
拭子组成：

1. MicroSnap 增菌拭子，用于环境表面和食物悬液。（货号：ES-1000）
2. MicroSnap 增菌肉汤，用于可过滤的液体样品。（货号：EB-2000）
3. MicroSnap 大肠菌群检测拭子。（货号：MS-COLIFORM）
4. MicroSnap 大肠埃希菌检测拭子。（货号：MS-ECOLI）

说明与用途：

MicroSnap COLIFORM（大肠菌群）和 ECOLI（大肠埃希菌）是一种快速生物发光检测方法，用于对不同种类样品中的大肠菌群和大肠杆菌进行检测和计数，检测结果可以在 8 小时内获得；大肠杆菌检测结果为确认结果。MicroSnap 由一支带有非特定生长培养基的增菌拭子和一支带有生物发光底物的检测拭子所组成，检测反应结果可通过 Hygiena 配套的便携式 EnSURE 荧光仪来测定。

检测需分两个步骤，首先采用增菌拭子进行短时间的孵育，然后用检测拭子进行测定。在增菌拭子孵育期间，大肠菌群和/或大肠埃希菌的数量会增加并产生特异性的酶（大肠菌群为 β -半乳糖苷酶，大肠埃希菌为 β -葡萄糖苷酸酶）；随后在检测拭子中，细菌生长过程中产生的特异性酶会与对应的生物发光底物发生作用并释放出光，然后通过配套的 EnSURE 荧光仪来测定。光的输出量与初始接种物中大肠菌群和/或大肠埃希菌的数量呈正比。

MicroSnap 可用于检测环境表面、食品、水以及其它可过滤液体样本等。检测应由具备微生物检测经验和无菌操作技术的检验员在实验室或其它可控环境进行。

适用性：

MicroSnap 用于检测大肠菌群和大肠埃希菌。检测结果既可以定性（有或无），也可以对原始样品中的细菌进行定量。由于某些宋内志贺菌菌株可产生 β -半乳糖苷酶，因而可能会出现宋内志贺菌所导致的假阳性反应。

MicroSnap 已在包括肉类、乳制品、水果、蔬菜、饮用水、饮料和环境表面等多种样本中进行了验证。虽然某些含有天然高水平特定酶的食物如一些发酵奶制品和绿叶蔬菜沙拉可能会出现较高的本底值，但不会干扰检测的性能；升高相应的本底值依然可以检测出低水平的大肠菌群和大肠埃希菌。

需要但不提供的材料与试剂：

- 样品准备设备和稀释液
- 推荐的稀释液
 - 缓冲蛋白胨水（BPW）
 - 最大恢复稀释液（MRD）
 - 磷酸盐缓冲液（Butterfields）
 - 用户自选的其它验证过的稀释液

- 0.45µm 无菌过滤器和过滤装置
- 37°C±1°C 培养箱
- 荧光仪
 - EnSURE (Hygiena 品牌)
 - Pi-102 (Hygiena 品牌)

检测程序:

步骤 1: 增菌

针对定量检测的增菌程序如下所述并见步骤 1 的图表。

针对环境表面和固体食物

A. 采集样品并放置于 MicroSnap 增菌拭子中 (ES-1000)。

采样方法有以下几种:

- a) 表面拭子采样 (一般 4x4 英寸或 10x10 厘米), 见图表的步骤 1 A1。
- b) 将 1ml 的液体食物、饮料或水样直接加到增菌拭子中。步骤 1 A2。
- c) 将 1ml 10%w/v 的食物匀浆直接添加到增菌拭子中。食物匀浆的准备应采用推荐的稀释液和标准的微生物程序。步骤 1 A3。

B. 将 Snap-Valve 球阀重新插入拭子管中。步骤 1B。

C. 折断顶部的 Snap-Valve 阀来激活拭子。步骤 1C。

D. 将 Snap-Valve 阀折断后, 轻提球阀 (大约 1~2 秒) 以释放内压; 然后挤压球阀 1~2 次, 将增菌肉汤释放到拭子管中, 随后将球阀/拭子件重新牢固地插入拭子管中。步骤 1D。

E. 轻轻地摇晃管子, 将样品和增菌肉汤充分混合。步骤 1 E。

F. 在 37°C±1°C 条件下孵育 6 个小时。步骤 1 F。

针对大容量的可过滤液体

G. 采集 100ml 的样品, 用直径 25mm 和/或 47mm 的 0.45µm 过滤膜进行过滤。步骤 1G。

H. 过滤后在无菌条件下移走过滤器, 将滤膜放置于 47mm 无菌培养皿中。步骤 1H。

I. 从增菌肉汤瓶中取 2ml 增菌培养基到培养皿中。步骤 1I。

J. 将培养皿在 37°C±1°C 条件下孵育 6 个小时。步骤 1J。

定性检测需要增加 2 小时的孵育时间, 即孵育时间为 8 小时。若有要求也可再增加孵育时间, 但这不会影响结果也不会检测范围或灵敏度上获得任何额外的益处。

步骤 2: 检测

检测程序如下所述并见步骤 2 的图表。

A.

- i. 将 MicroSnap 大肠菌群检测拭子 (MS-COLIFORM) 从冷藏条件下取出后室温放置 10 分钟。
- ii. 添加增菌样品前, 通过在手掌上轻拍 5 次来晃动检测拭子, 将分散在管子中的液滴集中到管子底部。这将有助于增菌样品与管子中溶液的混合。步骤 2A。

B. 将增菌后的样品加至 MicroSnap 大肠菌群检测拭子中。

- i. 在无菌条件下从增菌拭子中取出等份样品并加至大肠菌群检测拭子中。最佳添加量为 0.1ml 或 2~3 滴。增菌拭子可以当作巴氏吸管, 即通过挤压并释放增菌拭子的球阀, 使样品吸回到球阀中; 然后从管子中取出拭子并小心地将样品滴 2~3 滴 (大约 0.1ml) 到检测拭子中使其达到刻度填充线。步骤 2Bi。

剩余的增菌肉汤可以返回到增菌拭子中用于重复检测。也可使用 MicroSnap 大肠埃希菌检测拭子 (MS-ECOLI) 对大肠埃希菌进行确认或进一步检测及储存。

- ii. 过滤后的样品可在无菌条件下用移液管从培养皿中取出 0.1ml 的培养液加至 MicroSnap 大肠菌群检测拭子 (MS-COLIFORM) 中。步骤 2Bii。

C. 折断 Snap-Valve 阀来激活大肠菌群检测拭子, 然后挤压球阀 3 次以释放试剂。步骤 2C。

D. 轻晃管子使其充分混合。步骤 2D。

E. 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 10 分钟 (± 0.5 分钟)。步骤 2E。

F. 将整个拭子插入 EnSURE 荧光仪中, 关闭盖子并保持直立, 按下 OK 键开始测量。倒数 15 秒出结果。步骤 2F。

G. 荧光仪显示屏上为 RLU 读数, 下面将解释读数的含义。

进一步检测:

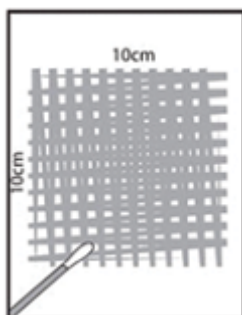
如果使用大肠菌群检测拭子发现了阳性结果, 可进一步确认样品中是否存在大肠埃希菌。方法很简单, 即使用大肠埃希菌检测拭子 (MS-ECOLI) 再次检测相同的增菌样品。

步骤1 增菌

Micro-Snap

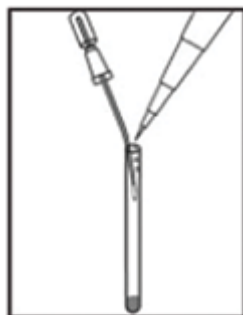
步骤 1: 环境表面、液体和固体样品

A 表面



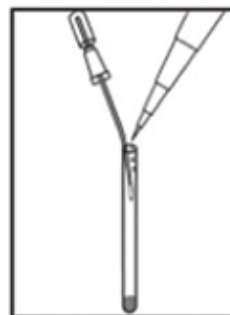
或

液体样品

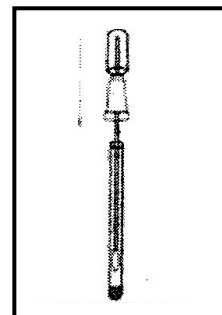


或

固体样品



B



2. 表面: 用 SuperSnap 涂抹滤膜表面。

A2. 液体: 直接添加 1ml 的液体食物、饮料或水样到 MicroSnap 增菌拭子中。

A3. 固体样品: 将 1ml 的 10%w/v 的固体样品悬液直接添加到 MicroSnap 增菌拭子中。

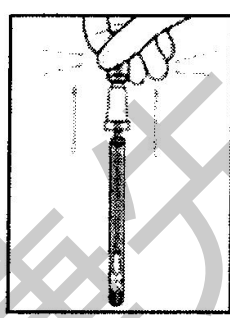
3. 将 Snap-Valve 球阀重新插入拭子管中。

C



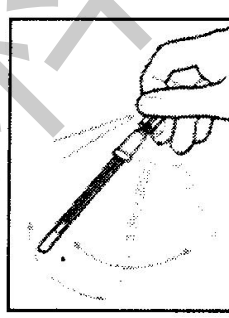
4. 激活拭子。弯曲球阀，折断 Snap-Valve 阀。

D



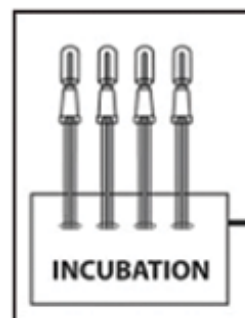
5. 上提球阀 (大约 1~2 秒) 并挤压以释放液体到管子中。释放球阀的内压, 将球阀重新插入拭子管中。大多数的液体应集中于管子的底部。

E



6. 轻轻地摇晃管子将样品与管内液体充分混合。

F



F. 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下定量检测孵育 6 个小时, 定性检测孵育 8 个小时。继续第 2 步。

步骤 1: 大容量的可过滤液体

G 过滤器



G1. 过滤器: 通过 0.45 μ m (微米) 过滤器来过滤样品。

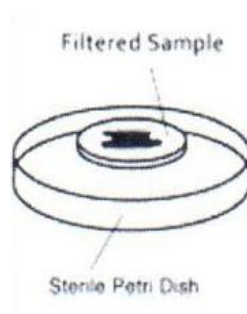
针筒式过滤器



1. 针筒式过滤器: 通过 0.45 μ m (微米) 针筒式过滤器来过滤样品。

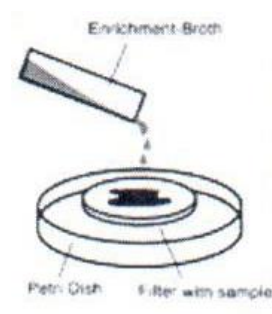
或

H



H. 过滤后在无菌条件下移走过滤器并放置于无菌培养皿中。

I



I. 添加 2ml 的增菌肉汤 (EB-2000) 到培养皿中。

J



J. 在 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下定量检测孵育 6 个小时, 定性检测孵育 8 个小时。
继续第 2 步。

步骤2 检测

Micro-Snap

步骤2 检测/测量

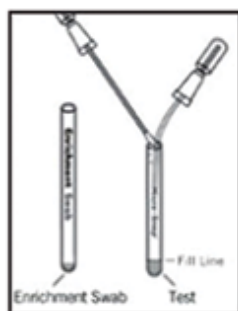
A



Ai. 将 MicroSnap 大肠菌群检测拭子 (MS-COLIFORM) 从冷藏条件下取出并恢复至室温。

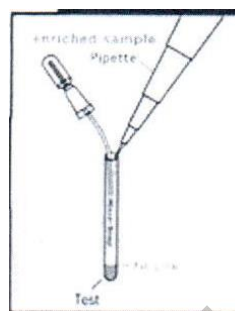
Aii. 在手掌上轻拍 5 次来晃动管子以使液体集中到管子底部。

B 拭子



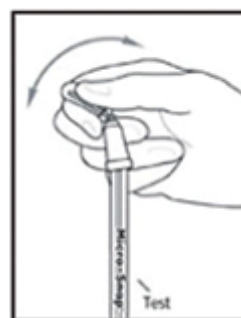
Bi. 拭子: 在无菌条件下从增菌拭子中取出 0.1ml (2~3 滴或达到填充线) 加到大肠菌群检测拭子中。

过滤器



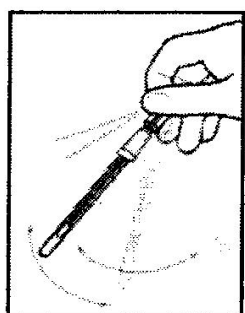
Bii. 过滤器: 在无菌条件下从过滤器或培养皿中取出 0.1ml 的增菌样品加到 MicroSnap 大肠菌群检测拭子中

C



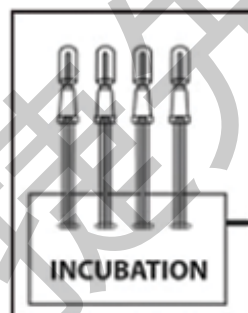
C. 激活检测拭子。折断 Snap-Valve 阀并挤压释放液体到管子中。

D



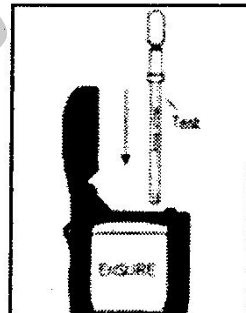
D. 轻晃管子, 将样品与试剂充分混合。

E



E. 在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育大肠菌群检测拭子 10 分钟。

F



7. 将 SuperSnap 检测拭子插入 EnSURE 荧光仪中。

G



8. 记录检测结果 (RLU 值)。

结果判定:

EnSURE 荧光仪显示的结果是相对光单位 (RLU)。表 1 中显示的是通过两种荧光仪获得的 RLU 值换算菌落形成单位 (CFU) 的数值。

对比表 1~3 和图解 1 中的对应不同仪器的 RLU 值, 来获取大肠菌群存在的定量检测结果。

不同的荧光仪具有不同的性能特点与灵敏性, 因此它们的 RLU 值范围也不一样。EnSURE 荧光仪的 RLU 输出值有 4 位数, 结果大于或等于 10000 的 RLU 值将超出量程。Pi-102 荧光仪则有更大的动态量程 (8 位数), 所以可显示更大的 RLU 值。在 Pi-102 上应用 Micro-Snap 时, 小于 300 的低 RLU 值为本底值, 这些数值没有实际意义。

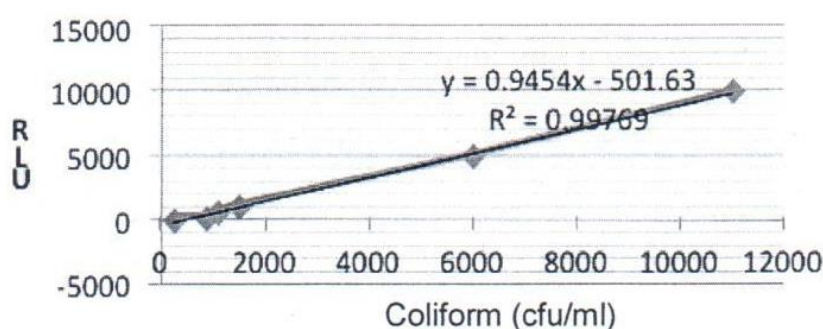
定量检测 (增菌 6 个小时):

RLU 值与初始接种物呈正相关, 并可与细菌数量 (菌落形成单位, CFU) 进行换算。表 1 中对比了相应仪器的 RLU 值。所有仪器显示了非常好的相关系数 ($r^2=0.86-0.99$), 即两种方法的一致性达到 92% 以上。

表 1 两种仪器中 Micro-snap RLU 值与大肠菌群数量 (CFU) 间的关系

CFU 值	EnSURE
≤ 10	≤ 40
30	125
100	300
300	800
1000	2000
3000	5500
10000	15000
30000	超出显示范围
100000	
300000	
1000000	

图解 1 增菌 6 个小时后在 EnSURE 荧光仪中检测的
RLU 值与大肠菌群数量 (CFU/ml) 的关系



定性检测（增菌 8 个小时）:

定性检测（存在与不存在）通常用于检测低水平的污染，例如<10cfu/g 的食物或<1cfu/100ml 的水样。样品准备好后，用于增菌检测的接种物将可能不含有细菌或≥1 个 CFU。

通过 37℃ 孵育 8 个小时后，即使只有 1CFU 的接种物也将产生可以检测到的非常高的酶活性。从 240 个样品中计算出的存在与不存在数值，其统计学的可信水平>99.7%。

两种荧光仪的存在或不存在的 RLU 限值见下表 2。

表 2: 用于定性检测的存在与不存在限值

结果	EnSURE
不存在	0-9
存在	≥10

对大肠埃希菌存在的确认

如果在 Micro-Snap 大肠埃希菌检测拭子（MS-ECOLI）中观察到有意义的 RLU 信号，就能够确认在增菌液中存在大肠埃希菌。

两种荧光仪的存在或不存在的 RLU 限值见下表 3。

表 3: 用于确认大肠埃希菌的存在与不存在限值

结果	EnSURE
不存在	0-9
存在	≥10

对照:

可根据“良好实验室规范（GLP）”要求在每次检测时设立阴阳性对照。

对于有些含有天然高水平特定酶的食物如某些发酵奶制品和绿叶蔬菜沙拉，可通过设立高本底起始值来进行测定。对于这些样品，建议在进行任何孵育前通过执行检测步骤 2 来首先检测被测样品本底水平，然后再经过 6 个和 8 个小时的孵育来确定衰变率。为了避免假阳性结果，对于高于表 1~3 中最低检测限值的那些升高的样本本底水平应做补偿。由于绝大多数的食物不存在这一问题，该建议纯属提醒注意。

安全与注意事项:

当正确使用 MicroSnap 拭子时不会对人体健康造成任何危害。确定为阳性结果的拭子可能含有生物有害物，应按照“良好实验室规范”和“健康安全法规”等进行安全处理。

1. 拭子设计为一次性使用，不可重复使用。
2. 不可使用过期的拭子。
3. 在无菌条件下进行采样，避免交叉污染。
4. 确保正确的孵育温度和时间。
5. 激活拭子时，保证球阀内的所有液体集中到管子底部。

储存与保质期：

袋装的拭子应存放在 2~8℃ 条件下。

拭子的保质期为 12 个月。请检查标签上的有效期。

告诫与用户责任：

1. Micro-Snap 拭子还没有检测过所有可能的食品、食品加工流程或所有可能的大肠菌类的种群。
2. 此检测不能用于人类和动物的诊断。
3. 与任何培养基使用时，MicroSnap 的检测结果不能作为所检测的食品、饮料或工艺过程的质量担保。
4. 用户必须按照正确的检测技术培训工作人员。

捷先科技