(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101918531 B
(45)授权公告日 2013.06.12

(21)申请号 200880125178.1
(22)申请日 2008.11.20
(30)优先权数据
60/989,356 2007.11.20 US
(85)PCT申请进入国家阶段日
2010.07.20
(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2008/084109 2008.11.20
(87)PCT申请的公布数据
WO2009/108229 EN 2009.09.03
(73)专利权人 3M创新有限公司
地址 美国明尼苏达州
(72)发明人 辛西亚·D·祖克
罗伯特·H·西尔伯纳格尔
芭芭拉·L·赫特尔
亨利·J·吕布朗特
罗伯特·E·柯里策
(74)专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司 11219
代理人 郭国清 樊卫民
(51)Int.Cl.
C12M 1/26(2006.01)
(56)对比文件
WO 9806870 A1,1998.02.19,
EP 0398703 A,1990.11.22,
GB 1494358 A,1977.12.07,
审查员 周洋

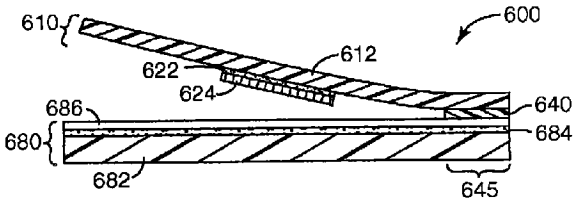
权利要求书2页 说明书18页 附图4页

(54)发明名称

环境取样制品和方法

(57)摘要

本发明涉及用于从表面收集样品的制品、用于对所述样品进行微生物学分析的制品和使用所述制品的方法。所述制品包括样品收集器、具有可任选的阻挡层的样品室和包含用于培养和检测微生物的亲水性试剂的样品即用型试剂条。本发明包括收集、检测和定量表面样品中的微生物的方法。



CN 101918531 B

1. 一种用于对表面微生物进行取样和检测的制品，所述制品包括：

具有上主表面和下主表面的样品收集器，其基本上不含亲水性试剂；

其中至少一个主表面是水不能透过的；

其中至少一个主表面包括多孔材料；和

与其附接的试剂条；

其中所述试剂条包括具有上主表面和下主表面的自支承基材；

其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、缓冲剂、指示剂以及两种或更多种上述物质的组合。

2. 一种用于对表面微生物进行取样和检测的试剂盒，所述试剂盒包括：

基本上不含亲水性试剂的样品收集器，其包括具有上主表面和下主表面的水不能透过基材，其中至少一个主表面包括多孔材料；和

试剂条，其包括具有上主表面和下主表面的自支承基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、缓冲剂、指示剂以及任何两种或更多种上述物质的组合。

3. 一种用于检测环境表面上的微生物的方法，所述方法包括：

提供：

液体样品悬浮介质；

样品收集器，其包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的；

样品室，其包括底部构件和包括基材的覆盖片，其具有上主表面和下主表面，其中所述覆盖片的一个主表面的至少一部分涂覆有包含至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末；和

试剂条，其包括具有上主表面和下主表面的自支承基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、指示剂以及任何两种或更多种上述物质的组合；

在所述样品的至少一个主表面上获得样品；

通过将所述样品收集器置于所述样品室中而形成组件，其中所述至少一个包含所述样品的主表面朝所述覆盖片取向；

将所述样品悬浮介质施加至包含所述样品的所述样品收集器主表面；

将所述覆盖片的下主表面与所述样品悬浮介质接触，以形成水合凝胶；

将所述试剂条的被涂覆的表面与所述水合凝胶接触；

将所述组件温育一段时间；并且

观察微生物生长的指示剂。

4. 一种用于检测环境表面上的微生物的方法，所述方法包括：

提供：

阻挡层；

样品悬浮介质；

样品收集器，其包括基材，其具有上主表面和下主表面，其中至少一个主表面是水不能透过的；

样品室，其包括

底部构件，其包括自支承基材，其具有上主表面和下主表面；

覆盖片，其包括基材，其具有上主表面和下主表面，其中一个主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末；和

试剂条，其包括自支承基材，其具有上主表面和下主表面，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、指示剂以及任何两种或更多种上述物质的组合；

在所述样品收集器的至少一个主表面上获得样品；

通过将所述样品收集器置于所述样品室中而形成组件，其中所述至少一个包含所述样品的主表面朝所述覆盖片取向；

将所述样品悬浮介质施加至包含所述样品的所述样品收集器主表面；

将所述防水阻挡层插入所述样品收集器和所述覆盖片之间，从而防止所述样品悬浮介质与所述覆盖片的至少一部分接触；

将所述组件温育一段时间；

将所述阻挡层的至少一部分从所述样品室移除；

将所述覆盖片的下主表面与所述样品悬浮介质接触，以形成水合凝胶；

将所述试剂条的被涂覆的表面与所述水合凝胶接触；

将所述样品室温育一段时间；并且

观察微生物生长的指示剂。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，所述方法还包括对所述样品中的微生物进行计数的步骤。

6. 根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其中观察微生物生长的指示剂包括观察选下列物种的微生物的生长指示剂：李斯特菌属 (Listeria) 物种、沙门氏菌属 (Salmonella) 物种、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 物种、梭菌属 (Clostridium) 物种、肠球菌属 (Enterococcus) 物种、耶尔森氏菌属 (Yersinia) 物种、芽孢杆菌属 (Bacillus) 物种、大肠杆菌 (Escherichia coli)、葡萄球菌属 (Staphylococcus) 物种和含有 ESBL 的微生物。

7. 一种检测环境样品中的李斯特菌属物种的方法，所述方法包括：

提供具有表面的样品收集器、样品悬浮介质、样品室和试剂条；

其中所述试剂条包括干燥涂层，所述干燥涂层包括包含培养微生物的营养物质、指示剂的亲水性试剂；和冷水溶性胶凝剂

在所述样品收集器的表面上获得样品；

将所述样品收集器置于所述样品室中；

水合所述样品或所述试剂条；并且

将所述试剂条与所述样品接触。

环境取样制品和方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求于 2007 年 11 月 20 日提交的美国临时专利申请 No.60/989,356 的优先权，将该专利全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0003] 当表面被细菌、真菌、酵母、病毒或其他微生物污染时，可能引发疾病（发病），有时甚至导致死亡（致死）。当食品加工厂和医疗卫生场所（如医院）中的表面被微生物污染时，尤其如此。

[0004] 在食品加工厂中，表面（如固体表面、设备表面、防护服等）可能会被污染。此类污染可能由肉类或其他食物引起，或转移到肉类或其他食物上。在医疗卫生场所中，微生物可能会从被感染的个体或以其他方式释放到表面（如固体表面、设备表面、衣物等）上。一旦表面被微生物污染，与被污染表面接触就会轻易地将微生物转移至其他位置，例如其他表面、个体、设备、食物等。

[0005] 众所周知，某些环境中的微生物污染和转移可能会引起严重的健康风险。例如，来自受污染的食品加工厂的食品将随后被吃掉，并可能引起疾病，并且可能引起死亡。特别相关的是诸如单核细胞增多性李斯特菌 (Listeria monocytogenes)、肠炎沙门氏菌 (Salmonella enteriditis) 和大肠杆菌 O157:H7 之类的微生物。

[0006] 微生物污染涉及于医疗卫生场所中，因为这种场所的某些患者常常遭受病原微生物的感染，因而将病原微生物带入这类场所中。另外，处于这类场所中的许多人（例如患者）是患病的，可能会免疫失能。因而，这些个体因受污染微生物的感染而患病的风险增大。

[0007] 鉴于微生物污染的潜在危险，特别是微生物可能会在某些环境中容易转移以及与某些环境的污染相关的健康危害，已经开发了多种技术并用于检测这种污染，以便可快速对其进行补救。

[0008] 在常规上，环境微生物检测包括从表面获得样品。这通常通过用无菌取样器具（例如拭子或海绵）接触（如擦拭、拖曳等）表面来完成。以这种方式检测的表面常常相当干净；因此，通过取样器具获得的微生物数量通常相当低。由于微生物数量少，通常必须将取样器具上的（例如，由取样器具获得的）任何微生物进行繁殖，或“培育”或“培养”，以提供足够数量的生物体用于进一步分析。因此，随后通常将至少一部分样品中和以及任选进行稳定、修复或富集，然后施加（例如，转移、拖曳、浸渍和搅拌等）至合适的培养基（例如，琼脂（明胶或明胶样材料）、肉汤（液态）等），该培养基包含将帮助所关注的微生物生长的营养物质。培养基可以是选择性的，也就是说该培养基可包含将会使某些微生物以比其他微生物快的速度生长的成分，或者其可包含将会抑制至少一些不期望的微生物生长的成分。使培养基在一定温度下温育或保持预定的一段时间，通常约 24 小时至约 48 小时，或直到微生物生长明显可见。

[0009] 一旦样品已具有足够的机会生长，随后就可评估（例如通过个人评估或用自动化

装置评估）已生长的细菌量（例如琼脂板上的菌落数），以提供对通常一天或两天前提取样品的时候存在于表面某些区域上的微生物的数量和类型的一些指示。还可以进行免疫检测或其他检测以确定或证实存在于样品中的任何所关注微生物的种类。

[0010] 例如，当检测细菌中的沙门氏菌属 (Salmonella) 物种时，可将可能含有沙门氏菌属物种的样品施加至选择性培养基。然后将该选择性培养基温育约 24 至 48 小时直到沙门氏菌属微生物的生长可见。一旦沙门氏菌属菌落可见地存在于选择性培养基上，就可对菌落进行评价以证实它们的种类，并任选进行计数以估计存在于测试表面的某些区域上的沙门氏菌属微生物的数量。作为另外一种选择或除此之外，可以让培养的微生物接受免疫测定或核酸测定以更直接地证实它们的种类。

[0011] 需要对环境微生物进行简单、快速、准确的检测。本发明提供了用于这类检测的装置和方法。

发明内容

[0012] 在一个方面，本发明包括用于对表面微生物进行取样和检测的制品。该制品可包括基本上不含亲水性试剂的样品收集器和附连至其上的试剂条。样品收集器可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的并且其中至少一个主表面包括多孔材料。试剂条可包括具有上主表面和下主表面的自支承基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、缓冲剂、指示剂以及两种或更多种上述物质的组合。任选地，该制品还可包括阻挡层。

[0013] 在另一方面，本发明包括用于对微生物进行检测或计数的制品。该制品可包括底部构件和附连至其上的覆盖片。底部构件可包括具有上主表面和下主表面的自支承的水不能透过基材，其中上主表面包括连接结构。覆盖片可包括上主表面和下主表面，其中覆盖片的下主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。底部构件的上主表面面向覆盖片的下主表面。

[0014] 在另一方面，本发明包括用于收集环境表面样品的样品收集器。样品收集器可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的，其中至少一个主表面包括多孔材料，并且其中所述样品收集器基本上不含亲水性试剂。

[0015] 在另一方面，本发明包括样品室，该样品室包括底部构件、垫片、覆盖片和防水阻挡层。底部构件可包括具有上主表面和下主表面的自支承的水不能透过基材。垫片可包括孔并粘附至底部构件的上表面。覆盖片可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。防水阻挡层设置在覆盖片与垫片之间，由此覆盖片的被涂覆的表面面向阻挡层。

[0016] 在另一方面，本发明包括用于检测微生物的试剂条。该试剂条包括具有上主表面和下主表面以及在两个主表面的至少一部分上的干涂层的自支承基材。涂层可包括含培养微生物的营养物质和指示剂的亲水性试剂以及冷水溶性胶凝剂。

[0017] 在另一方面，本发明包括用于对表面微生物进行取样和检测的试剂盒。该试剂盒可包括样品收集器和试剂条。样品收集器基本上不含亲水性试剂，并且可包括具有上主表面和下主表面的水不能透过基材，其中至少一个主表面包括多孔材料。试剂条可包括具有

上主表面和下主表面的自支承基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、缓冲剂、指示剂以及任何两种或更多种上述物质的组合。

[0018] 在另一方面，本发明包括用于对微生物进行取样和计数的试剂盒。该试剂盒可包括样品收集器、样品室和可任选的试剂条。样品收集器可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的。样品室可包括底部构件和覆盖片。底部构件可包括具有上主表面和下主表面的自支承的水不能透过基材。覆盖片可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。

[0019] 在另一方面，本发明包括用于对微生物进行取样和计数的试剂盒。该试剂盒可包括样品收集器、覆盖片和底部构件。样品收集器基本上由具有上主表面和下主表面的基材构成，其中至少一个主表面是水不能透过的。覆盖片可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。底部构件可包括具有上表面和下表面的自支承的水不能透过基材以及连接结构。

[0020] 在另一方面，本发明包括用于检测环境表面上的微生物的方法。该方法可包括提供液体样品悬浮介质、样品收集器、样品室和试剂条。样品收集器可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的。样品室可包括底部构件和包括具有上主表面和下主表面的基材的覆盖片，其中所述覆盖片的一个主表面的至少一部分涂覆有含至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。试剂条可包括具有上主表面和下主表面的自支承基材，其中一个主表面的至少一部分涂覆有冷水溶性胶凝剂和亲水性试剂，所述亲水性试剂选自培养微生物的营养物质、选择剂、缓冲剂、指示剂以及任何两种或更多种上述物质的组合。该方法还可包括：在样品收集器的至少一个主表面上获得样品；通过将样品收集器置于样品室中，以包含样品的至少一个主表面朝向覆盖片取向而形成组件；将样品悬浮介质施加至包含样品的样品收集器主表面；让覆盖片的下表面与样品悬浮介质接触以形成水合凝胶；将试剂条的被涂覆的表面与该水合凝胶接触；将组件温育一段时间；观察微生物生长的指示剂。

[0021] 在另一方面，本发明包括用于检测环境表面上的微生物的方法。该方法包括提供阻挡层、样品悬浮介质、样品收集器、样品室和试剂条。样品收集器可包括具有上主表面和下主表面的基材，其中至少一个主表面是水不能透过的。样品室可包括底部构件和覆盖片，所述底部构件包括具有上主表面和下主表面的自支承的水不能透过基材，所述覆盖片包括具有上主表面和下主表面的基材，该覆盖片中一个主表面的至少一部分涂覆有包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末。该方法还可包括：在样品收集器的至少一个主表面上获得样品；通过将样品收集器置于样品室中，以包含样品的至少一个主表面朝向覆盖片取向而形成组件；将样品悬浮介质施加至包含样品的样品收集器主表面；将样品室温育一段时间；从样品室移除阻挡层的至少一部分；让覆盖片的下表面与样品悬浮介质接触以形成水合凝胶；将试剂条的被涂覆的表面与该水合凝胶接触；将该组件温育一段时间；观察微生物生长的指示剂。

[0022] 在另一方面，本发明提供了检测环境样品中的李斯特菌属物种的方法。该方法可包括提供具有表面的样品收集器、样品悬浮介质和试剂条；在样品收集器的表面上获得样

品；水合样品或试剂条；以及使试剂条和样品接触。试剂条包括干涂层，该干涂层可包括包含培养微生物的营养物质、指示剂的亲水性试剂；和冷水溶性胶凝剂。

[0023] 在另一方面，本发明提供了检测环境样品中的李斯特菌属物种的方法。该方法可包括提供具有表面的样品收集器、样品悬浮介质、样品室和试剂条；在样品收集器的表面上获得样品；将样品收集器置于样品室中；水合样品或试剂条；以及使试剂条和样品接触。试剂条包括干涂层，该干涂层可包括包含培养微生物的营养物质、指示剂的亲水性试剂；和冷水溶性胶凝剂。

[0024] 措辞“优选的”和“优选地”指在某些情况下，可提供某些有益效果的本发明实施例。然而，在相同的情况或其他情况下，也可以优选其他实施例。此外，对一个或多个优选实施例的详述并不意味着不可使用其他实施例，而且并无意于将其他实施例排除在本发明范围之外。

[0025] 出现在说明书和权利要求书中的术语“包含”及其变型不具有限制性含义。

[0026] 如本文所用，“一个”、“一种”、“所述”、“至少一种”和“一种或多种”可互换使用。因此，例如，包括“一个”阻挡层的样品室可理解为表示该样品室可包括“一个或多个”阻挡层。

[0027] 术语“和／或”意指所列要素的一个或全部，或所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0028] 另外在本文中，通过端点列举的数字范围包括在所述范围内包含的所有数字（例如，1 至 5 包括 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等）。

[0029] 本发明的以上发明内容并不旨在描述本发明的每个公开的实施例或每种具体实施方式。后面的描述更具体地举例说明了例示性的实施例。在本申请全文中的若干处通过列举例子提供指导，可以使用这些例子的不同组合。在每种情况下，所列举的例子只是作为代表性的组类，不应解释为排他性的例子。

附图说明

[0030] 将参照下面列出的附图来进一步说明本发明，其中在全部视图中类似的结构由类似的数字标注。

[0031] 图 1 是根据本发明的样品收集器的示例性实施例的透视图。

[0032] 图 2A 是根据本发明的纹理化样品收集器的示例性实施例的顶部透视图。

[0033] 图 2B 是根据本发明的包括多孔材料的样品收集器的示例性实施例的透视图。

[0034] 图 3A 是根据本发明的包括垫片的样品室的示例性实施例的横截面示意图。

[0035] 图 3B 是图 3A 中样品室的平面图。

[0036] 图 4 是用于微生物的样品收集和计数的制品的一个实施例的横截面示意图。

[0037] 图 5 是根据本发明的试剂条的一个实施例的透视图。

[0038] 图 6 是用于微生物的样品收集和计数的制品的可供选择的实施例的横截面示意图。

[0039] 图 7 用于微生物的样品收集和计数的制品的可供选择的实施例的横截面示意图。

[0040] 图 8 是用于微生物的样品收集和计数的制品的可供选择的实施例的横截面示意图。

具体实施方式

[0041] 本发明提供了用于表面取样、暂时保存样品以及培育和检测样品中存在的微生物的制品和方法。如下面详细论述的，本发明的装置包括单独的收集器、样品室、试剂条、阻挡层元件、一种或多种上述元件的组合以及使用这种装置的方法。本发明还包括用于表面取样和检测微生物的试剂盒以及使用这种试剂盒的方法。一些传统的表面微生物取样方法涉及富集培养物步骤，在该步骤后，采用后续的生化检测方法、免疫检测方法或遗传检测方法，检测小部分富集培养物的靶标微生物。其他传统的表面微生物取样方法则使用润湿的海绵或拭子来擦拭表面。随后用中和缓冲液或培养基对海棉进行提取，并针对靶微生物的存在检测从海绵提取出的靶标微生物的一部分。相比之下，本发明的装置和方法提供了检测整个初始样品收集物的手段，从而更有可能检测表面上数量非常低的微生物的存在。此外，本发明的装置和方法比用于检测表面样品中的生物体的传统方法更简单且更方便。

[0042] 本发明的装置提供了对依赖于标准琼脂平板法以及其他微生物测试法的现有装置和技术的显著改进。涂覆于本发明装置上的介质不含会不利影响人们显影和分离菌落能力的基质。本方法和装置所提供的介质不仅使得能对生长在装置中的菌落进行计数，而且菌落也可以与在培养皿中的常规琼脂培养基上培育的菌落一样的方式容易地分离而用于进一步检测。本装置具有添加的结构，即比培养皿更紧凑且重量更轻，并且在实验室的占据空间更小。此外，本装置是完全一次性的，使得能在使用后更安全且能更快速地清除。

[0043] 样品收集器

[0044] 图 1 示出了样品收集器 110 的一个实施例，其具有用于对环境表面或患者表面取样的相对平滑的基材 112。基材 112 具有上主表面 114 和下主表面 116。基材 112 的主表面中的至少一个是水不能透过的和 / 或可包括水不能透过涂层。在一些实施例中，样品收集器 110 是相对柔性的，使得其能够适形于不平的表面且保持与之接触。将样品收集器 110 的至少一个主表面与样品区接触，以实现材料如液体、固体、半固体或其组合从样品区转移至样品收集器 110。样品收集器 110 可用于从样品区例如食品接触表面或浅表伤口收集待分析的材料。

[0045] 样品收集器 110 的基材 112 可由多种材料构造。合适的材料的非限制性例子包括：塑料薄膜，例如聚乙烯、聚丙烯或聚酯；纤维素材料，例如纸张或纸板，其包括涂层或组合物以赋予至少一个主表面水不能透过性；泡沫，例如聚乙烯或聚苯乙烯泡沫；或其至少一个主表面为水不能透过的织物。

[0046] 在一些实施例中，样品收集器 110 的至少一个主表面经过纹理化处理。如本文所用，单词“纹理化”指用于收集样品材料的表面的外形。例如，样品收集器 110 的主表面的纹理可相对平滑，如图 1 所示。或者，样品收集器 110 的主表面的纹理可相对粗糙。图 2A 示出了包括纹理相对粗糙的主表面 214 的样品收集器 210 的一个实施例。在该实施例中，基材 212 可包括凸起结构 218 和凹陷结构 220 的组合。或者，基材 212 可包括突起结构 218 或凹陷结构 220。突起结构 218 可以多种尺寸存在，并且可以多种形状例如突起、钉状、脊状等或它们的组合存在。突起结构 218 可无规地分布在基材 212 的整个表面上，或者作为另外一种选择，可以均匀地间隔开。凹陷结构 220 可以多种尺寸存在，并且可以多种形状例如洞、凹坑、谷状、槽、沟槽、微槽道等或它们的组合存在。突起结构 218 或凹陷结构 220 可

以是制造样品收集器 210 的基材 212 材料的一体部分。或者，可以将这些结构粘合至基材 212。不受理论的约束，据信包括突起结构 218 或凹陷结构 220 的样品收集器 210 通过提供了从待取样表面捕集样品材料和 / 或刮擦和收集材料的结构，从而在从环境表面或患者表面收集样品材料方面具有优势。在图 2A 中还示出了可选的凸出部 228，其提供了在收集样品时便于把持样品收集器 210 的区域。

[0047] 图 2B 示出了具有可选的纹理化表面的样品收集器 210。样品收集器 210 可包括通过粘合剂层 222 粘附至基材 212 的主表面的粘合的材料 224，例如非织造材料。粘合剂层 222 可以是水不溶性的，应不会抑制微生物的生长，并且应能够经受住灭菌处理。优选的是，粘合剂层 222 和粘合的材料 224 在润湿时是充分透明的，以能够透过涂覆有粘合剂层 222 的基材 212 观察细菌菌落。在一些实施例中，粘合剂层 222 包括压敏粘合剂。粘附至基材 212 的粘合的材料 224 的示例性实施例包括非织造材料，例如通过压敏粘合剂层 222（例如增粘的高压敏丙烯酸异辛酯 / 丙烯酸共聚物粘合剂，96 重量％的丙烯酸异辛酯和 4 重量％的丙烯酸）粘附至塑料基材 212（例如白色聚酯，厚度为 5 密尔 (0.13mm)）的购自 Gehring Textiles, Inc.(Garden City, NY) 的毛圈针织非织造物或玻璃纤维滤纸。或者，粘合的材料 224 可包括其他纹理化材料，例如泡沫（如聚氨酯泡沫）、织物或纤维素材料（如滤纸）。图 1C 中还示出了凸出部 228，其可利用穿孔 226 从样品收集器 210 方便地脱开。

[0048] 样品室

[0049] 样品室是其上布有样品材料的样品收集器可置于其中并任选存储一段时间的制品。样品室还可用作可向其内添加溶液和 / 或试剂以有利于微生物的生长、检测或计数的制品。在某些实施例中，样品室可用作样品在其内与试剂条和 / 或试剂一起温育以有利于微生物的生长、检测或计数的制品。

[0050] 图 3A 示出了示例性的样品室 360。该样品室 360 包括底部构件 350、阻挡层 370 和覆盖片 330。

[0051] 底部构件 350 包括具有上主表面和下主表面的自支承的水不能透过基材 352。底部构件 350 优选为相对刚性的材料，例如聚酯膜、聚丙烯膜或聚苯乙烯膜，其不会吸入水或受水的影响。例如，大约 0.004 至 0.007 英寸 (0.1-0.2mm) 厚的聚酯膜、大约 0.004 至 0.008 英寸 (0.1-0.2mm) 厚的聚丙烯膜和大约 0.015 英寸 (0.38mm) 厚的聚苯乙烯膜都应该极为奏效。其他合适的基材包括带聚乙烯涂层或其他防水涂层的纸张。底部构件 350 可以是透明的或不透明的，这取决于人们是否希望透过底部构件 350 观察菌落。为了有利于对菌落进行计数，底部构件 350 可具有印刷在其上的正方形网格图案，如美国专利 No.4,565,783 中所述的，将该专利以引用方式并入本文中。用于构造底部构件 350 的材料应该对微生物来说是相对惰性的并且应该与灭菌处理相容。

[0052] 在该实施例中，底部构件 350 进一步由设置在基材 352 的上表面的粘合剂层 354 和垫片 356 构成。粘合剂层 354 在垫片 356 和基材 352 之间形成连接。粘合剂层 354 应该根据针对上述样品收集器 210 的粘合剂层 222 的指导原则进行选择。包括孔 357 的垫片 356 应该由水不溶性材料构造。孔 357 的壁提供了具有预定尺寸和形状的凹槽来限定添加至样品室 360 的液体介质的体积。垫片 356 的厚度以及孔 357 的大小应该足以形成具有所需容积（例如 1 毫升、2 毫升、3 毫升或 5 毫升）的凹槽。闭孔聚乙烯泡沫或聚苯乙烯泡沫是适用于垫片 356 的材料，但是可以使用为疏水性（不可润湿）的、对微生物惰性的材料，

并且优选能够经受住灭菌处理的材料。如图 3A 中所示，由孔 357 形成的凹槽的底部可包括粘合剂层 354，其可用于固定样品收集器（在图 3A 中未示出）。或者，由孔 357 形成的凹槽的底部可包括连接结构（在下文描述）或无粘合剂层 354 或连接结构。

[0053] 附接至垫片 356 的上表面的是阻挡层 370。在该实施例中，垫片 356 和阻挡层 370 通过双面胶带 340 接合在一起。阻挡层 370 应该是防水的。阻挡层 370 优选为透明的以使得能观察位于阻挡层 370 下面的物体，并且优选为细菌、水和水汽基本上不可渗透的。一般来讲，阻挡层 370 可具有与底部构件 350 相同的性质，但不需要为刚性的。用于阻挡层 370 的示例性材料包括（例如）聚丙烯膜（例如 1.6 密耳的双轴取向聚丙烯 (BOPP)）或聚乙烯薄膜。重新参考图 3A，阻挡层 370 显示具有可选的穿孔 372，其容易被撕裂以使得能从样品室 360 移除阻挡层 370 的至少一部分。阻挡层 370 还显示具有可选的延伸部或凸出部 374，其使得阻挡层 370 容易抓握以撕裂穿孔 372。

[0054] 附接至阻挡层 370 上表面的是覆盖片 330。阻挡层 370 和覆盖片 330 通过双面胶带 340 接合在一起。垫片 356 与阻挡层 370 的附接以及接近样品室 360 的边缘的覆盖片 330 便利地形成了允许提起阻挡层 370 和 / 或覆盖片 330 的铰链区 345，因此可暴露样品室 360 的内部部分同时保持组成部件的对齐。可将某些低粘着性粘合剂混合物（例如在美国专利 No. 5,118,750 中描述的那些）用于双面胶带 340 的至少一个侧面，在元件（例如，覆盖片、阻挡层和底部构件）之间形成可脱开的连接。作为另一种选择，覆盖片 330 和阻挡层 370 可通过其他手段（例如超声焊接、夹持或网装固定）接合至底部构件 350。

[0055] 覆盖片 330 包括具有上主表面和下主表面的基材 332。在下主表面（面向阻挡层 370）的至少一部分上涂覆有粘合剂层 334。包括至少一种胶凝剂的冷水溶性粉末 336 粘附至该粘合剂层 334。或者，覆盖片 330 的至少一部分（例如铰链区 345）可仅涂覆有粘合剂或者可基本上无任何类型的涂层。

[0056] 粘合剂层 334 应该以优选小于粉末状胶凝剂和 / 或营养物质粒子的直径的厚度涂覆于覆盖片 330 上。目标是在粘合剂层 334 中施加足够的粘合剂来使粒子粘附至基材，但不应太多而使得粒子完全嵌入粘合剂内。粉末 336 的均一单层具有足够的表面积暴露于水合作用是理想的。一般来讲，厚度范围为 0.0002 至 0.0005 英寸 (0.005-0.012mm) 的粘合剂层 334 是合适的。用于粘合剂层 334 的示例性粘合剂为丙烯酸异辛酯 / 丙烯酰胺共聚物（摩尔比为 94/6）。可使用的其他压敏粘合剂包括丙烯酸异辛酯 / 丙烯酸共聚物（摩尔比为 95/5 或 94/6）和硅橡胶。暴露于水时变成乳状的粘合剂是次优选的，但可结合不透明基材使用或在不要求菌落显现的情况下使用。

[0057] 将单层冷水溶性粉末 336 均一地粘附至粘合剂层 334。粉末 336 可包含胶凝剂或胶凝剂的混合物。如说明书和权利要求书中所用，术语“粉末”指平均直径小于 400 微米的细分颗粒物质。如说明书和权利要求书中所用，术语“冷水溶性”指可在室温下形成水溶液的材料。包括在粉末 336 中的合适胶凝剂包括可在室温下形成水溶液的天然胶凝剂和合成胶凝剂两者。胶凝剂例如羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、聚丙烯酰胺、刺槐豆胶和褐藻胶可在室温下形成水溶液，并且是用于提供“冷水溶性”粉末的合适胶凝剂。用于粉末 336 的优选胶凝剂是瓜耳胶和黄原胶，这些胶凝剂可单独使用或者可彼此组合使用。

[0058] 胶凝剂优选以足以形成布氏粘度 (Brookfield viscosity) 为至少 1500 厘泊的基本透明的凝胶的量存在。应该将足够量的胶凝剂粘附至覆盖片 330，以使得样品室 360 中

放置的预定量（例如 1-3 毫升）的水或含水样品能形成用 Brookfield Model LVF 粘度计在 25℃以 60rpm 测量时，粘度为约 1500 厘泊或更大的凝胶。该粘度的凝胶将使得能方便地处理和堆集并提供不同菌落的识别。在大多数情况下，3.14 英寸^2(5.07cm^2) 表面积上的 0.025 至 0.050 克瓜耳胶在与 1-3 毫升含水样品水合时将形成充分粘稠的凝胶。粉末 336 粒子的粒度可用于控制每单位面积的涂层重量。例如，大约 100 目瓜耳胶涂层对应每 2 英寸 (5.1cm) 直径的圆盘形表面为约 0.05 克的重量；而 400 目瓜耳胶涂层对应每 2 英寸 (5.1cm) 直径的圆盘形表面为约 0.025 克的重量。

[0059] 覆盖片 330 提供了用于覆盖样品室 360 以防止在样品存储和 / 或温育期间受到污染的装置。覆盖片 330 可以为直接或间接以类似铰链区的方式粘附至底部构件 350 的一个边缘的防水片材。覆盖片 330 优选为透明的以有利于对菌落进行计数，并且是细菌和水基本上不可渗透的。如本文所用，“细菌和湿蒸气基本上不可渗透的”指这样的覆盖片 330：在运输、存储和使用装置期间其能防止样品室 360 免受不希望的污染，并且其可提供将在温育期间支持微生物生长的环境。一般来讲，其可具有与底部构件 350 相同的性质，但不需要为刚性的。可选择覆盖片 330 以提供期望培养的微生物类型所需的氧传输量。例如，聚酯膜具有低的透氧度（每 0.001 英寸 (0.025mm) 厚度低于 5g/100 英寸^2(645cm^2)/24 小时），并且将适合培养厌氧细菌。另一方面，聚乙烯具有非常高的透氧度（每 0.001 英寸 (0.025mm) 厚度约 500g/100 英寸^2(645cm^2)/24 小时），并且将适于好氧生物体。用于覆盖片 330 的优选材料是 1.6 密耳的双轴取向聚丙烯膜。

[0060] 可仅将覆盖片 330 提起，将液体样品悬浮介质置于基材上，然后将覆盖片 330 回复到其初始位置，从而封入胶凝介质内。覆盖片 330 优选为透明的以使得能观察菌落。可方便地对用于形成覆盖片 330 的材料进行选择以获得对气体如氧气的理想渗透性。

[0061] 图 3B 示出了图 3A 的样品室 360 的顶视图。铰链区 345 沿样品室 360 的顶部边缘设置。可选的穿孔 372 邻近铰链区 345。垫片 356 中的圆形孔 357 位于样品室 360 的中心区域。可观察到阻挡层 370 的凸出部 374 延伸超过覆盖片 330 的边缘，与铰链区 345 相对地位于样品室 360 的一端。

[0062] 图 4 示出了样品室 460 的可供选择的实施例。该样品室 460 由通过（例如）双面胶带 440 在铰链区 445 固定的覆盖片 430、阻挡层 470 和底部构件 450 元件构成。在该实施例中，底部构件 450 包括基材 452 和可任选的连接结构 458。连接结构 458 可包括粘合剂、钩环连接部件的元件、杆状网结构 (stem web structure) 例如美国专利申请公开 No. 2003/0088946A 中描述的那些等，其可用于将样品收集器保持在合适的位置。阻挡层 470 可包括穿孔 472 和 / 或凸出部 474，并且可如上所述构造。在某些实施例中，阻挡层 470 的下主表面可包括防粘材料，以防止与连接结构 458 粘附。防粘涂层是本领域已知的，并且在常规上用于减少粘合剂与塑料膜之间的粘附。覆盖片 430 包括基材 432、粘合剂层 434 和粉末 436，并且可如上所述构造。

[0063] 试剂条

[0064] 图 5 示出了根据本发明试剂条 580 的一个实施例。试剂条 580 由具有上主表面和下主表面的基材 582 构成。在该实施例中，基材 582 的两个主表面的至少一部分涂覆有任选的粘合剂 584 和亲水性试剂 586。在一些实施例中，基材 582 的一个主表面的至少一部分涂覆有任选的粘合剂 584 和 / 或亲水性试剂 586。在一些实施例中，试剂条 580 包括任选

的突出部 588。该突出部可包括任选的穿孔 589，该穿孔使得突出部 588 能与试剂条 580 分离。

[0065] 检测样品中的微生物通常涉及试剂（例如亲水性试剂）的使用，以促进生长、抑制生长和 / 或检测某些微生物的代谢活性。本文所用的“亲水性试剂”包括可用于促进某些微生物生长的一定浓度的营养物质（如，蛋白质、肽、糖、维生素）、可用于选择抑制某些微生物生长的一定浓度的盐（如，NaCl、LiCl、亚碲酸钾）或抑制剂（如萘啶酸、氨曲南、其他抗生素、染料）、可用于检测代谢活性（例如酶活性或发酵过程）的非抑制性浓度的染料或指示剂（如氯化三苯基四唑、氯酚红、溴百里酚蓝、邻 - 硝基苯基磷酸盐、5- 溴 -4- 氯 -3- 吲哚基 -β- 吡喃葡萄糖苷）和胶凝剂（如琼脂、黄原胶、瓜耳胶）。

[0066] 当涂覆某些亲水性试剂 586（例如粉末）至基材 582 上时可能需要粘合剂 584，如上所论述的。在一些实施例中，亲水性试剂 586 包含胶凝剂，在水合以形成凝胶时，可将胶凝剂直接涂覆于基材 582 上。基材 582 可选自多种材料，例如上面关于底部构件所述的材料、阻挡层和覆盖片。在某些实施例中，试剂条 580 的基材 582 是自立式的。在某些实施例中，试剂条 580 的基材 582 可基本上是水不可透过的。在可供选择的实施例中，试剂条 580 的基材 582 可以是吸水材料，例如滤纸或亲水性泡沫。在某些实施例中，试剂条 580 可用聚乙烯涂覆的纸张构造，并可包括任选的印刷网格（未示出）以便于对微生物菌落进行计数。

[0067] 可能有利的是将染料掺入包括在试剂条 580 上的亲水性试剂 586 中。可将染料掺入涂覆在基材 582 上的凝胶或粉末混合中。作为另一种选择，可将染料掺入粘合剂 584 中。合适的染料是可由生长的微生物代谢的那些以及引起菌落着色以更易于显影的那些。这类染料的例子包括氯化三苯基四唑、对甲苯基四唑红、四唑紫、藜芦基四唑蓝和相关的染料。其他合适的染料是对 pH 改变敏感的那些，例如中性红或氯酚红。

[0068] 试剂条 580 上的亲水性试剂 586 中采用的材料是可用冷水重构的。如本文所用，“可用冷水重构的”指可在室温下的水中形成溶剂、溶胶或凝胶的材料。适于包括在该实施例的涂层中的胶凝剂（如果涂层中包含胶凝剂的话）包括上述胶凝剂，例如瓜耳胶和刺槐豆胶，其可在室温下的水中形成溶液。

[0069] 该试剂条可用于选择某种微生物（例如李斯特菌属成员）的生长。在这些实施例中，亲水性试剂可包括营养物质和选择性抑制剂的组合，相比于可能存在于表面样品中的其他微生物该组合物有利于李斯特菌属物种的生长。例如，该试剂条可包括一定浓度的酪蛋白胰酶消化物、胨胨（例如 3 号胨胨）、酵母提取物、缓冲系统（磷酸二钠和磷酸二氢钾）、氯化钠、氯化锂、萘啶酸、吖啶黄、羟羧氧酰胺菌素和硫酸多粘菌素 B，它们可有效支持李斯特菌属物种的生长和 / 或抑制非李斯特菌属物种的生长。该试剂条可另外包括指示剂系统，例如有效浓度的显色酶底物（如，6- 氯 -3- 吲哚氧基 -α-D- 吡喃甘露糖苷）以及任选的相应酶诱导剂（如，1-O- 甲基 -α-D- 吡喃甘露糖苷）以检测样品中李斯特菌属物种的存在。

[0070] 微生物检测或计数制品

[0071] 本发明包括用于对表面样品中的微生物进行检测和 / 或计数的制品。这种制品（包括先前描述的样品室）包括上述元件（如覆盖片、样品收集器、阻挡层、底部构件）的多种组合。

[0072] 图 6 示出了用于样品收集和微生物计数的制品 600 的一个实施例。制品 600 由样

品收集器 610 和试剂条 680 元件构成，如上所述进行构造。样品收集器 610 包括水不能透过的基材 612 和粘合的材料 624。粘合的材料 624 通过粘合剂 622 附接到基材 612。在该实施例中，试剂条 680 包括具有上表面和下表面的自支承基材 682，其中一个主表面的至少一部分涂覆有亲水性试剂 686。图 6 中还示出了可任选的粘合剂 684。在该实施例中样品收集器 610 和试剂条 680 通过在铰链区 645 的双面胶带 640 附连。某些低粘着性的粘合剂混合物（例如美国专利 No. 5,118,750 中描述的那些）可用于双面胶带 640 的至少一侧上，以在样品收集器 610 和试剂条 680 之间形成可脱开的（并且可重新粘附的）连接。

[0073] 优选的是，样品收集器 610 和试剂条 680 在靠近制品 600 的一个边缘附连，形成铰链区 645。技术人员将认识到用于形成铰链区 645 的其他合适方法，例如粘合剂、热粘合、超声焊接等等。还考虑的是，用单片水不能透过的材料形成样品收集器 610 和试剂条 680，其中铰链区 645 通过将材料自身回叠而形成（未示出）。

[0074] 图 7 示出了用于样品收集和微生物计数的制品 700 的可供选择的实施例。制品 700 由样品收集器 710、覆盖片 730 和底部构件 750 元件构成，这些元件如上所述进行构造。覆盖片 730 由基材 732、粘合剂层 734 和粉末 736 构成。样品收集器 710 可经由双面胶带 740 附接至覆盖片 730。样品收集器 710 包括粘合的材料 724，用于样品收集，该粘合的材料通过粘合剂层 722 附接至基材 712。在该实施例中，样品收集器 710 在靠近铰链区 745 处包括穿孔 726，用于容易地将样品收集器 710 从制品 700 移除。样品收集器还包括突出部 728，以在处理过程中抓住样品收集器 710。底部构件 750 经由双面胶带 740 附接至样品收集器 710。底部构件 750 包括基材 752 和任选的连接结构 758，样品收集器 710 可与该连接结构附连。该连接结构 758 可包括粘合剂、钩环连接部件的元件等，其可用于保持样品收集器 710 就位。在某些实施例中，当所述连接结构 758 包括粘合剂时，样品收集器 710 朝向连接结构 758 的主表面可包括防粘材料，以控制样品收集器 710 与连接结构 758 的粘合。防粘涂料是本领域已知的，并且通常用于降低粘合剂和塑料膜之间的粘附力。

[0075] 图 8 示出了用于样品收集和微生物计数的制品 800 的可供选择的实施例。制品 800 由覆盖片 830、阻挡层 870、样品收集器 810 和底部构件 850 元件构成，这些元件如上所述进行构造。覆盖片 830 由基材 832、粘合剂层 834 和粉末 836 构成。样品收集器 810 可经由双面胶带 840 附接至覆盖片 830。样品收集器 810 包括粘合的材料 824，用于样品收集，该粘合的材料通过粘合剂层 822 附接至基材 812。在该实施例中，样品收集器 810 在靠近铰链区 845 处包括穿孔 826，用于容易地将样品收集器 810 从制品 800 移除。样品收集器还包括突出部 828，以在处理过程中抓住样品收集器 810。阻挡层 870 经由双面胶带 840 附接至样品收集器 810。阻挡层 870 还包括靠近铰链区 845 处的穿孔 872 和突出部 874，该突出部用以在处理过程中抓住阻挡层 870。底部构件 850 经由双面胶带 840 附接至阻挡层 870。底部构件 850 包括基材 852 和可任选的连接结构 858，样品收集器 810 可与该连接结构附连。该连接结构 858 可包括粘合剂、钩环连接部件的元件等，其可用于保持样品收集器 810 就位。在某些实施例中，当所述连接结构 858 包括粘合剂时，阻挡层 870 朝向连接结构 858 的主表面可包括防粘材料，以控制样品收集器 810 与连接结构 858 的粘合。防粘涂料是本领域已知的，并且通常用于降低粘合剂和塑料膜之间的粘附力。

[0076] 样品和微生物

[0077] 本发明的一个方面是，其可用于检测各种各样的表面上存在的生物体。本发明的

装置和方法可用于其中希望对表面上存在的生物体进行检测的各种应用，所述的表面包括但不限于：食物表面（如牛胴体、生产的外部表面）、食品加工表面、水或水膜表面、患者表面、患者处理表面、医院环境表面、临床环境表面以及法医环境表面。这些样品可基本上由单独的或成多种组合的固体、半固体、凝胶状或液态材料组成。本发明的设备和系统以及本发明方法，可用于定性或定量地测定一种或多种所关注的微生物的存在。

[0078] 一种示例性的所关注的临床分析物是金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)。这是一种引起广谱感染的病原体，这些感染包括：浅表病变，例如小的皮肤脓肿和伤口感染；系统性的且危及生命的病症，例如心内膜炎、肺炎和败血病；以及中毒，例如食品中毒和中毒性休克综合征。某些菌株（如耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌或 MRSA）对所有的而不是一些选择的抗生素有抗性。

[0079] 要在食品加工区域检测的示例性的所关注分析物是李斯特菌属的成员。李斯特菌属被分类为革兰氏阳性细菌并且由如下种组成：单核细胞增多性李斯特菌 (Listeria monocytogenes)、无害李斯特菌 (L.innocua)、威氏李斯特菌 (L.welshimeri)、斯氏李斯特菌 (L.seeligeri)、绵羊李斯特菌 (L.ivanovii) 和格雷氏李斯特菌 (L.grayi)。其中，单核细胞增多性李斯特菌是造成大多数人李斯特菌病例的原因，并且免疫失能的、孕妇、老年人和新生儿具有增加的感染易感性。李斯特菌病的最普通症状是败血病、脑膜炎和流产。

[0080] 特别关注用于分析目的的其他微生物包括原核生物和真核生物，特别是革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、真菌、支原体和酵母。特别相关的生物体包括如下科属的成员：肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)，或微球菌科 (Micrococcaceae) 或葡萄球菌属 (Staphylococcus spp.)、链球菌属 (Streptococcus spp.)、假单胞菌属 (Pseudomonas spp.)、肠球菌属 (Enterococcus spp.)、沙门氏菌属 (Salmonella spp.)、军团菌属 (Legionellaspp.)、志贺杆菌属 (Shigella spp.)、耶尔森氏菌属 (Yersinia spp.)、肠杆菌属 (Enterobacter spp.)、埃希杆菌属 (Escherichia spp.)、芽孢杆菌属 (Bacillus spp.)、弧菌属 (Vibrio spp.)、梭菌属 (Clostridium spp.)、棒杆菌属 (Corynebacteria spp.) 以及曲霉菌属 (Aspergillus spp.)、镰刀菌属 (Fusarium spp.) 和假丝酵母 (Candida spp.)。毒性特别强的生物体包括金黄色葡萄球菌（包括抗性菌株例如耐甲氧苯青霉素金黄色葡萄球菌 (MRSA))、表皮葡萄球菌 (S.epidermidis)、肺炎链球菌 (Streptococcuspneumoniae)、无乳链球菌 (S.agalactiae)、酿脓链球菌 (S.pyogenes)、粪肠球菌 (Enterococcus faecalis)、耐万古霉素肠球菌 (VRE)、耐万古霉素金黄色葡萄球菌 (VRSA)、万古霉素敏感性减低金黄色葡萄球菌 (VISA)、炭疽芽孢杆菌 (Bacillus anthracis)、铜绿假单胞菌 (Pseudomonasaeruginosa)、大肠杆菌、黑曲霉 (Aspergillus niger)、烟曲霉 (A.fumigatus)、棒曲霉 (A.clavatus)、茄病镰刀菌 (Fusarium solani)、尖孢镰刀菌 (F.oxysporum)、厚孢镰刀菌 (F.chlamydosporum)、霍乱弧菌 (Vibriocholera)、副溶血性弧菌 (V.parahemolyticus)、猪霍乱沙门菌 (Salmonellacholerasuis)、伤寒沙门菌 (S.typhi)、鼠伤寒沙门菌 (S.typhimurium)、白色念珠菌 (Candida albicans)、光滑念珠菌 (C.glabrata)、克鲁斯念珠菌 (C.krusei)、阪崎肠杆菌 (Enterobacter sakazakii)、大肠杆菌 O157、含 ESBL 的微生物以及多重抗药性的革兰氏阴性杆菌 (MDR)。

[0081] 制品

[0082] 可将本发明的样品室和 / 或制品与包装材料组合并作为试剂盒销售，该试剂盒可

用于对表面上的微生物进行取样和检测。例如，该试剂盒可包括包装在一起的两个或更多个元件（如底部构件、垫片、阻挡层、覆盖片和/或试剂条；每个元件如上所述）。在一些实施例中，可提供相互附接的两个或更多个元件（如底部构件、阻挡层和覆盖片），优选形成铰链区，如示出的实施例所示。在这些实施例中，某些元件（如样品收集器、试剂条和/或阻挡层）可以是可分离的。在其它实施例中，可单独提供元件并且在使用过程中组装。该试剂盒还可包括取样和检测附件，例如样品悬浮介质、吸管、标签、样品载体或手套。

[0083] 环境取样和检测方法

[0084] 本发明包括用于检测环境表面上的微生物的方法。本方法可用于通过观察靶标微生物的微生物生长的指示物，来检测靶标微生物的存在与否。本方法还可用于对样品中的微生物进行计数。在这些方法中使用的元件（如样品收集器、覆盖片、阻挡层等）可单独提供或可以是组件（例如上述样品室）的部件。此外，单个元件和/或组件可在试剂盒中提供，如上所述。本文描述了这些实施例。

[0085] 在一个实施例中，方法包括提供液体样品悬浮介质；样品收集器例如样品收集器210（图2B）、样品室例如包括底部构件450和覆盖片430的样品室460（图4）以及试剂条例如试剂条580（图5）。方法还包括将样品收集器210的主表面之一（例如粘合的材料224）与待测的表面或材料接触。通常，在收集样品时，操作者可使用无菌镊子等，或可用戴上手套的手把持住样品收集器210。将样品收集器210与指定的表面积（例如5cm×5cm、10cm×10cm或25cm×25cm）形成物理接触（如触碰、擦拭或摩擦），以便估计已知维度的区域中微生物的数目。在该实施例中，将阻挡层470从底部构件450提起，将样品收集器210与连接结构458接触，其中样品朝阻挡层470取向。该方法还包括将样品悬浮介质施加至包含样品的样品收集器210的粘合的材料224。样品悬浮介质可用吸管或通过其他合适的装置施加。添加样品悬浮介质后，可放下阻挡层470。可任选的是，可将样品温育一段时间，例如至少30分钟、至少60分钟或至少120分钟，这取决于靶标微生物，以使得受损伤的微生物能恢复。可根据靶标微生物来选择温育温度。在该任选的温育期后，提起覆盖片430并将阻挡层470移除，例如通过在穿孔472处分离阻挡层470。该方法还包括将覆盖片430的下表面与样品悬浮介质接触，以形成水合凝胶。这可例如通过用一只手抓住覆盖片430，用另一只手抓住底部构件450，并提起覆盖片430来完成。尽管水合凝胶在数秒内形成，但优选让凝胶形成至少5-10分钟，更优选至少10-30分钟，然后打开该装置以暴露水合凝胶。凝胶可保持附着在覆盖片430上、凝胶可保持附着在样品收集器210上，或凝胶的分开部分可保持附着在覆盖片430和附着在样品收集器210上。可任选的是，本方法还包括将试剂条580的被涂覆的表面与所述水合凝胶接触。在提升覆盖片430时，可将试剂条580插入样品室460中，其中试剂条580的亲水性试剂586朝所述凝胶取向。将样品室460温育一段时间，以使得样品中存在的微生物数目增加和/或使得微生物的代谢活性能引起指示剂的可检测改变。通常将该装置在25-45℃，优选25-37℃的温度下温育。在某些实施例中，微生物在凝胶中形成离散的菌落。初始样品中的微生物数目可以通过计算菌落数来计数。

[0086] 在另一个实施例中，方法包括提供液体样品悬浮介质；任何样品收集器（见例如图1，2A-B）；样品室，例如包括底部构件350、阻挡层370和覆盖片330的样品室360（图3A）；和试剂条，例如试剂条580（图5）。方法还包括将样品收集器基材的主表面之一或粘合的材料与待测的表面或材料接触。可将样品收集器置于样品室360内，其中样品朝阻挡

层 370 取向。在该实施例中，可提起阻挡层 370 并可将样品收集器置于由孔 357 形成的凹槽中，其中样品向上（朝向阻挡层 370）取向。在一些实施例中，可设计样品收集器的尺寸和形状使得其完全适配于由孔 357 形成的凹槽内。该方法还包括将样品悬浮介质分配于容纳有样品收集器的凹槽中。样品悬浮介质可用吸管或通过其他合适的装置分配。添加样品悬浮介质后，可放下阻挡层 370。可任选的是，可将样品温育一段时间，例如至少 30 分钟、至少 60 分钟或至少 120 分钟，这取决于靶标微生物，以使得受损伤的微生物能恢复。在该任选的温育期后，提起覆盖片 330 并将阻挡层 370 移除，例如通过在穿孔 372 处分离阻挡层 370。该方法还包括将覆盖片 330 的下表面与样品悬浮介质接触，以形成水合凝胶，如上所述。尽管水合凝胶在数秒内形成，但让凝胶形成优选至少 5-10 分钟，更优选至少 10-30 分钟是优选的，然后打开该装置以暴露水合凝胶。可任选的是，本方法还包括将试剂条 580 的被涂覆的表面与所述水合凝胶接触。在该操作中，将覆盖片 330 提起以暴露水合凝胶，将试剂条 580 置于样品室 360 中的孔 357 中和 / 或附近，并将覆盖片 330 放下以将试剂条与水合凝胶形成接触。然后将样品室 360 温育一段时间，之后针对微生物生长的指示剂对该装置进行观察。通常将该装置在 20-45℃，优选 25-37℃的温度下温育。将该装置温育一段时间（如 18-48 小时，这取决于靶标微生物的生长速率和指示剂系统），以使得样品中存在的微生物的数目增加和 / 或使得微生物的代谢活性能引起指示剂的可检测变化。在某些实施例中，微生物在凝胶中形成离散的菌落。初始样品中的微生物数目可以通过计算菌落数来计数。

[0087] 实例

[0088] 实例 1

[0089] 对来自表面的无害李斯特菌的检测和计数

[0090] 试剂条的制备

[0091] 根据表 1 所列出的配方制备用于李斯特菌属物种的生长和检测的液体培养基。酶诱导剂 (1-O- 甲基 -α -D- 吡喃甘露糖苷）和显色酶底物 (6- 氯 -3- 吲哚氧基 -α -D- 吡喃甘露糖苷）购自 Biosynth International(Naperville, IL)。从 Danisco(Kreutzlingen, Switzerland) 购得 M 150 乙醇洗瓜耳胶 (M150 Ethanol-washed Guar)。

[0092] 表 1. 用于李斯特菌属物种的生长和检测的肉汤培养基

[0093]

成分	浓度 (g/L)
酪蛋白胰酶消化物	10.0
3 号际胨	10.0
萘啶酸	0.036
吖啶黄	0.03
羟羧氧酰胺菌素	0.03
硫酸多粘菌素 B(7690 单位 /mg)	0.001

酵母提取物	8.0
氯化钠	40.0
氯化锂	4.5
磷酸二钠	12.0
磷酸一钾	6.0
1-O- 甲基 - α -D- 吡喃甘露糖苷	5.0
6- 氯 -3- 吲哚氧基 - α -D- 吡喃甘露糖苷	2.0
黄原胶	8.0
M150 乙醇洗瓜耳胶	4.0

[0094] 用于涂覆试剂条的基材是 8.5″ 宽、2.91 密耳 (0.07mm) 厚的透明聚酯薄膜。用具有 7 密耳 (0.18mm) 间隙的刮刀式涂胶机将液体培养基涂覆在基材的第一侧面上，随后将涂覆了的基材通过设定在大约 230° F(110℃) 下的干燥烘箱。烘箱干燥时间为大约两分半钟。在该基材的相对侧面上重复该涂覆和干燥工序，得到在两个侧面均涂覆有相同培养基的塑料膜。该被涂覆的薄膜的每一侧面的大致涂料重量为 0.230g/24 英寸^2(0.230g/155cm^2)。将该带双面涂层的基材冲切成圆形物，每个圆形物的直径为 2.875 英寸 (7.30cm)。

[0095] 样品室装置的制备

[0096] 通过将如下元件装配成单一部件而构造样品室装置 :底部构件、泡沫垫片、阻挡层和覆盖片。通过涂覆在底部构件上的粘合剂将泡沫垫片附接至底部构件，如下面论述的。用 3/8 英寸 (9.5mm) 宽的双面胶带将阻挡层沿该泡沫垫片的一个边缘附接。用双面胶带将覆盖膜 (沿相同边缘) 附接至阻挡层。该构造的图示可见于图 3A 和 3B。

[0097] 底部构件由 6.3 密耳 (0.16mm) 厚的带聚乙烯涂层的纸 (83 磅 HDRHI-Lease FA 34 Yellow Grid,Grade 406-83010，购自 Wausau-MoisineePaper Corp.，Rhinelander,WI)。黄色网格 (在整个面积上垂直线条间距 1cm) 印刷在该纸材的未用硅树脂处理的 (“底部”) 侧面。将硅树脂处理过的 (“顶部”) 侧面用丙烯酸异辛酯 / 丙烯酰胺共聚物粘合剂 (96 重量％的丙烯酸异辛酯和 4 重量％的丙烯酰胺，从 3M Company，St.Paul，MN 获得 ;涂料重量为大约 145-200mg/200cm^2) 涂覆。

[0098] 所述垫片由聚苯乙烯泡沫材料 (CL3V 盖垫片，白色，8.5 英寸 (21.6cm) 宽，20 密耳 (0.51mm) 厚 ;可购自 American Fuji Seal，Bardstown，KY) 构成。冲切出 2.875 英寸 (7.30cm) 的圆形区并从该垫片材料移除。然后通过将该底部构件和冲切垫片通过夹紧辊，将该垫片材料层合至底部构件的涂有粘合剂的一侧。该垫片的圆形切除区形成了圆形浅凹或“凹槽”而该底部构件形成了层合物中的凹槽的底部表面，如图 3A 所示。

[0099] 阻挡膜由聚酯 (200 号聚酯膜，颜色为 K399 淡蓝色，可购自 CPFilmsInc.，

Martinsville, VA) 构成。在该阻挡层的一侧涂上防粘层。用双面胶带将该阻挡膜沿该薄膜垫片的一个边缘附接，使得该阻挡膜的带防粘层的侧面面向该底部构件。

[0100] 覆盖片用 1.6 密耳 (0.04mm) 厚的双轴取向聚丙烯 (BOPP) 膜构造，该膜先前已用丙烯酸异辛酯 / 丙烯酰胺共聚物粘合剂 (96 重量％丙烯酸异辛酯和 4 重量％丙烯酰胺，涂层重量大约 165-260mg/200cm^2) 涂覆。随后将该 BOPP 膜的被粘合剂涂覆的侧面用 M150 非乙醇洗瓜耳胶粉末 (可购自 Danisco ；粉末涂料重量大约 0.30-0.60g/24 英寸^2(0.30-0.60g/155cm^2) 涂覆。用双面胶带将该覆盖片附接至该阻挡层，如上所述。

[0101] 样品收集器的制备

[0102] 构造了两种类型的样品收集器。I 型样品收集器用透明的 3 密耳聚酯膜构造。将该膜冲切成 2.875 英寸 (7.3cm) 直径的圆片。II 型样品收集器通过将非织造材料层合至塑料基材来构造。对于 II 型样品收集器，将增粘的高压敏丙烯酸异辛酯 / 丙烯酸共聚物粘合剂 (96 重量％的丙烯酸异辛酯和 4 重量％的丙烯酸，Part Number AZ-1229，3M Company，St. Paul，MN，涂层厚度为大约 2 密尔 (0.05mm)) 层合至 5 密耳 (0.13mm) 厚的白色聚酯膜 (226Melinex，可购自 DuPont Teijin Films，Hopewell，VA)，然后将吸收性材料 (如表 2 所示) 层合至该粘合剂。在制备层合物后，将 II 型样品收集器冲切成 2.875 英寸 (7.24cm) 直径的圆形物。表 2 列出了在这些实验中使用的样品收集器。

[0103] 表 2. 样品收集器

[0104]

样品收集器	说明	类型	非织造材料
A	3 密尔 (0.08mm) 透明聚酯膜	I	无
B	聚酯层合物	II	毛圈针织物 (款式号 WW1112，Gehring Textiles，Inc.，Garden City，NY)
C	聚酯层合物	II	40HEX VisPore 膜 (0.000125 英寸厚度，Tredegar Film Products，Richmond，VA)

[0105] 接种表面的制备

[0106] 将无害李斯特菌 (ATCC#33091) 在具有 0.6％酵母提取物的胰酶大豆肉汤于 35℃过夜培养。将 75 微升的该过夜培养物稀释进 50mL 具有 0.6％酵母提取物的胰酶大豆肉汤中。振荡该悬浮液，用无菌的顶部为涤纶聚酯的涂敷器将两份 0.5mL 样品铺在平坦的无菌不锈钢的 4x4 英寸区域上。让该不锈钢表面在室温下干燥。在该不锈钢表面干燥后，将上述装置用于收集并定量该不锈钢表面上的微生物。

[0107] 表面检测程序

[0108] 与标准方法比较来评价下面描述的实验程序，该标准方法包括 ：i) 将用中和缓冲液预先润湿的海绵 (Nasco，18 盎司 Whirl-Pak HydratedSpeci-Sponge 袋，产品 ID-B01422WA，购自 Hardy Diagnostics，SantaMaria，CA) 在 4 英寸 ×4 英寸 (103cm^2) 的接种面积上摩擦，并放回其原来所处的袋中。ii) 将 5 毫升缓冲蛋白胨水加至装有该海绵

的袋中，手动揉捏大约 30 秒以使细菌从该海绵释放出来，iii) 让装有该海绵和缓冲蛋白胨水的袋在室温下放置 1-1.5 小时，iv) 用吸管从该袋中移出 3 毫升液体悬浮液并分散进 Petrifilm™环境李斯特菌检测片 (EnvironmentalListeria plate)(3M Company,St.Paul, MN) 中，并且 v) 将该 Petrifilm 检测片温育，并根据生产商的说明书判读任何菌落的出现。

[0109] 在实验程序中，将样品收集器在所述接种过的干燥不锈钢表面的 4 英寸 ×4 英寸 (103cm^2) 的区域上摩擦 30 至 60 秒的时间。在某些情况下，该样品收集器是干燥的。在其他情况下，通过用喷雾瓶将轻气溶胶（大约 0.5-1.0 毫升的缓冲蛋白胨水）施加至样品收集器来将该样品收集器预先润湿。

[0110] 将样品收集器放进样品室的由泡沫垫片形成的“凹槽”中，以样品侧朝上（朝向聚酯阻挡层）。然后将样品室在室温下保持大约 25 分钟。将覆盖片和阻挡膜提离泡沫垫片，移除阻挡膜，并将 3mL 的缓冲蛋白胨水吸移至样品收集器上。将覆盖膜用双面胶带重新附接至该泡沫垫片，随后将覆盖片放低至泡沫垫片上，使粉末状瓜耳胶与缓冲蛋白胨水接触而形成凝胶。将该样品室在水平表面上放置大约 60 分钟，以允许某些微生物生长。然后，提起覆盖片，将带双面涂层的试剂条插入该样品室，使得试剂条的一侧与样品收集器接触，另一侧与覆盖片的水合部分接触。然后将样品室置于 35℃的培养箱 26 小时。对该试剂条检验菌落的存在（其通常作为各种尺寸的小点出现，具有不同色调的微红色）。该测试的结果在表 3 和表 4 中示出。

[0111] 表 3 :微生物计数（每个数代表来自单个检测片的菌落计数）

[0112]

样品收集器材料	集落形成单位/样品	
	干燥的样品收集器	润湿的样品收集器
标准方法	不适用	29
聚酯膜	0	70
毛圈针织物	35	32
40 HEX VisPore 膜	17	41

[0113] 表 4 :菌落外观

[0114]

样品收集器材料	温育 26 小时后的菌落外观	
	干燥的样品收集器	润湿的样品收集器
聚酯膜 -3 密耳	无可见的菌落。	菌落大小、形状和颜色（红色）与标准方法一样。
毛圈针织物	菌落的大小和形状与标准方法大致相同，但与标准方法中观察到的菌落比较，菌落颜色为较浅色调的红色，菌落边界较不明显。	菌落大小、形状和颜色与标准方法一样。
40 HEX VisPore 膜	菌落的大小和形状与标准方法大致相同，但与标准方法中观察到的菌落比较，菌落颜色为较浅色调的红色，菌落边界较不明显。	菌落的大小和形状与标准方法大致相同，但与标准方法中观察到的菌落比较，菌落颜色为较浅色调的红色，菌落边界较不明显。

[0115] 实例 2

[0116] 对来自表面的金黄色葡萄球菌的检测和计数

[0117] 样品室装置的制备

[0118] 该实验中所用的样品室为来自 3M Company(St.Paul，MN) 的 3MPETRIFILM 金黄色葡萄球菌快速检测片 (Staph Express(STX)CountSystem plates)。在该实验中使用该检测片之前，将每个检测片中的干培养基用 1 毫升 Butterfield 氏磷酸盐稀释液水合并让其胶凝。

[0119] 样品收集器的制备

[0120] I 型样品收集器用透明的 3 密耳聚酯膜构造，如实例 1 所述。通过使用压敏丙烯酸类粘合剂，将指定的粘合的材料（干酪包布）层合至透明的 3 密尔聚乙烯膜来构造 II 型样品收集器。CEREX G192988 非织造材料可购自 CEREX Advanced Fabrics(Cantonment，FL)。HanesWetlaid Hydroguard 150HEM PET/ 纤维素可购自 Hanes Industries(Conover，NC)。将该 Hanes 材料用 SPAN 20（可购自 Uniquema，Stanford，FL) 预处理，以使其具有亲水性。预处理包括用 SPAN-20(97.5% w/v 异丙醇中的 2.5% w/v 的 SPAN-20- 脱水山梨醇单月桂酸酯）预处理直至织物用该溶液饱和。让织物在室温下风干。通过将数滴水转移至织物表面上来观察水被吸收（芯吸）进织物中而对处理过的织物的一部分进行检测。

[0121] 接种表面的制备

[0122] 将金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 在胰酶大豆肉汤中于 35℃培养 18 小时。将 20 毫升的过夜培养物稀释进 99mL 的 Butterfield 氏磷酸盐稀释液中，将所得的混合物振荡以使细菌在悬浮液中均匀分布。将 1 毫升该缓冲过的细菌悬浮液转移至另一瓶 (99mL) Butterfield 氏磷酸盐稀释液中。振荡稀释度悬浮液，用无菌玻璃涂布器将 3 份 0.5mL 样品

在单独的平坦无菌不锈钢试样块的 4×4 英寸区域上涂布。让该不锈钢表面在层流通风橱中于室温下干燥 30-60 分钟。据估计，在该程序中每块不锈钢试样块温育后具有大约 60 个金黄色葡萄球菌的集落形成单位 (CFU)。在该钢表面干燥后，将上述样品收集器用于收集并定量该不锈钢表面上的微生物。

[0123] 表面检测程序

[0124] 通过用喷雾瓶将 Butterfield 氏磷酸盐稀释液的轻气溶胶（大约 0.5-1.0mL）施加至样品收集器来将其润湿。通过在温育过的干燥不锈钢表面的 4 英寸 ×4 英寸 (103cm^2) 区域用力摩擦样品收集器的表面来收集样品。以一个方向从一侧到另一侧摩擦该表面，然后以与最初摩擦表面的方向垂直的方向从一侧到另一侧摩擦。

[0125] 提起预先水合过的 PETRIFILM STX 检测片的覆盖片，暴露泡沫垫片中央的凹槽（即由脱水介质形成的凝胶保持附着在覆盖片上）。将样品收集器放进样品室中（放入由泡沫垫片中的孔形成凹槽中），以样品侧朝上（朝向覆盖片）。放下覆盖片，使水合凝胶与样品收集器上的样品接触。将样品室置于 35℃的培养箱中约 18 小时，并对菌落（显示为小的红点）进行计数。每个检测片中的菌落数目在表 5 中示出。在将聚乙烯膜样品作为收集器的实验中不存在集落形成单位可能是由于在实验过程中接种在测试表面上的细菌的活力丧失。

[0126] 表 5：微生物计数（每个数代表来自单个检测片的菌落计数）

[0127]

样品收集器基材 / 粘合的材料	集落形成单位 / 样品
聚乙烯薄膜 / 无	0
聚乙烯薄膜 / 干酪包布	10
聚乙烯薄膜 / CEREX G192988	8

[0128] 本发明现已结合本发明人可预见的可给出实施性描述的几个具体实施例，对本发明进行了描述。但本发明的缺乏实质性的修改形式（包括目前没有预见的修改形式）可构成本发明的等价形式。因而，本发明的范围不应受限于本文所述的细节和结构，而是仅受下面的权利要求书以及其等价形式限制。

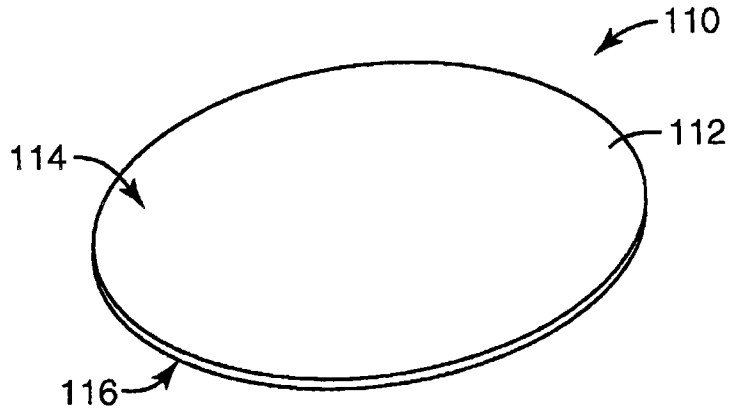


图 1

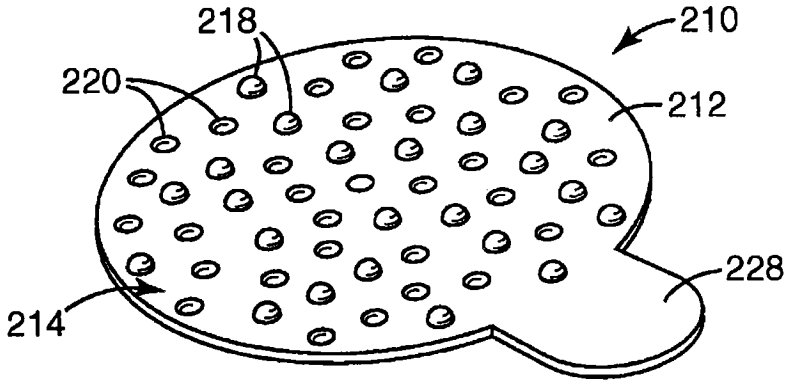


图 2A

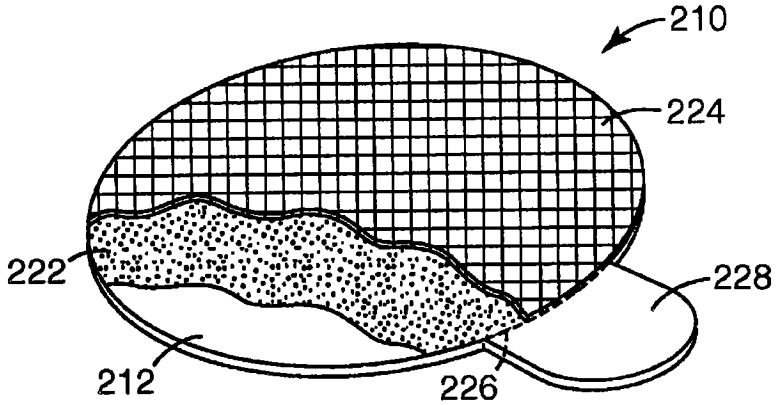


图 2B

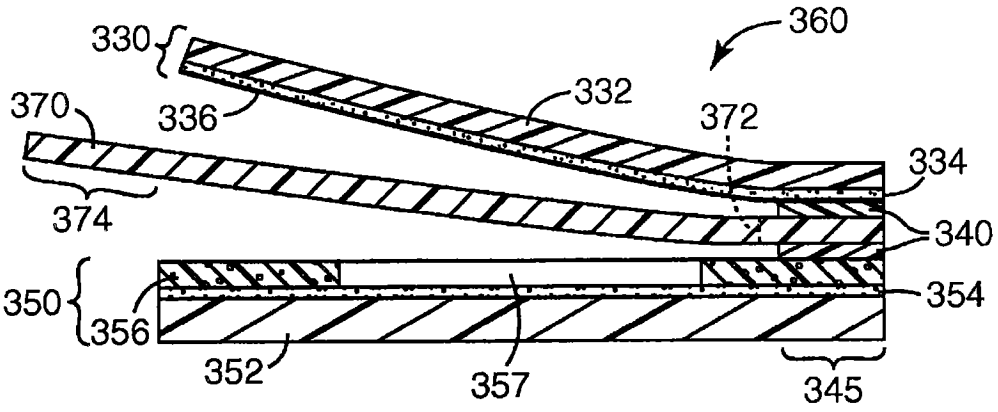

330
360
370
336
332
372
334
374
340
350
354
356
352
357
345

图 3A

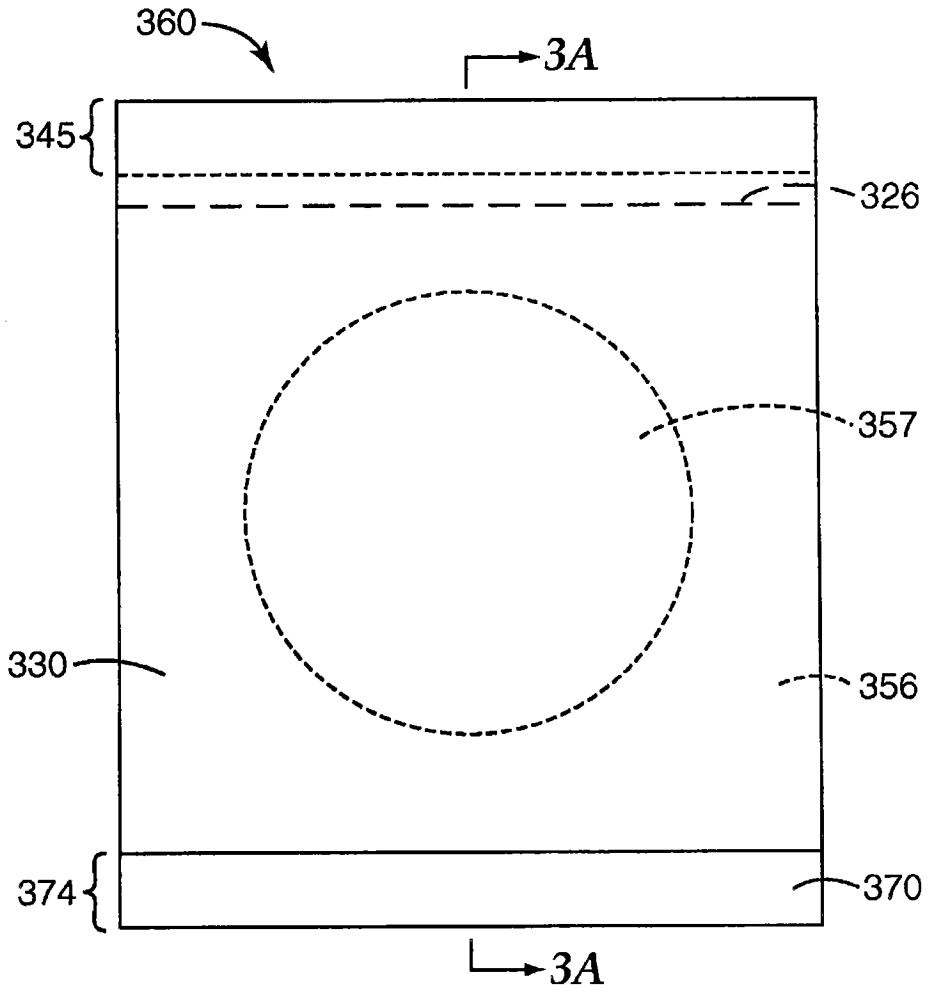

360
3A
345
326
357
330
356
374
370
3A

图 3B

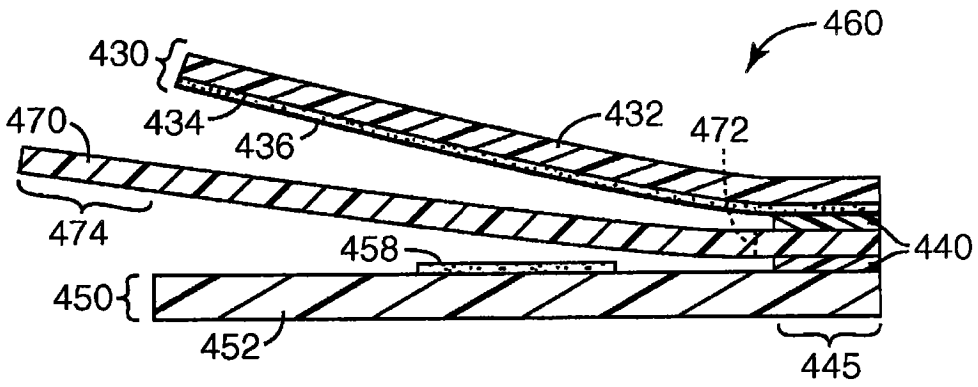

460
430
470
434
436
432
472
474
458
440
450
452
445

图 4

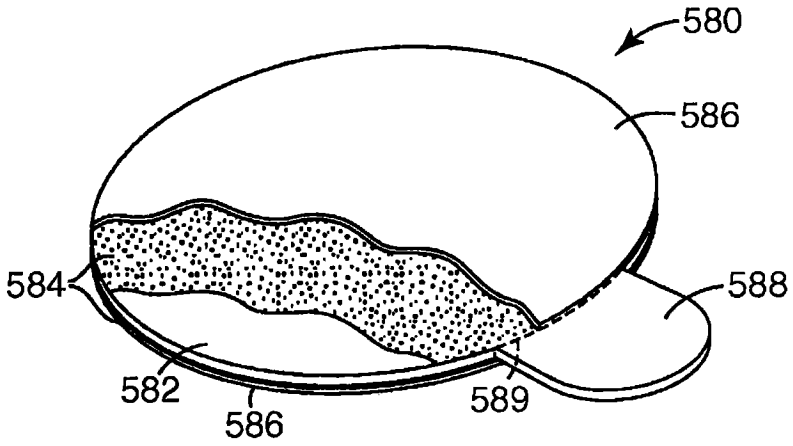

580
586
584
588
582
586
589

图 5

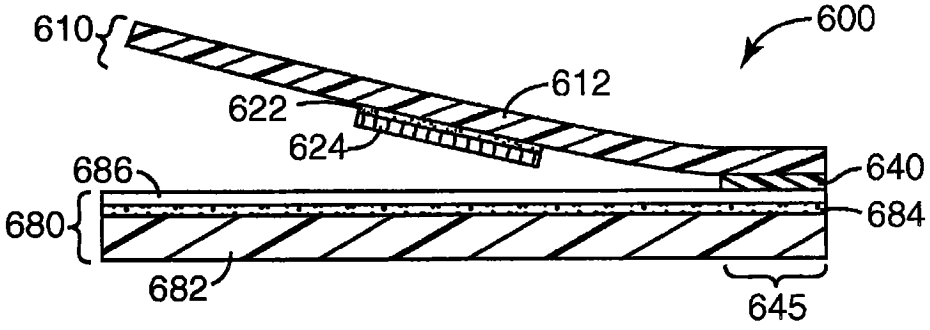

610
600
612
622
624
686
640
680
684
682
645

图 6

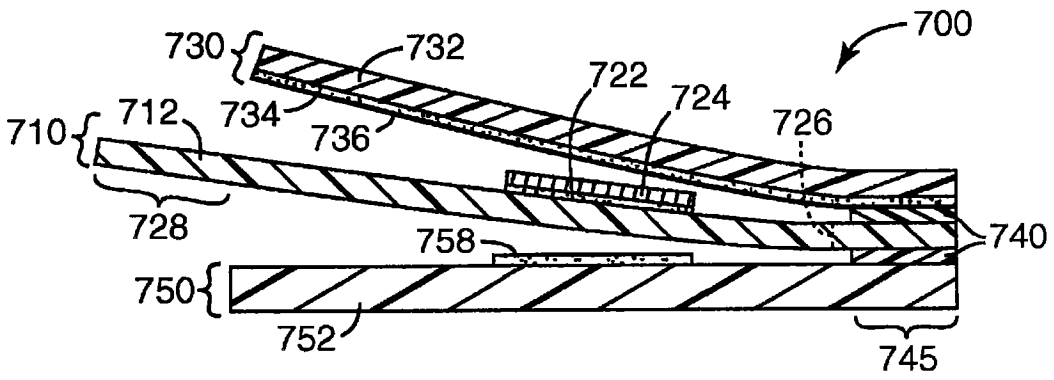

700
730
732
722
724
726
710
712
734
736
728
758
740
750
752
745

图 7

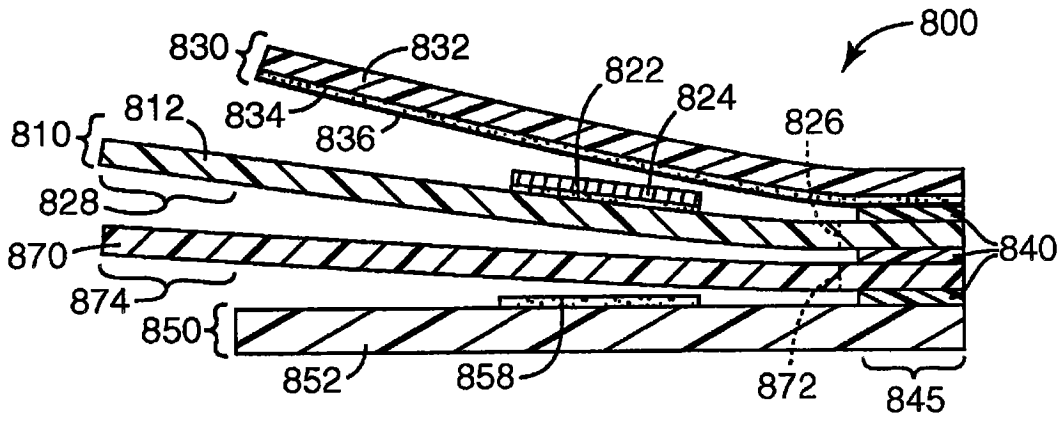

800
830
832
822
824
826
812
834
836
810
828
870
840
874
850
852
858
872
845

图 8