits. Visitez notre site Web à l'adresse 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 adaptée pour évaluer un nombre suffisant d'échantillons avec les matrices et les épreuves microbiennes appropriées, afin de garantir que la méthode d'analyse soit conforme 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 pour toute méthode d'analyse, les résultats obtenus avec un produit Neogen Sécurité Alimentaire ne constituent pas une garantie de la qualité des matrices ou des processus testés.

Limitation de garantie/Recours limité

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 Neogen Sécurité Alimentaire, 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 Neogen ne sera engagée au-delà du prix d'achat du produit prétendu défectueux.

Stockage

Conserver les poches de Test Neogen Petrifilm EB non ouvertes, réfrigérées ou congelées, à des températures inférieures ou égales à 8 °C (46 °F). Juste avant utilisation, laisser les poches de Test Neogen Petrifilm EB non ouvertes atteindre la température ambiante avant de les ouvrir. Replacer les Tests Neogen Petrifilm EB non utilisés dans la 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. Les poches de Test Neogen Petrifilm EB refermées doivent être conservées dans un endroit frais et sec pendant 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 EB refermées au congélateur (voir ci-dessous).

Pour conserver les poches ouvertes dans un congélateur, placer les Tests Neogen Petrifilm EB dans un récipient étanche. Pour retirer les plaques Neogen Petrifilm EB 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. 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 des Tests Neogen Petrifilm EB présentant des signes de décoloration. La date de péremption et le numéro de lot figurent sur chacune des boîtes de Tests Neogen Petrifilm EB. Le numéro de lot est également indiqué sur chaque Test Neogen Petrifilm EB. Les Tests Neogen Petrifilm EB ne doivent pas être utilisés après leur date de péremption.

△ Élimination des déchets

Après usage, chaque Test Neogen Petrifilm EB peut contenir des micro-organismes et donc présenter un risque biologique. Respecter les normes en vigueur concernant l'élimination des déchets.

Instructions d'utilisation

Suivre attentivement toutes les instructions. Dans le cas contraire, les résultats obtenus risquent d'être inexacts.

Préparation et incubation des échantillons des industries alimentaires et de boissons (à l'exception des industries d'eau en bouteille) comprenant des échantillons environnementaux

Préparation de l'échantillon

1. Utiliser des diluants stériles appropriés :

Eau de dilution tamponnée au phosphate de Butterfield⁴, diluent salin peptoné⁵, eau peptonée à 0,1 %⁴, eau peptonée tamponnée⁵, solution d'hydrogénophosphate de dipotassium⁵, solution saline (0,85 à 0,90 %), neutralisateur à large spectre de Neogen[®], bouillon de Léthéen sans bisulfate ou eau distillée. Voir la section « **Instructions spécifiques pour les méthodes validées** » pour connaître les exigences spécifiques.

Ne pas utiliser de diluants contenant du citrate, du bisulfite ou du thiosulfate avec les Tests Neogen Petrifilm EB, car ils peuvent inhiber la croissance des bactéries. 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 (104 à 113 °F).

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 6,5 et 7,5. 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 EB sur une surface de travail plane et horizontale.

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, au centre du Test Neogen Petrifilm EB. 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 EB 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 le Test Neogen Petrifilm EB reposer durant au moins une minute afin de laisser le gel se former.

Incubation

Incuber les Tests Neogen Petrifilm EB à l'horizontale, avec le film transparent vers le haut, en veillant à ne pas empiler plus de 20 Tests Neogen Petrifilm EB. Incuber les Tests Neogen Petrifilm EB pendant 24 heures ± 2 heures. Plusieurs durées et températures d'incubation peuvent être utilisées en fonction des méthodes de référence locales en vigueur. Certaines d'entre elles figurent dans la section « **Instructions spécifiques pour méthodes validées** ».

Préparation et incubation des échantillons d'eau en bouteille

Hydratation du Test Neogen Petrifilm EB

1. Placer le Test Neogen Petrifilm EB sur une surface de travail plane et horizontale.

2. Soulever le film supérieur et déposer 1 ml de diluant d'hydratation stérile et adapté au centre du film inférieur. Les solutions d'hydratation stériles appropriées comprennent l'eau distillée, l'eau déionisée et l'eau obtenue par osmose inverse.

3. Recouvrir délicatement l'échantillon avec le film supérieur pour éviter de piéger des bulles d'air.

4. Placer le côté plat du Neogen Petrifilm Diffuseur vers le bas et au centre du test. Répartir le diluant uniformément en exerçant une légère pression au centre du diffuseur. Répartir le diluant sur la totalité de la zone de croissance du test Neogen Petrifilm avant que le gel ne se forme. Ne pas faire glisser le diffuseur sur le film.

5. Retirer le Neogen Petrifilm Diffuseur et laisser les tests fermés pendant au moins 1 heure avant utilisation.

6. Conserver les tests Neogen Petrifilm EB hydratés dans une poche ou un sac en plastique étanche. Protéger les tests de la lumière et les réfrigérer entre 2 et 8 °C (36 et 46 °F) pendant 7 jours maximum.

Filtration de l'eau et incubation des tests

1. Dans le respect des procédures standard d'analyse de l'eau, filtrer sur une membrane l'échantillon d'eau au moyen d'un filtre en ester mixte de cellulose (MCE) de 47 mm avec une porosité de 0,45 micron.

2. Soulever avec précaution le film supérieur du test Neogen Petrifilm EB. Éviter de toucher la zone de croissance circulaire. Placer le filtre au centre de la zone hydratée.

3. Replacer lentement le film supérieur sur le filtre à membrane. Éviter d'emprisonner des bulles d'air et de créer des décalages entre le filtre et le test Neogen Petrifilm EB.

4. Appliquer une légère pression à l'aide du Neogen Petrifilm Diffuseur ou en faisant glisser doucement un doigt sur toute la surface du disque (bords compris) pour s'assurer que le contact entre le filtre et le gel est uniforme et éliminer les bulles d'air éventuelles.

Incubation

Incuber les tests Neogen Petrifilm EB entre 34 °C et 37 °C pendant 24 heures ± 2 heures à l'horizontale avec le film transparent vers le haut et sans empiler plus de 20 tests.

Interprétation

1. Le dénombrement à l'aide des Tests Neogen Petrifilm EB peut être effectué sur un compteur de colonies standard ou au moyen d'une autre loupe éclairante. 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.
2. Les *Enterobacteriaceae* forment des colonies rouges avec des zones jaunes et/ou des colonies rouges avec des bulles de gaz (avec ou sans zone jaune). Les colonies non associées à des bulles de gaz (distance entre la bulle et la colonie supérieure au diamètre de la colonie) ni entourées d'une zone jaune ne sont pas considérées comme des *Enterobacteriaceae*.
3. La zone de croissance circulaire est de 20 cm² environ. Des estimations sont possibles sur les Tests Neogen Petrifilm EB contenant plus de 100 colonies en comptant le nombre de colonies dans deux 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.
4. Lorsque le nombre de colonies est élevé, les Tests Neogen Petrifilm EB présenteront une coloration du gel plus accentuée ou le gel pourra jaunir complètement et présenter l'une des caractéristiques suivantes, voire les deux : grand nombre de petites colonies indiscernables et/ou grand nombre de bulles de gaz. 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.
5. 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.
6. Si les Tests Neogen Petrifilm EB ne peuvent pas être lus dans l'heure qui suit leur sortie de l'incubateur, ils peuvent être stockés congelés pour une lecture différée, dans un récipient étanche, à une température inférieure ou égale à -15 °C (5 °F), pendant une semaine au maximum.

Remarque : il est déconseillé de différer la numération des tests Neogen Petrifilm EB avec filtre.

Pour plus d'informations, consulter le « Guide d'interprétation du Test Neogen® Petrifilm® *Enterobacteriaceae* ». Pour toute question concernant des applications ou procédures spécifiques, consulter notre site Internet à l'adresse www.neogen.com ou contacter le représentant ou distributeur Neogen local.

Instructions spécifiques pour méthodes validées

AOAC® Official MethodsSM

Portée de la validation : 2003.01 Dénombrement des *Enterobacteriaceae* pour des aliments sélectionnés

Incubation :

Incuber les Tests Neogen Petrifilm EB pendant 24 heures ± 2 heures à 37 °C ± 1 °C.

Méthode certifiée par AFNOR Certification

La méthode certifiée NF Validation 3M 01/06–09/97 est conforme à la norme ISO 16140-2⁶ par rapport à la norme ISO 21528-2⁷.

Utiliser les détails suivants lors de l'application des instructions d'utilisation ci-dessus :

Portée de la validation : pour l'analyse des produits alimentaires destinés à la consommation humaine, les produits alimentaires pour animaux et les échantillons environnementaux industriels.

Préparation de l'échantillon : n'utiliser que des diluants répertoriés dans la norme ISO⁵.

Incubation :

Incuber les Tests Neogen Petrifilm EB pendant 24 heures ± 2 heures à 30 °C ± 1 °C ou 37 °C ± 1 °C.

Interprétation :

La plaque Petrifilm EC a été validée en termes de numération à l'aide du lecteur de plaques Petrifilm Plate Reader Advanced (PPRA) et d'interprétation visuelle conformément aux consignes générales de la méthode. Reportez-vous au certificat de validation NF ci-dessous pour connaître la version du logiciel PPRA utilisée dans le cadre de la validation NF. Pour obtenir des consignes sur l'utilisation du PPRA et du logiciel, consultez le manuel d'utilisation. Pour la version la plus récente, rendez-vous sur neogen.com.

*La congélation des plaques Petrifilm EB avant la numération n'est pas visée par la validation NF.

Précautions :

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire en microbiologie, notamment la norme ISO 7218. La numération à l'aide d'une seule plaque et d'une seule dilution est une option certifiée dans la validation NF par AFNOR Certification. Dans ce contexte, les exigences de la norme ISO 7218 relative à l'utilisation de deux dilutions successives ou de deux plaques de même dilution ne sont pas applicables (voir les paragraphes « Inoculation » et « Calcul et expression des résultats »). Pour la préparation d'échantillons, se reporter à la série ISO 6887 conformément aux dispositions des normes. Les matrices contenant un niveau élevé de particules sont susceptibles de fausser les résultats obtenus avec le lecteur Petrifilm Plate Reader Advanced (PPRA) et devraient être vérifiées par l'utilisateur.

Pour plus d'informations sur la fin de validité, veuillez vous référer au certificat NF Validation disponible sur le site mentionné ci-après.



3M 01/06 – 09/97

MÉTHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE POUR L'AGROALIMENTAIRE

<http://nf-validation.afnor.org/en>

Pour plus d'information sur l'expiration de la validité, se reporter au certificat NF VALIDATION disponible sur le site Internet cité ci-dessus.

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 the food chain - General requirements and guidance for microbiological examinations.
4. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM), 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.
6. ISO 16140-2. Microbiology of the food chain – Method Validation -- Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
7. ISO 21528-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* – Part 2: colony count method.

Se reporter aux versions en cours de validité des méthodes normalisées citées plus haut.

Explication des symboles

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

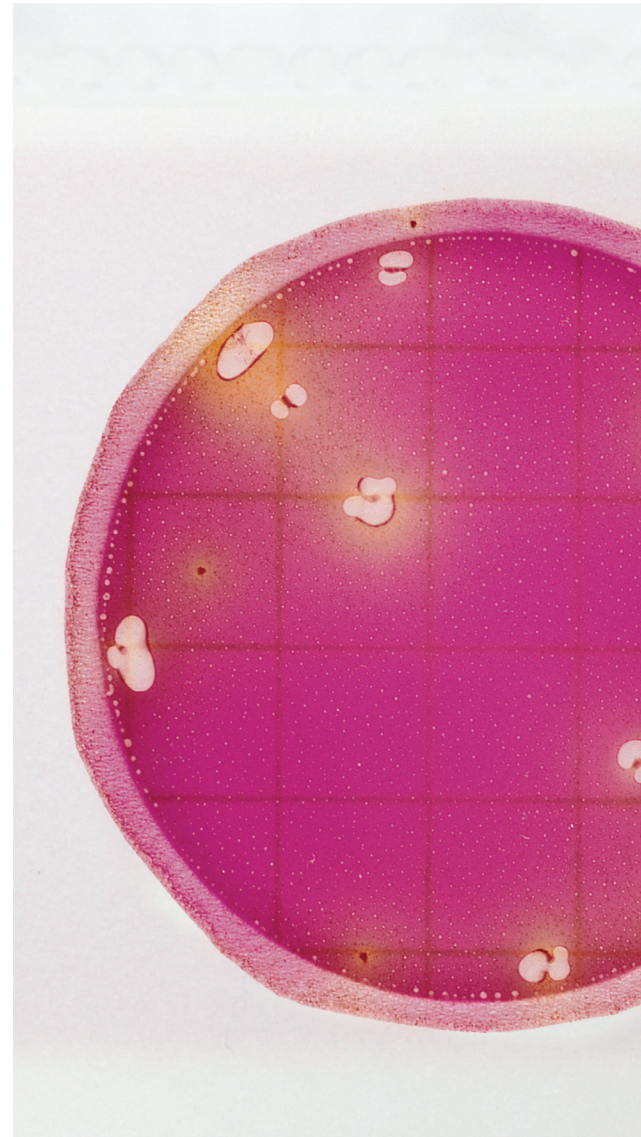
© Neogen Corporation 2025. All rights reserved.
Neogen and Petrifilm are registered trademarks of Neogen Corporation.
FS00841C-1



Petrifilm®

Interpretation Guide

The Neogen® Petrifilm® *Enterobacteriaceae* Count Plate is a sample-ready culture medium system that contains modified Violet Red Bile Glucose (VRBG) nutrients, a cold-water-soluble gelling agent, and a tetrazolium indicator that facilitates colony enumeration. Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plates are used for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in the food, beverage and bottled water industries. *Enterobacteriaceae* are oxidase-negative, Gram-negative rods that ferment glucose to produce acid and/or gas. *Enterobacteriaceae* colonies will appear as red colonies associated with yellow zones, red colonies associated with gas bubbles, or red colonies associated with yellow zones and with gas bubbles.



EB

Enterobacteriaceae Count Plate

Food and Beverage Applications

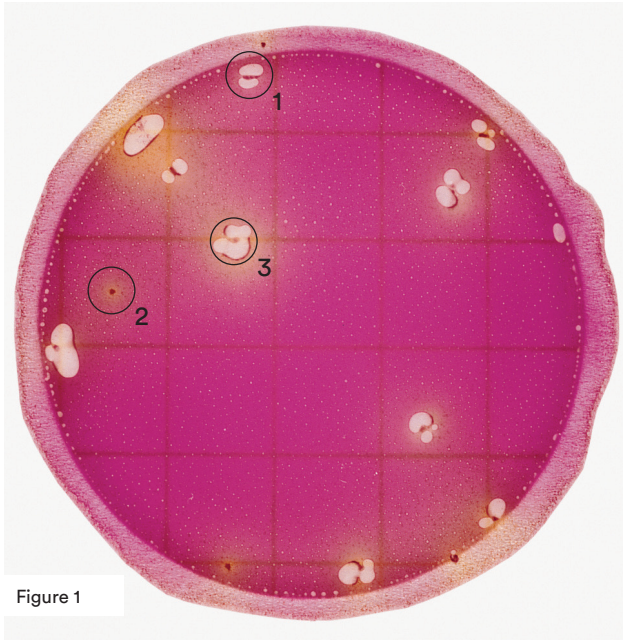


Figure 1

***Enterobacteriaceae* count = 13**

Figure 1 illustrates the three types of typical colonies. Sometimes gas disrupts the colony so that the colony “outlines” the gas bubbles.

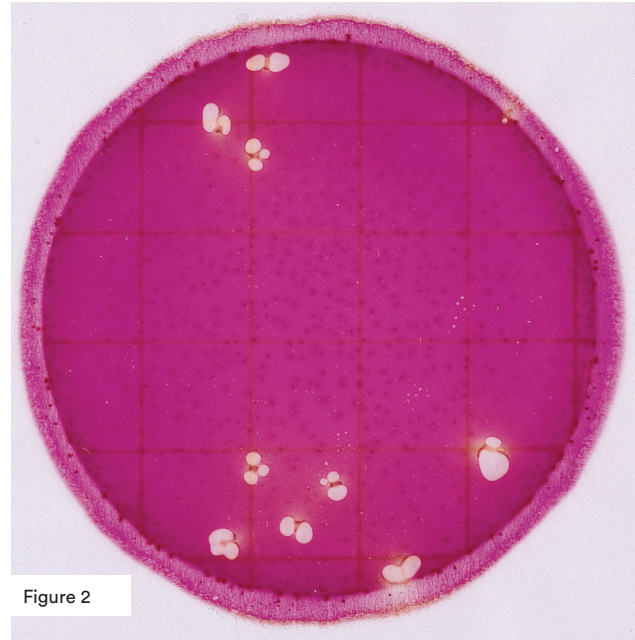


Figure 2

***Enterobacteriaceae* count = 9**

Figure 2 shows a Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate with a few *Enterobacteriaceae* colonies and a high number of non-*Enterobacteriaceae*, Gram-negative colonies. Do not count colonies on the foam dam since they are removed from the selective influence of the medium.

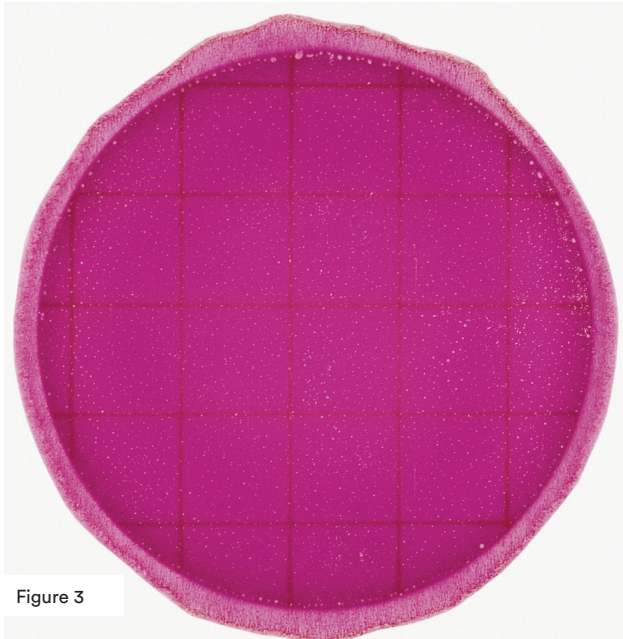


Figure 3

***Enterobacteriaceae* count = 0**

Notice the change in gel color in Figures 3 to 8. As the *Enterobacteriaceae* count increases, the color of the gel lightens from purple to yellow or cream colored.

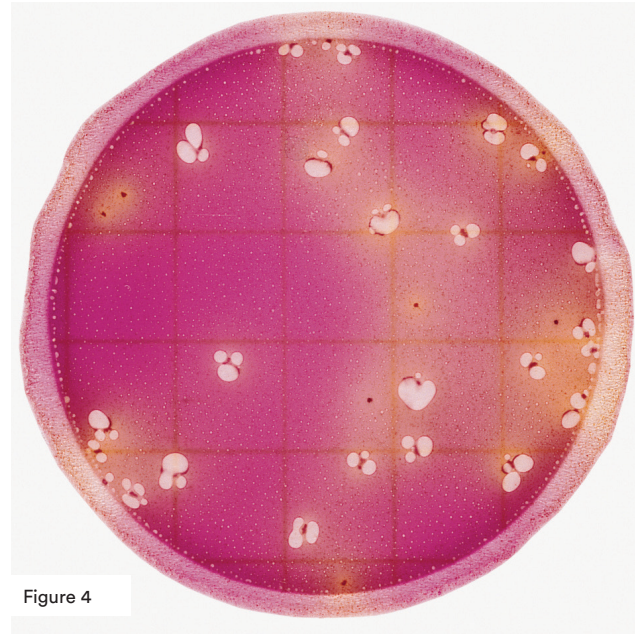


Figure 4

***Enterobacteriaceae* count = 35**

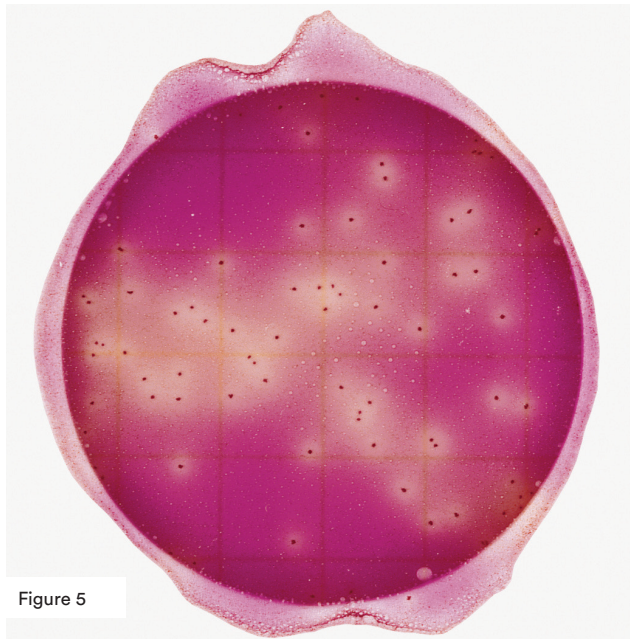


Figure 5

Enterobacteriaceae count = 77

The recommended counting range on Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate is less than or equal to 100 colonies.

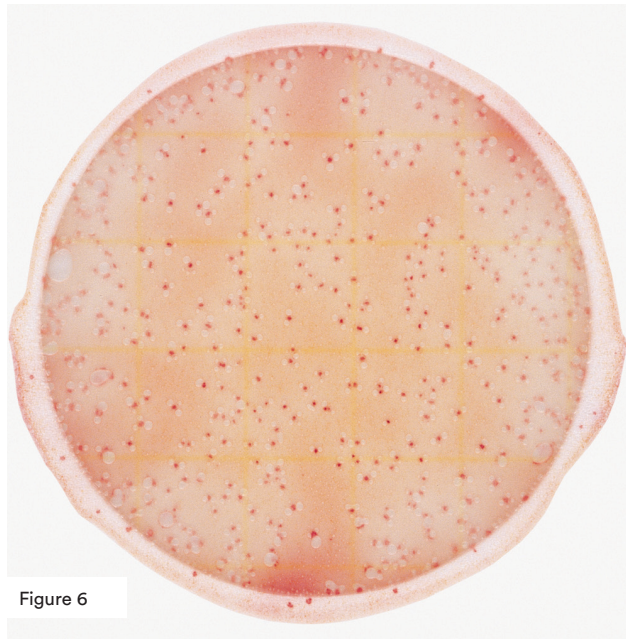


Figure 6

Enterobacteriaceae count = TNTC

Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plates with more than 100 colonies are considered too numerous to count (TNTC). When colonies are present in large numbers, plates will have a deepening of the gel color or may turn completely yellow, and either or both of the following characteristics: many small, indistinct colonies and/or many gas bubbles. When this occurs, record results as TNTC.

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

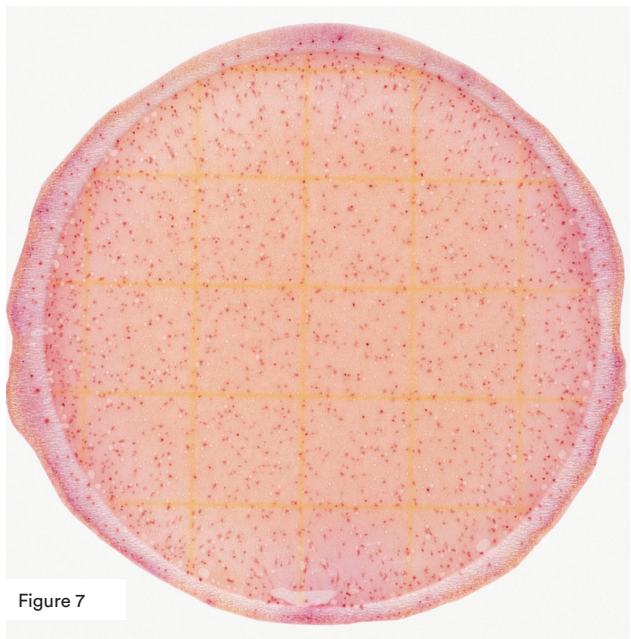


Figure 7

Enterobacteriaceae count = TNTC

In Figure 7, the count is so high that acid zones and gas bubbles are not easily seen. A lightening of the gel color indicates that the result is TNTC.

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

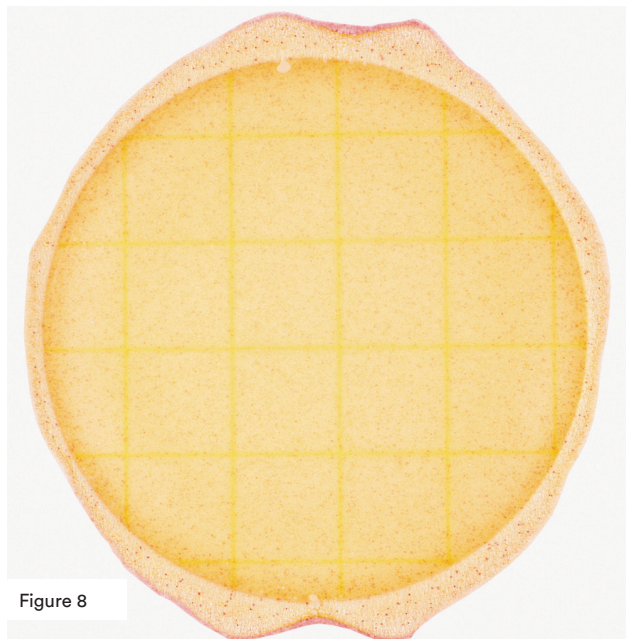


Figure 8

Enterobacteriaceae count = TNTC

The Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate in Figure 8 has two characteristics indicating TNTC colonies: lightening of the gel color and many small colonies.

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

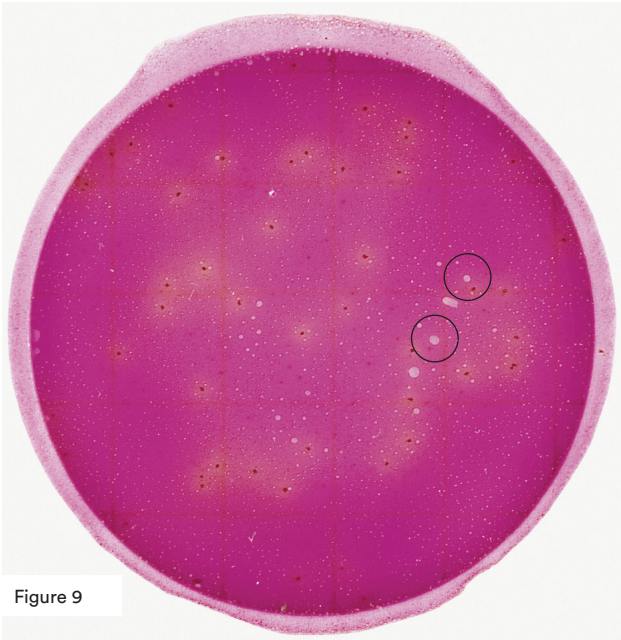


Figure 9

***Enterobacteriaceae* count = 44**

Artifact bubbles may result from improper inoculation of the Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate. They are irregularly shaped and not associated with a red colony. Do not enumerate.

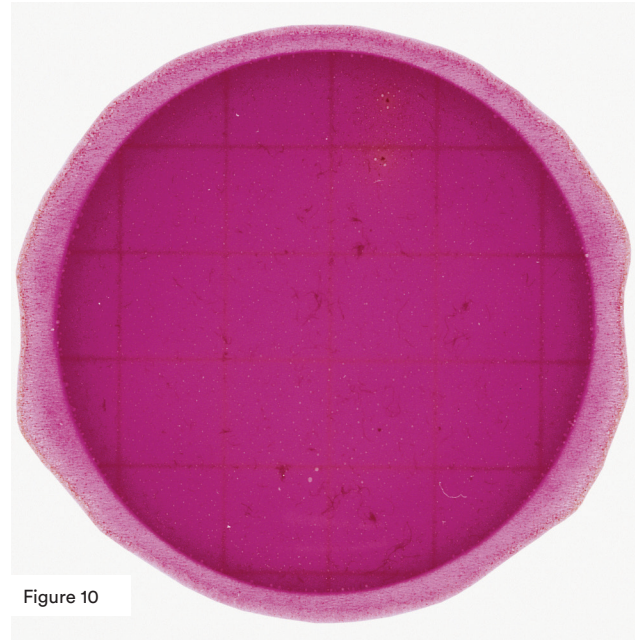


Figure 10

***Enterobacteriaceae* count = 2**

Food particles are often irregularly shaped or filamentous and are not associated with gas bubbles or acid zones. Do not enumerate.

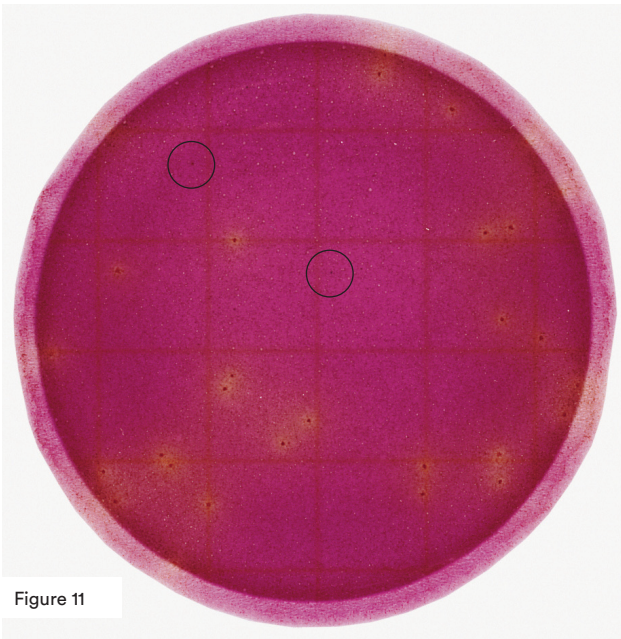


Figure 11

***Enterobacteriaceae* count = 29**

Food particles also can be seen as dark spots but are not associated with gas bubbles or acid zones. Do not enumerate.

Bottled Water Applications

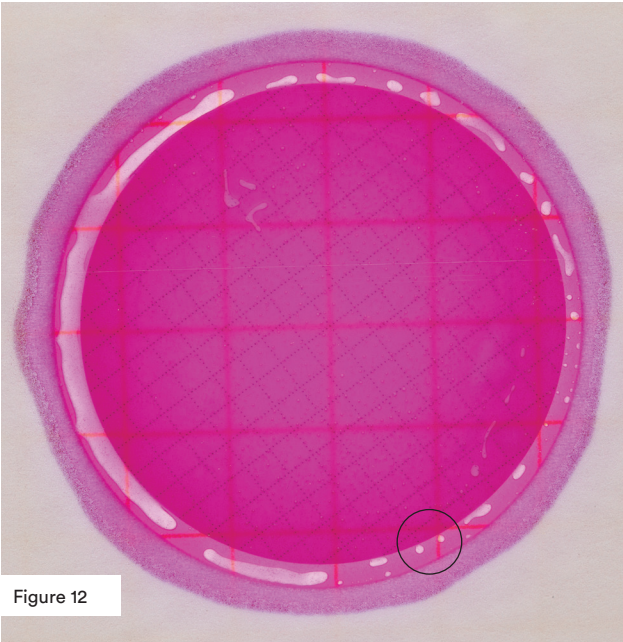


Figure 12

Enterobacteriaceae count = 0

Gas bubbles surrounding filter do not indicate microbial growth. See circle for example.

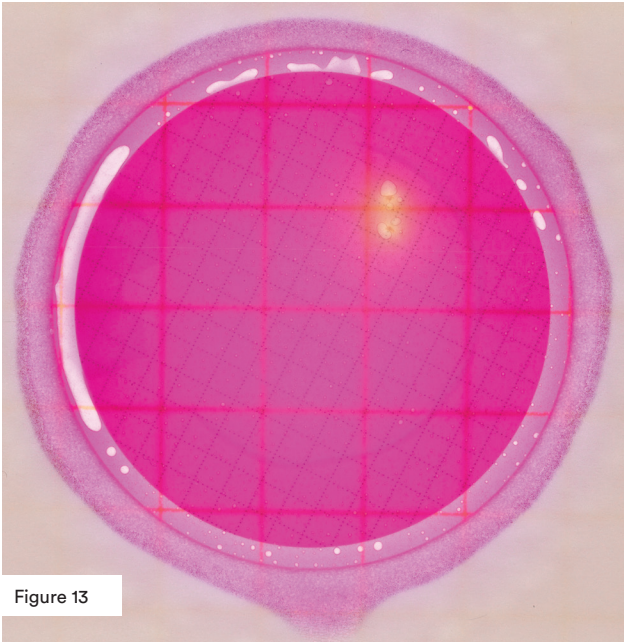


Figure 13

Enterobacteriaceae count = 2

Enterobacteriaceae are identified by the presence of acid (yellow halo) and/or colony-associated gas bubbles.

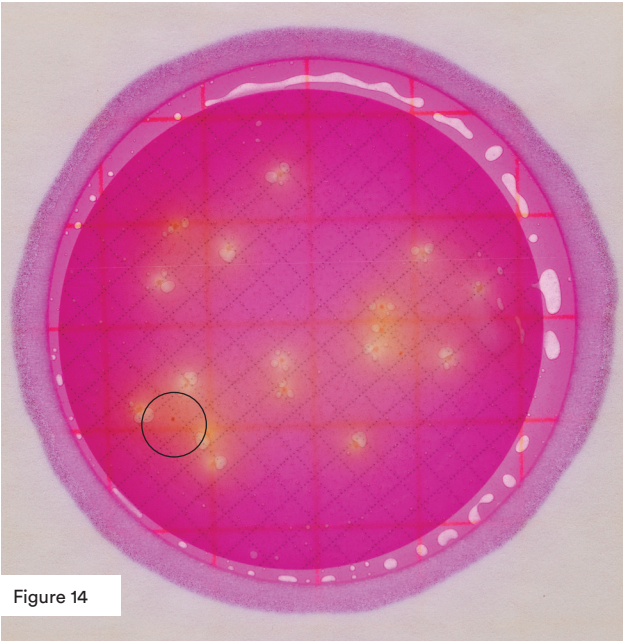


Figure 14

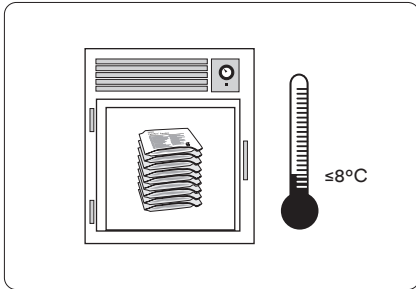
Enterobacteriaceae count = 17

Red colonies without acid or gas production (circle) are not counted as Enterobacteriaceae.

Reminders For Use

Food and Beverage Applications

Storage



01

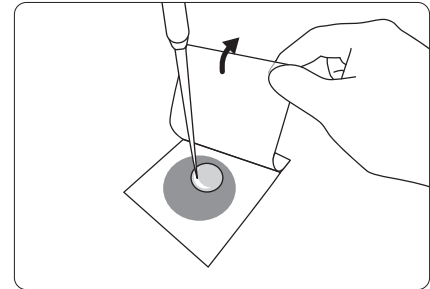
Store the **unopened** Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate pouches at frozen or refrigerated temperatures lower than or equal to 8°C (46°F). Use before expiration date on package. It is best to allow pouches to reach room temperature before opening.



02

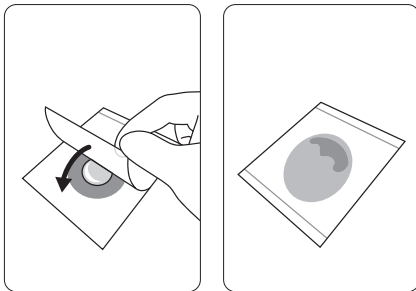
Seal by folding the end of the pouch over and applying adhesive tape. **To prevent exposure to moisture, do not refrigerate opened pouches.** Store resealed pouches in a cool, dry place for no longer than four weeks.

Inoculation



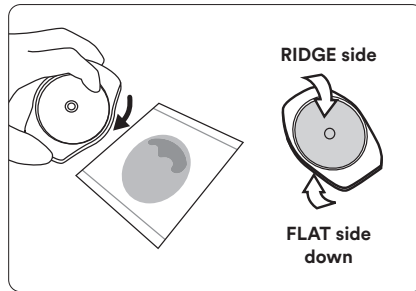
03

Place Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate on **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.



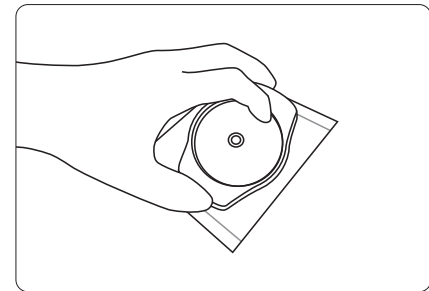
04

Roll top film down onto sample **gently** to prevent trapping air bubbles.



05

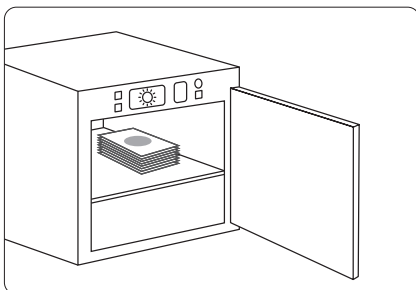
With **flat** side down, place Petrifilm Spreader on top film over inoculum.



06

Gently apply pressure on Petrifilm Spreader to distribute inoculum over circular area before gel is formed. **Do not** twist or slide the spreader. Lift Petrifilm Spreader. Wait a minimum of 1 minute for gel to solidify.

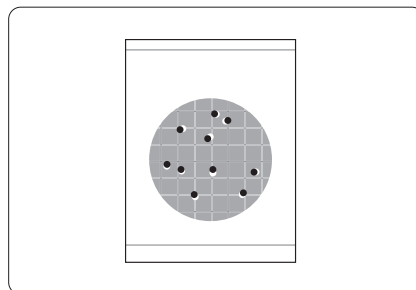
Incubation



07

Incubate plates with clear side up in stacks of no more than 20. It may be necessary to humidify incubator to minimize moisture loss. **See product instructions for third party validated methods.**

Interpretation



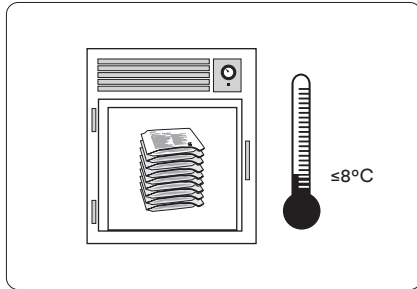
08

Petrifilm *Enterobacteriaceae* 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.

Reminders For Use

Bottled Water Applications

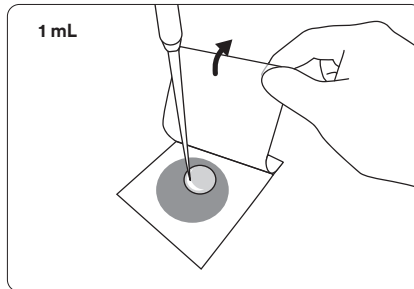
Storage



01

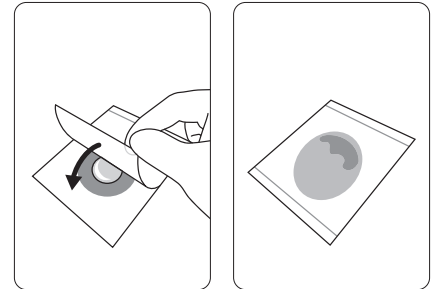
Follow steps 1 and 2 of Food and Beverage Application Reminders for Use.

Hydration



02

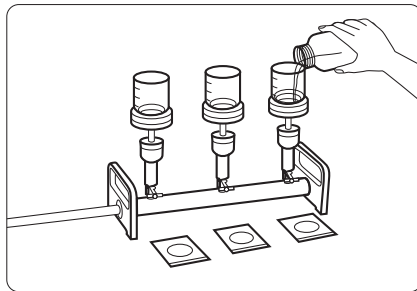
Place Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate on a flat, level surface. Lift the top film and dispense 1 mL of an appropriate sterile hydration diluent onto the center of the bottom film. Appropriate sterile diluents include sterile water, deionized (DI) water and reverse osmosis (RO) water.



03

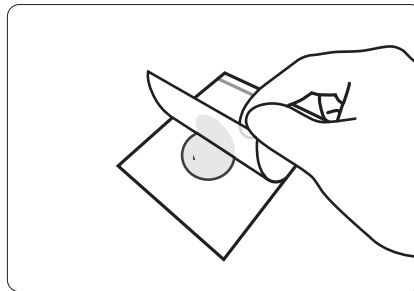
Carefully roll the top film down onto the sample to prevent trapping air bubbles.

Filtration



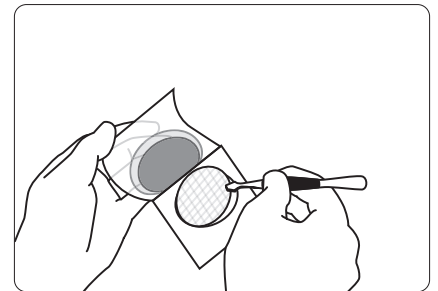
04

For membrane filtration of water samples use a 47mm, 0.45 micron pore size Mixed Cellulose Ester (MCE) filter.



05

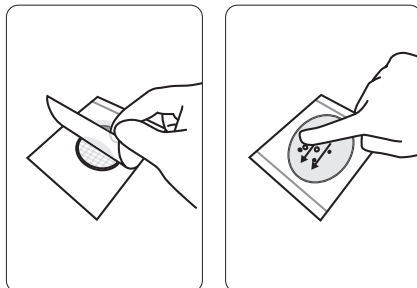
Carefully lift the top film.



06

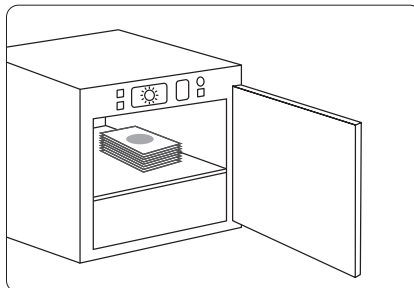
Place filter in the center of the hydrated area. Roll top film down to minimize air bubbles or gaps between the filter and the Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plate.

Incubation



07

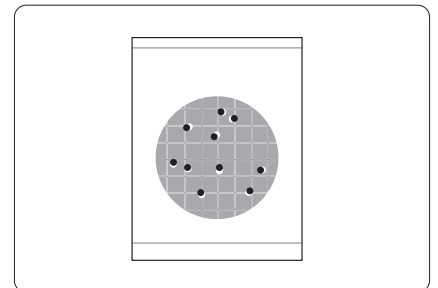
Lightly apply pressure to ensure uniform contact of the filter with the gel and to eliminate any air bubbles.



08

Incubate Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plates in a horizontal position, clear side up, in stacks of no more than 20 plates at 34-37°C for 24 ± 2 hours.

Interpretation

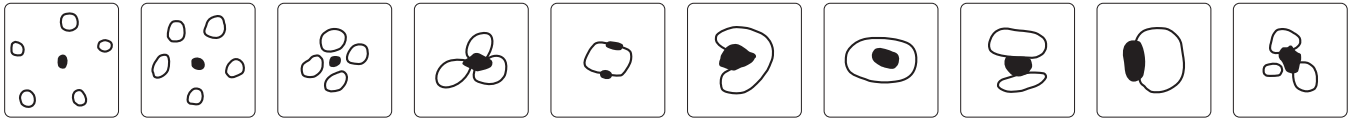


09

Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count Plates can be counted 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.

Bubbles

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



Use Appropriate Sterile Diluents

Butterfield's phosphate-buffered dilution water, peptone salt diluent, 0.1% peptone water, buffered peptone water, dipotassium hydrogen phosphate 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 6.5 to 7.5.

Do not use diluents containing citrate, bisulfite or thiosulfate with the Petrifilm *Enterobacteriaceae* Count 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.

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

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.

FS00581_0823