



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0038345
 (43) 공개일자 2013년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2006.01) *C12M 1/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-7002041
 (22) 출원일자(국제) 2011년06월27일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2013년01월25일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2011/041939
 (87) 국제공개번호 WO 2012/012104
 국제공개일자 2012년01월26일
 (30) 우선권주장
 61/360,166 2010년06월30일 미국(US)

(71) 출원인
쓰리엠 이노베이티브 프로퍼티즈 컴파니
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 피.오.박스 33427 쓰리엠 센터
 (72) 발명자
블레아 필립 에이
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터
할메슨 커트 제이
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터
주크 신시아 디
 미국 55133-3427 미네소타주 세인트 폴 포스트 오피스 박스 33427 쓰리엠 센터
 (74) 대리인
김영, 양영준

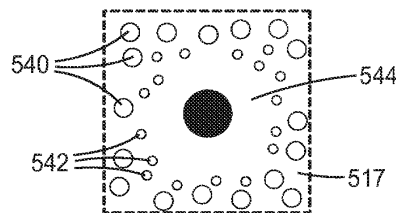
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **미생물 검출 시스템 및 방법**

(57) 요약

본 개시문헌은 샘플 내 미생물에 대한 배양 디바이스 및 방법을 제공한다. 디바이스는 베이스 부재, 커버 시트, 베이스 부재 또는 커버 시트에 커플링된 접착 층, 및 베이스 부재 상에 배치된 냉각 수용성 겔화제를 포함하며; 여기서 디바이스는 겔화제가 투명한 액체로 수화될 때 실질적으로 광학적으로 투과성이다. 사용 방법은 미생물의 검출 또는 열거를 포함한다. 방법은 배양 디바이스 내의 미생물기원의 기체 방울의 존재 또는 크기를 검출함으로써 미생물을 검출하는 것을 추가로 제공한다.

대표도 - 도5b



특허청구의 범위

청구항 1

액체 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 베이스 부재 및/또는 커버 층 상에 배치된 건조 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계;

(여기서, 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면, 최외곽 제2 주 표면, 및 성장 영역을 포함하고;

배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면으로부터 최외곽 제2 주 표면까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열됨);

디바이스의 성장 영역을 샘플로 수화시키는 단계;

일정 기간 동안 디바이스를 인큐베이션시키는 단계;

성장 영역을 광원으로 조사하는 단계; 및

성장 영역에서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계;

(여기서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표(indication of growth)를 관찰하는 단계를 포함함)를 포함하는, 샘플 내에서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 4

제1 항에 있어서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제4 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 6

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 디바이스의 성장 영역 중 적어도 일부를 겹치는 단계를 포함하며, 배양 디바이스의 제2 주 표면은 대조 층(contrast layer)을 포함하는 방법.

청구항 7

제6 항에 있어서, 하나 이상의 대조 층은 실질적으로 광을 반사시키는 방법.

청구항 8

제6 항에 있어서, 하나 이상의 대조 층은 실질적으로 선택된 파장의 광을 흡수하는 방법.

청구항 9

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 10

제1 항 내지 제9 항 중 어느 한 항에 있어서, 지시 시약을 첨가하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 지시 시약에서의 관찰가능한 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 11

샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 그 사이에 배치된 다수의 비생물기원의 기체 방울을 포함하는 하이드로겔을 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계;

(여기서, 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면 및 최외곽 제2 주 표면을 포함하며, 하이드로겔은 성장 영역을 한정함);

제1 시점에서 디바이스의 성장 영역에 샘플을 접촉하는 단계;

일정 기간 동안 디바이스를 인큐베이션시키는 단계;

성장 영역을 광원으로 조사하는 단계; 및

제2 시점에서 성장 영역 내의 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계;

(여기서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표를 관찰하는 단계를 포함하며;

성장 지표를 관찰하는 단계는 하이드로겔 내 비생물기원의 기체 방울 하나 이상의 크기 감소 또는 부재를 제2 시점에서 검출하는 단계를 포함함)를 포함하는, 샘플에서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.

청구항 12

제11 항에 있어서, 배양 디바이스를 제공하는 단계는 건조한 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 박막 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함하며, 여기서 방법은 겔화제를 수성 액체로 수화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 13

제11 항 또는 제12 항에 있어서,

제3 시점에서 기체 방울의 크기 또는 부재와 관련하여 성장 영역을 관찰하는 단계 (여기서, 제3 시점은 제2 시점 이후에 발생함); 및

두 시점에서 성장 영역의 관찰을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 14

제11 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 15

제11 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 16

제11 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

제14 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제11 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 배양 디바이스의 성장 영역 중 적어도 일부를 겹치는 단계를 포함하며, 배양 디바이스의 제2 주 표면은 대조 층을 포함하는 방법.

청구항 19

제18 항에 있어서, 하나 이상의 대조 층은 실질적으로 광을 반사시키는 방법.

청구항 20

제18 항에 있어서, 하나 이상의 대조 층은 실질적으로 선택된 파장의 광을 흡수하는 방법.

청구항 21

제18 항에 있어서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

제1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 2 개 이상의 유형의 미생물을 검출하고 구별하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 23

제1 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 있어서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는:

이미지 형성 시스템을 제공하는 단계; 및

배양 디바이스의 성장 영역의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함하고;

여기서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 성장 영역의 이미지를 디스플레이, 인쇄 또는 분석하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 24

베이스 부재;

커버 층; 및

접착 층 상에 배치된 냉각 수용성 겔화제를 포함하는, 미생물 검출용 디바이스로서,

여기서, 겔화제가 투명한 수성 액체로 수화될 때 실질적으로 광학적으로 투과성인 디바이스.

청구항 25

제24 항에 있어서, 베이스 부재 또는 커버 층 중 하나에 커플링되는 제1 접착 층을 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 26

제25 항에 있어서, 베이스 부재 또는 커버 층 중 다른 것에 커플링되는 제2 접착 층을 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 27

제25 항 또는 제26 항에 있어서, 광학 필터 층 또는 대조 층을 추가로 포함하는 디바이스.

청구항 28

제25 항 내지 제27 항 중 어느 한 항에 있어서, 디바이스를 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 배양 디바이스의 광학 탁도는 ASTM 1003에 따라 측정될 때 95% 이하인, 디바이스.

청구항 29

제25 항 내지 제28 항 중 어느 한 항에 있어서, 디바이스를 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 배양 디바이스의

광학 투명도는 ASTM 1003에 따라 측정될 때 10% 이상인, 디바이스.

명세서

배경 기술

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는, 2010년 6월 30일자로 출원된 미국 가특허 출원 제 61/360,166 호의 이익을 주장한다.
- [0003] 샘플 내 박테리아를 검출하는 전형적인 배양 방법은 전형적으로, 샘플 내 미생물의 존재 및 임의로 동정을 검출하기 위해 디바이스 (예를 들어, 격납 용기, 영양분 배지, 및 겔화제)의 성분과 박테리아 콜로니 사이의 대조 (contrast)에 의존한다.
- [0004] 샘플 내 박테리아의 검출을 위한 간단한 물품 및 방법에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

- [0005] 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하려는 현재의 일반적인 방법의 면에서, 본 발명의 배양 디바이스는 샘플 내 미생물의 신속하고 지시약-없는(indicatorless) 검출 방법을 제공한다. 유리하게는, 본 발명의 디바이스 및 방법은 지시 시약 없이 사용될 수 있으며, 이들 지시 시약 중 일부는 미생물의 성장에 대해 억제 효과를 갖는 것으로 알려져 있다. 추가로, 또는 대안적으로, 디바이스 및 방법의 일부 실시 양태는 박테리아의 열거 (enumeration)를 제공한다. 일부 실시 양태에서, 본 발명의 방법은 박테리아의 자동 검출 및/또는 열거를 제공한다.
- [0006] 그래서, 한 측면에서, 본 개시문헌은 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 방법은 액체 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 베이스 부재 및/또는 커버 시트 상에 배치된 건조한 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 배양 디바이스를 제공한다. 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면, 최외곽 제2 주 표면, 및 성장 영역을 포함할 수 있다. 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면으로부터 최외곽 제2 주 표면까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열될 수 있다. 방법은 디바이스의 성장 영역을 샘플로 수화시키고, 디바이스를 일정 기간 동안 인큐베이션시키고, 성장 영역을 광원으로 조사하고, 성장 영역 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표 (indication of growth)를 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 방법의 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 베이스 부재 및/또는 커버 시트에 커플링된 접착 층을 포함할 수 있으며, 여기서 겔화 층은 접착 층(들) 상에 배치된다.
- [0007] 방법의 일부 실시 양태에서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함할 수 있다. 방법의 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0008] 방법의 일부 실시 양태에서, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0009] 일부 실시 양태에서, 방법은 제1 대조 층(contrast layer)을 제공하고; 그리고 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 주변에 제1 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 방법은 제2 대조 층을 제공하고, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 근처에 제2 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0010] 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 빛의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 방법은 지시 시약을 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 지시 시약에서의 관찰가능한 변화를 검출하는 단계를 포함한다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 형광 신호를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0011] 또다른 측면에서, 본 개시문헌은 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 이들 사이에 배치된 다수의 비생물기원 기체 방울(abiogenic gas bubble)을 포함하는 하이드로겔을 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함하며;

여기서, 하이드로겔은 성장 영역을 한정하는, 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면, 최외곽 제2 주 표면을 포함할 수 있다. 방법은 제1 시점에서 디바이스의 성장 영역에 샘플을 접종하고, 디바이스를 일정 기간 동안 인큐베이션시키고, 성장 영역을 광원으로 조사하고, 성장 영역 내 미생물의 존재 또는 부재를 제2 시점에서 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표를 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 성장 지표를 관찰하는 단계는 하이드로겔 내 미생물기원의 기체 방울 하나 이상의 크기 감소 또는 부재를 제2 시점에서 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0012] 방법의 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스를 제공하는 단계는 건조한 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 박막 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 방법은 겔화제를 수성 액체로 수화시키는 단계를 추가로 포함한다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 수성 액체는 샘플을 포함할 수 있다.
- [0013] 일부 실시 양태에서, 방법은 제3 시점에서 기체 방울의 감소된 크기 또는 부재에 관해 성장 영역을 관찰하고 2 개의 시점에서 관찰한 것을 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 방법은 제1 대조 층을 제공하고, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 근처에 제1 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0014] 일부 실시 양태에서, 방법은 제2 대조 층을 제공하고, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 근처에 제2 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 빛의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 방법은 지시 시약을 추가하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 지시 시약에서의 관찰가능한 변화를 검출하는 단계를 포함한다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물을 열거하는 단계를 포함할 수 있다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 방법은 제1 광학 필터를 제공하고, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 광원과 배양 디바이스 사이에 제1 광학 필터를 위치시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 2 개 이상의 유형의 미생물을 검출하고 구별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 방법은 이미지 형성 시스템을 제공하고 배양 디바이스의 성장 영역의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 성장 지표를 관찰하는 단계는 성장 영역의 이미지를 디스플레이하거나 인쇄하거나 분석하는 단계를 포함한다.
- [0016] 또다른 측면에서, 본 개시문헌은 베이스 부재, 커버 층, 및 제1 접착 층 상에 배치된 냉각 수용성 겔화제를 포함하는, 미생물 검출용 디바이스를 제공한다. 디바이스는, 겔화제가 투명한 수성 액체로 수화될 때 실질적으로 광학적으로 투과성이다. 일부 실시 양태에서, 디바이스는 베이스 부재 또는 커버 층의 한 쪽에 커플링된 제1 접착 층을 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 디바이스는 베이스 부재 또는 커버 층의 다른 쪽에 커플링된 제2 접착 층을 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 디바이스는 제1 또는 제2 접착 층 상에 배치된 영양분 배지를 추가로 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 디바이스는 광학 필터 층 또는 대조 층을 추가로 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 배양 디바이스의 광학 탁도(optical haze)는 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 ASTM 1003에 따라 측정될 때 95% 이하이다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 배양 디바이스의 광학 투명도는 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 ASTM 1003에 따라 측정될 때 10% 이상이다.
- [0019] 단어 "바람직한" 및 "바람직하게는"은 소정의 환경 하에서 소정의 이득을 제공할 수 있는 본 발명의 실시 양태를 말한다. 그러나, 동일한 또는 다른 상황 하에서 다른 실시 양태가 또한 바람직할 수 있다. 더욱이, 하나 이상의 바람직한 실시예의 언급은 다른 실시 양태가 유용하지 않다는 것을 의미하지 않으며, 본 발명의 범주로부터 다른 실시 양태를 배제하고자 하는 것은 아니다.
- [0020] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 단수형 용어("a," "an," "the"), "적어도 하나" 및 "하나 이상"은 서로 바뀌어서 사용될 수 있다. 그래서, 예를 들어 "하나의" 미생물을 함유할 것으로 의심되는 샘플은 샘플이 "하나 이상의" 미생물을 포함할 수 있음을 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0021] "및/또는"이라는 용어는 열거된 요소 중 하나 또는 전부, 또는 열거된 요소의 임의의 둘 이상의 조합을 의미한

다.

[0022] 또한, 본 명세서에서 종점(endpoint)에 의한 수치 범위의 언급은 그 범위 이내에 포함된 모든 수를 포함한다 (예를 들어, 1 내지 5는 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5 등을 포함함).

[0023] 본 발명의 상기의 개요는 본 발명의 각각의 개시된 실시 양태 또는 모든 구현 형태를 설명하고자 하는 것은 아니다. 이하의 기술은 더 구체적으로 예시적인 실시 양태를 예증한다. 본 출원 전체에 걸쳐 여러 곳에서, 예들의 목록을 통하여 지침이 제공되며, 상기 예들은 다양한 조합으로 사용될 수 있다. 각각의 경우에, 열거된 목록은 단지 대표적인 균으로서의 역할을 하며, 배타적인 목록으로 해석되어서는 안된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 아래에 열거된 도면을 참조하여 본 발명이 추가로 설명될 것이며, 유사한 구성은 여러 도면에 걸쳐 유사한 도면 부호로 참조된다.

<도 1>

도 1은 본 개시문헌에 따라 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된 배양 디바이스의 한 실시 양태의 부분적으로 섹션된 최상부 사시도이다.

<도 2>

도 2는 본 개시문헌에 따라 대조 층이 있는 배양 디바이스의 한 실시 양태의 부분적으로 섹션된 상면도이다.

<도 3>

도 3은 본 개시문헌에 따라 제1 시점에서 다수의 비생물기원의 기체 방울이 분포된 하이드로겔을 포함하는 배양 디바이스의 한 실시 양태의 상면도이다.

<도 4a>

도 4a는 제2 시점에서 도 3의 배양 디바이스의 상면도이다.

<도 4b>

도 4b는 도 4a의 배양 디바이스의 일부의 확장도이다.

<도 5a>

도 5a는 제3 시점에서 도 3의 배양 디바이스의 상면도이다.

<도 5b>

도 5b는 도 5a의 배양 디바이스의 일부의 확장도이다.

<도 6>

도 6은 본 개시문헌에 따라 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된 배양 디바이스 내 미생물 콜로니의 검출의 한 실시 양태의 측면도이다.

<도 7>

도 7은 본 개시문헌에 따라 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된 배양 디바이스 내 미생물 콜로니의 검출의 또다른 실시 양태의 측면도이다.

<도 8>

도 8은 본 개시문헌에 따른 검출 시스템의 한 실시 양태의 블록 다이어그램이다.

<도 9>

도 9는 겔화제를 포함하는 박막 배양 디바이스의 광학 투명도 측정의 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 임의의 실시 양태를 상세히 설명하기 전에, 본 발명은 그의 응용에 있어서 하기의 설명에 개시된 또

는 첨부된 도면에 예시된 구성요소들의 구성 및 배열의 상세 사항에 제한되지 않음을 이해해야 한다. 본 발명은 다른 실시형태가 가능할 수 있으며, 다양한 방법으로 실시되거나 수행될 수 있다. 또한, 본 명세서에 사용되는 어법 및 용어법은 설명을 목적으로 하는 것으로서, 제한적인 것으로 간주되어서는 안 됨을 이해해야 한다. 본 명세서에서 "포함하는", "함유하는", "함유하고 있는", 또는 "갖는" 및 그 변형의 사용은 이후에 열거된 항목 및 그의 등가물과, 추가의 항목을 포함하고자 한다. 달리 명시되거나 제한되지 않으면, "지지된" 및 "커플링된"이라는 용어 및 그 변형이 널리 사용되며, 직접과 간접 둘 모두의 지지 및 커플링을 포괄한다. 다른 실시양태가 이용될 수 있으며, 구조적 또는 논리적 변화가 본 발명의 범주로부터 벗어남이 없이 이루어질 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, "정면", "배면", "상부", "하부" 등과 같은 용어는 단지 요소들이 서로 관련될 때 요소들을 설명하기 위해 사용되지만, 결코 장치의 특정 배향을 말하거나, 필요한 또는 요구되는 장치의 배향을 암시 또는 나타내거나, 본 명세서에서 설명된 본 발명이 사용 중에 어떻게 사용, 장착, 디스플레이 또는 위치될 것인지를 명시함을 의미하지 않는다.

[0026] 일반적으로 본 개시문헌은 샘플 중 미생물의 검출을 위한 방법 및 물품에 관한 것이다. 일부 실시 양태에서, 물품 및 방법은 실질적으로 광학 투과성인 배양 디바이스를 적용한다. 낮은 탁도-높은 투명도 디바이스는 미생물의 콜로니를 배양 디바이스의 물질과 구별하는 데 필요한 높은 대조를 제공하고, 서로 매우 근접하게 위치한 2 개의 미생물 콜로니를 구별하기 위해 높은 공간 해상도를 제공한다. 일부 실시 양태에서, 방법은 배양 디바이스 내 미생물의 존재의 초기 지표 (예를 들어, 가시적 콜로니의 출현 전에)로서 배양 디바이스 내 하나 이상의 비생물기원의 기체 방울의 크기 감소 또는 소실을 관찰한 것을 적용한다.

[0027] 물품 및 방법은 샘플 내 미생물을 검출하는 데 사용된다. 적합한 샘플은 다양한 공급원으로부터 수득되거나 그로부터 유래될 수 있다. 용어 "공급원"은 일반적으로 미생물에 대하여 시험하기를 원하는 식품 또는 비식품을 말하기 위하여 사용된다. 공급원은 고형물, 액체, 반고형물, 젤라틴성 물질, 가스(예를 들어, 공기) 및 그의 조합일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 공급원은 예를 들어 관심있는 표면으로부터 또는 공기로부터 공급원을 수합하기 위하여 사용된 포착 요소에 의해 제공될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 액체 조성물은 포착 요소를 포함할 수 있으며, 포착 요소는 관심있는 임의의 미생물 및 공급원의 회수를 증진시키기 위하여 (예를 들어, 교반 또는 용해 과정 동안) 추가로 파쇄될 수 있다. 관심있는 표면은 (문을 포함하는) 벽, 바닥, 천장, 배수구, 냉동 시스템, 덕트(예를 들어, 통풍관), 통기구, 변좌, 핸들, 문 손잡이, 핸드레일(handrail), 조리대, 테이블 표면(table top), 식기 표면(eating surface)(예를 들어, 트레이, 접시 등), 작업 표면, 장비 표면, 의류 등, 및 그의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 표면의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 공급원 전부 또는 일부분이 방법에서 사용될 수 있다. 공급원의 일부분이 사용될 때, 때로 이것은 공급원의 "샘플"로 지칭될 수 있다. 그러나, 용어 "샘플"은 일반적으로 본 명세서에서 공급원으로부터 수득되며 미생물의 검출을 위한 시험 디바이스 내로 도입되는 물질의 부피 또는 질량의 부분을 말하기 위하여 사용된다.

[0028] 일반적으로 용어 "식품"은 고형물, 액체 (예를 들어, 용액, 분산물, 유화물, 현탁물 등 및 그의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않음) 및/또는 반고형 식용 조성물을 말하기 위하여 사용된다. 식품의 예에는 육류, 가공육, 난류, 생선, 해산물, 야채류, 과일류, 조리 식품 (예를 들어, 수프, 소스, 페이스트), 곡물 제품 (예를 들어, 곡분, 시리얼, 빵), 통조림, 밀크, 기타 유제품 (예를 들어, 치즈, 요구르트, 사워 크림(sour cream)), 지방, 오일, 디저트, 양념류, 향신료, 파스타, 음료, 물, 동물 사료, 기타 적합한 식용 물질 및 그의 조합이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다.

[0029] "샘플 수득 디바이스"는 본 명세서에서 가장 넓은 의미로 사용되며, 액체, 반고형물, 또는 고형 샘플 물질을 수합하기 위하여 사용되는 도구를 말한다. 샘플 수득 디바이스의 비제한적인 예에는 면봉, 와이프(wipe), 스펀지, 스쿠프(scoop), 스페툴라, 압설자, 필터, 파이렛, 파이렛 톱 및 사이펀 호스가 포함된다.

[0030] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "실질적으로 광학적으로 투과성인"은, ASTM 방법 1003에 의해 측정되는 바와 같이 광학 탁도가 약 95% 이하이고, ASTM 방법 1003에 의해 측정되는 바와 같이 광학 투명도가 약 10% 이상인, 광학 통로를 말한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "비생물기원의 기체 방울"은 생물학적 활성 이외의 수단으로 인해 생성되는 광학적으로 검출가능한 기체 방울을 말한다. "광학적으로 검출가능한"은 가장 넓은 의미로 사용되고, 인간에 의해 시각적으로 검출되는 것뿐만 아니라 기계 시야에 의해 검출되는 것을 포함한다.

[0032] 배양 디바이스:

[0033] 소정의 실시 양태에서 본 개시문헌은 박테리아 검출용 배양 디바이스를 포함한다. 본 발명의 배양 디바이스는

예를 들어 박막 배양 플레이트 디바이스를 포함한다. 박막 배양 플레이트 디바이스는 전형적으로 전통적인 한천 페트리 디쉬(petri dish)보다 더 콤팩트하며, 전형적으로 건조, 재수화성 배양 배지를 함유하여 소정의 미생물의 성장을 지지한다. 박막 배양 플레이트 디바이스의 비제한적인 예는 미국 특허 제4,565,783 호; 제 5,089,413 호, 및 제5,681,712 호에서 개시된 코팅된-기관 디바이스를 포함하며; 이의 각각은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 삽입되어 있다.

[0034] 도 1은 본 개시문헌에 따른 배양 디바이스(110)의 실시 양태를 예시한다. 배양 디바이스(110)는 베이스(112) 및 커버 시트(122)를 포함한다. 배양 디바이스(110)는 최외곽 제1 주 표면(104) 및 최외곽 제2 주 표면(106)을 포함한다. 배양 디바이스(110)는 액체 샘플이 접종될 때, 제1 주 표면으로부터 제2 주 표면까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된다.

[0035] 임의로, 베이스(112) 및 커버 시트(122)는 (예를 들어, 스테이플, 접착제, 접착제 테이프, 양면 접착제 테이프 등과 같이 당업계에 알려진 (도시되지 않음) 임의의 적합한 커플링 수단을 사용해 힌지 영역(108)에서) 함께 커플링될 수 있다. 베이스(112) 및/또는 커버 시트(122) 중 어느 하나의 적어도 일부는 코팅을 포함한다. 도 1에서 도시된 바와 같이, 베이스(112)는 임의의 접착 층(114) 및 겔화 층(116)을 포함하는 코팅을 포함한다. 임의로, 배양 디바이스는 스페이서(118)를 추가로 포함할 수 있다. 스페이서(118)는 구경(120)을 포함하고, 이는 성장 영역(126)의 경계를 한정한다.

[0036] 예시된 실시 양태에서, 성장 영역(126)은 원형이다. 구경(120)의 벽은 그 안에 침착된 액체 샘플 (도시되지 않음)을 한정하기 위해 소정의 크기 및 모양 (예를 들어, 원형, 타원형, 사각형, 직사각형 등)의 웰(well)을 제공한다. 구경(120)은 일반적으로 배양 디바이스(110)의 성장 영역(126)의 경계의 윤곽을 그린다. 스페이서(118)는 원하는 부피, 예를 들어 1, 2 또는 3 밀리리터의 웰을 형성하기에 충분한 두께를 가져야 한다. 폐쇄 셀 폴리에틸렌 또는 폴리스티렌 폼이 스페이서(118)에 바람직한 물질이지만, 소수성(비-습윤성)이며 미생물에 대하여 불활성이고 살균을 견딜 수 있는 임의의 물질이 사용될 수 있다. 일부 실시 양태에서 (도시되지 않음), 스페이서(118)는 다수의 구경(20) (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 또는 20개의 구경)을 포함할 수 있으며, 이들 각각에는 별개의 액체 샘플이 접종될 수 있다.

[0037] 스페이서(118)의 두께는 배양 디바이스에 접종할 때 배양 디바이스에 첨가되는 액체의 부피를 봉입하기에 충분하여야 한다. 사용될 때 막의 두께에 따라 스페이서(118)는 두께가 약 0.5 mm 이상, 두께가 약 1 mm, 두께가 약 1.5 mm, 그리고 두께가 약 2 mm일 수 있다.

[0038] 베이스(112) 및 커버 층(122)은 광학적으로 투과성인 물질을 사용해 제작된다. 바람직하게는, 베이스(112) 및 커버 층(122)은 투명하다. 베이스(112) 및 커버 층(122)용으로 적합한 물질에는 예를 들어, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리카르보네이트 또는 예를 들어 폴리에스테르 필름이 포함된다. 베이스(112) 및 커버 층(122)의 주 표면은 실질적으로 편평하고 부드러운 표면이어야 하며, 예를 들어 광을 산란시켜서 광학 투명도를 감소시키는 표면 특색 (예를 들어, 구덩이(pit), 요철, 등성이(ridge), 솟을 부위(embossed pattern))를 포함하지 않아야 할 것이다.

[0039] 임의의 접착 층(114)은 당업계에 알려진 다양한 접착제 (예를 들어, 감압성 접착제)를 포함할 수 있다. 적합한 접착제의 예에는 공중합체 실리콘 접착제 (예를 들어, 미국 특허 제6,703,120 호에서 기술된 실리콘 접착제 (예를 들어, 그 전체 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입됨)) 및 아크릴레이트 접착제 (예를 들어, 미국 특허 제 4,565,783 호에서 기술된 아크릴레이트 접착제 (예를 들어, 그 전체 내용은 본 명세서에 참조로서 삽입됨))가 포함된다. 접착 층(114)은 당업계에 알려진 과정 (예를 들어, 나이프-코팅, 압출, 이형 라이너로부터의 라미네이션 트랜스퍼(laminative transfer) 등)를 이용해 베이스 부재(112) 및/또는 커버 시트(122)에 적용될 수 있다. 접착 층(114)을 베이스 부재(112) 및/또는 커버 시트(122)에 적용할 때, 광-산란 특색이 배양 디바이스(110)의 광학 투명도를 감소시킬 수 있기 때문에 이러한 특색이 (예를 들어, 방울) 내로 또는 (예를 들어, 큰 구멍(crater), 구덩이, 요철, 등성이, 골, 채널 등) 상으로 도입되는 것을 최소화하기 위해 주의를 기울여야 한다.

[0040] 그래서, 베이스 부재(112), 커버 시트(122), 및 접착 층(114)은 높은 광학 투명도를 가진 물질로부터 선택되고, 배양 디바이스(110)에서 높은 수준의 광학 투명도를 제공하는 방식으로 처리된다. 광학 투명도는 당업계에 알려진 방법에 의해 측정될 수 있다. 광학 투과율은 광학 투명도와 관련이 있고, 예를 들어 ASTM 방법 1003을 이용해 측정될 수 있다. 투명도%는 광학 투명도와 관련이 있고, 예를 들어 ASTM 방법 1003을 이용해 측정될 수 있다. 탁도%는 광학 투명도와 관련이 있고, 예를 들어 ASTM 방법 1003을 이용해 측정될 수 있다.

- [0041] 겔화 층(116)에서 사용되는 겔화제는 냉각 수용성 겔화제를 포함한다. 적합한 냉각 수용성 겔화제에는 예를 들어, 구아 고무, 잔탄 고무, 쥐엄나무 고무, 하이드록시에틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 폴리아크릴아마이드, 알긴, 및 전술한 것들 중 임의의 2 개 이상의 조합이 포함된다. 액체 샘플이 베이스 부재(112)와 커버 시트(122) 사이에 침착된 후, 액체는 겔화제가 팽윤되게 해서 액체 샘플을 함유하는 하이드로겔을 형성한다.
- [0042] 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 겔화 층(116)은 미생물의 성장을 촉진시키는 영양분을 추가로 포함할 수 있다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 겔화 층(116)은 특정 미생물 또는 미생물 군의 성장을 선별하기 위한 선별제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 겔화제, 임의의 영양분 및 임의의 선별제는 예를 들어, 미국 특허 제4,565,783 호에서 기술된 바와 같이 접착 층(114) 상으로 분말-코팅될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또다른 실시 양태에서, 분말(116)은 용액 중에 용해 또는 현탁되고 기질(112) 상에 코팅 및 건조된 겔화제와 영양분, 선별제 및/또는 지시 시약의 혼합물을 포함하는 코팅을 포함할 수 있다. 이 실시 양태에서, 코팅에는 사실상 수분이 없다 (즉, 코팅은 일단 이것이 주위 환경과 평형을 이루도록 용인되었으면 탈수된 코팅의 대략적인 수분 함량 이하의 수분 함량을 가짐).
- [0044] 배양 디바이스에서 사용되는 특정 영양분 및/또는 선별제는 본 발명의 명세서를 고려하면 당업자에게 명백할 것이며, 성장시키고/시키거나 선택적으로 검출 또는 억제될 특정 박테리아에 대하여 최적화될 수 있다. 예를 들어, 소정의 선별제(예를 들어, 반코마이신과 같은 항생제)를 조성물에 첨가하여 상응하는 항생제 내성 미생물에 대하여 선택할 수 있다. 부가적으로, 선별제의 농도를 조정하여 소정 내성 수준에 대하여 선택할 수 있으며, 이는 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0045] 본 개시문헌의 배양 디바이스는 임의로 지시 시약을 포함할 수 있다. 지시 시약은 상기 기술된 바와 같이 겔화 층 내로 혼입되고/되거나 예를 들어 미국 특허 제4,565,783 호에서 기술된 바와 같이 접착 층 내로 혼입될 수 있다.
- [0046] 지시 시약의 예시적인 유용한 부류는 성장 중인 미생물에 의해 대사되거나 또는 그렇지 않다면 이와 반응하고 그렇게 해서 기술자에 의한 또는 자동 관독기에 의한 정량화 및/또는 검출의 용이함을 위하여 미생물 콜로니가 착색되게 하거나 또는 형광 발광 되게 하는 염료를 포함한다. 그러한 염료의 비제한적 예에는 트라이페닐테트라졸륨 클로라이드, p-톨릴테트라졸륨 레드, 테트라졸륨 바이올렛, 베라트릴 테트라졸륨 블루, 및 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴 포스페이트 다이소듐 염이 포함된다. 그러나, 다른 적합한 염료가 동정할 특정 유기체(들)에 따라 사용될 수 있음이 인식될 것이다.
- [0047] 완충 시약, 예를 들어 탄산나트륨을 이용하여 중성 pH를 나타내는 매질을 제공할 수 있으며 "캡-오-실(Cab-O-Sil) M-5"를 분말-코팅되는 혼합물용의 프로세싱 조제(processing aid)로서 이용할 수 있고, 이는 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제4,565,783 호에 기술된 바와 같다. 물론, 분말(116)에 사용되는 특정 코팅 혼합물(예를 들어, 영양분, 지시 시약 및/또는 겔화제)은 성장시킬 미생물의 유형에 따라 조정될 수 있다.
- [0048] 본 개시문헌의 물품은 구별 지시 시약을 포함할 수 있는 것으로 생각된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "구별 지시 시약"은 소정 미생물의 존재는 지시하지만 다른 미생물의 존재는 지시하지 않는, 매질에 첨가되는 시약을 말한다. 구별 지시 시약의 비제한적 예에는 소정 미생물에 의해 대사될 때 검출가능한 반응 (예를 들어, 콜로니 내의 색 또는 그와 인접한 색을 변화시키는 pH 지시제)을 생성하는 염료 (예를 들어, 착색제, pH 지시제, 산화환원 지시제), 효소 기질 (예를 들어, 포스포타아제, 글리코시다아제, 펩티다아제, 뉴클레아제, 리파아제 등의 발색원성 또는 형광원성 기질), 및 특정 영양분 (예를 들어, 발효가능한 탄수화물, 아미노산)이 포함된다.
- [0049] 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 구별 지시 시약은 기질 상에 코팅되는 수-기반의 조성물 내에서 박막 배양 디바이스에 첨가될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 구별 지시 시약은 배양 디바이스에 첨가되는 액체 샘플에 첨가될 수 있다.
- [0050] 배양 디바이스가 접촉 동안에 샘플을 한정하는 스페이서(118)를 포함하지 않는 실시 양태에서 (도시되지 않음), 주형, 예를 들어, 칭량된 고리(weighted ring)(도시되지 않음)는 밀폐 후에 커버 시트의 외부면에 일시적으로 적용되어서 냉각 수용성 분말이 겔을 형성하는 동안에 특정 구역에 샘플을 한정시킬 수 있다. 샘플이 접촉된 배양 디바이스의 부분은 일반적으로 디바이스의 성장 영역(126)의 윤곽을 그린다.
- [0051] 한 실시 양태에서, 박막 배양 플레이트 디바이스는 예를 들어 미국 특허 제4,565,783 호에 기술된 방법에 따라

액체 코팅 혼합물을 생성하고, 액체 코팅 혼합물을 기질 상에 코팅하고, 코팅된 기질을 건조시키고, 선택적으로, 커버 시트를 부착시킴으로써 제조될 수 있다.

[0052] 사용에 있어서, 소정량의 접종물, 전형적으로 약 1 ml의 액체 접종물은 커버 시트(122)를 뒤로 잡아당기고 접종물을 겔화 층(116) 상으로 침착시킴으로써 디바이스에 첨가된다. 접종물은 선택적으로 영양분, 선별제, 지시시약 또는 전술한 것 중 임의의 둘 이상의 조합을 포함할 수 있다. 다음, 커버 시트(122)가 베이스 부재(112) 위에 다시 놓이고, 접종물이 존재한다면 스페이서(118)의 개구 내에 고르게 퍼진다. 이렇게 하기에 편리한 틀(tool)은, 배양 디바이스(110)의 성장 영역(126)에 부합하도록 치수가 재어지고 모양이 생긴 일반적으로 편평하고 청량된 물품이다. 이어서 접종된 디바이스(110)는 소정 시간 동안 인큐베이션되며, 그 후 기질 상에서 성장하는 박테리아 콜로니의 수가 커버 시트(122)를 통하여 관찰 및 계수될 수 있다.

[0053] 바람직한 코팅 혼합물은, 소정 부피의 샘플로 수화될 때 표 1에 예시된 농도의 배양 배지 성분들을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스를 위한 코팅 혼합물은 표 1에 제시된 성분들 중 일부를 포함할 수 있으며, 샘플을 함유하는 액체(예를 들어, 희석제)는 표 1에 제시된 나머지 성분들 중 일부 또는 그 전부를 포함할 수 있다. 따라서, 배양 디바이스 내의 성분들 및 희석제 내의 성분들의 첨가에 의해 표 1에 제시된 배양 배지를 생성할 수 있다.

[0054] [표 1]

예시적인 배양 배지의 조성

성분	양(mg/mL)
트립톤	3.3
프로테오스 펩톤(Proteose Peptone) 3 번	10
박토 펩타민(Bacto Peptamin)	10
효모 추출물	7.3
텍스트로스	20.6
피루브산나트륨	6.6
육류 추출물	15
K ₂ HPO ₄	3.3
KH ₂ PO ₄	0.4
구아 고부	25 - 50

[0055] 선택적으로, 배양 배지는 완충제를 포함할 수 있다. 적합한 완충제는 인산염 완충제를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 탄산염 완충제는 탄산나트륨 완충제이다. 일부 실시 양태에서, 인산염 완충제는 인산칼륨 완충제이다. 일부 실시 양태에서, 배양 배지는 하나 초과인 완충제(예를 들어, 인산칼륨 및 아세트산나트륨)를 포함할 수 있다. 인산염 완충제는 약 22 mM일 수 있다.

[0057] 배양 배지 중 각각의 성분의 농도는 배양 디바이스에 접종한 후 표적 미생물의 성장 및/또는 검출에 적합한 농도를 제공하도록 선택된다. 배양 배지 중 특정 미생물의 성장을 위한 선별제 및 영양분의 적합한 농도는 당업계에 공지되어 있다.

[0058] 표적 미생물의 선별은 비-표적 미생물 이외의 것의 성장의 억제, 비-표적 미생물의 성장의 촉진, 또는 이들 둘 모두를 포함할 수 있다. 표적 미생물의 성장의 촉진은 하나 이상의 제1 선별제에 의해 직접적으로 (예를 들어, 표적 미생물에 의해서는 사용될 수 있지만 다른 미생물에 의해서는 사용될 수 없는 영양분), 간접적으로 (예를 들어, 비-표적 미생물의 억제에 의해 영양분에 대한 경쟁을 감소시킴으로써), 또는 직간접적으로 제공될 수 있다. 표적 미생물의 성장에 대하여 선별하는 임의의 원소, 라디칼, 이온 또는 화합물이 선별제로 사용하기에 적합할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 건조 배양 배지는 하기 방식으로 박막 배양 디바이스의 하나 이상의 표면에 적용될 수 있다. 배양 배지의 성분들은 용매(예를 들어 물)에 용해될 수 있다. 이어서 생성된 용액은 디바이스의 하나 이상의 표면 상으로 코팅될 수 있다. 이어서 코팅을 건조시켜, 배양 배지 용액으로 코팅된 디바이스의 표면 상에 건조 배양 배지를 남긴다. 코팅은 공기 건조 및 가열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 방식으로 건조될 수 있다.

[0060] 건조 배양 배지의 각각의 성분의 양은 2 가지 이상의 인자: (1) 배양 배지 용액 내 그 성분의 농도, 및 (2) 배

양 디바이스의 주어진 표면적 상으로 코팅되는 용액의 양 (코팅 중량)에 의해 적어도 부분적으로 결정된다. 적합한 코팅 중량은 약 0.45 mg/cm² 내지 약 2.5 mg/cm²의 범위일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 배지 영양분는 지시 시약과는 별도로 코팅될 수 있다. 이러한 실시 양태에서, 배양 배지 영양분에 있어서의 코팅 중량은 약 1.6 mg/cm² 내지 약 2.5 mg/cm²의 범위일 수 있다. 한 실시 양태에서, 영양분 코팅의 코팅 중량은 약 2.1 mg/cm²이다. 지시제 코팅의 코팅 중량은 약 0.45 mg/cm² 내지 약 0.84 mg/cm²의 범위일 수 있다. 한 실시 양태에서, 지시제 코팅의 코팅 중량은 약 0.62 mg/cm²이다.

[0061] 다시 도면을 살펴보자면, 도 2는 본 개시문헌에 따른 배양 디바이스(210)의 또다른 실시 양태를 보여준다. 디바이스(210)는 도 1의 배양 디바이스(110)에 대해 기술된 바와 같이, 베이스 부재(212), 커버 시트(222), 접촉 층(214), 임의의 스페이서(218), 및 겔화 층(216)을 포함한다. 또한, 배양 디바이스(210)는 배양 디바이스(210)의 제2 주 표면에 근접해서 위치해 있는 대조 층(230)을 추가로 포함한다.

[0062] 대조 층(230)은 선택된 파장의 빛을 반사, 흡수, 또는 확산 (예를 들어, 산란)시키기 위해 임의의 적합한 물질로부터 제작될 수 있다. 적합한 물질에는 예를 들어, 셀룰로오스 물질, 금속, 유리, 유기 중합체 또는 무기 중합체를 포함한다. 물질은 선택된 파장의 빛을 흡수, 반사 또는 확산시키는 화합물 (예를 들어, 안료, 염료, 입자)과 함께 블렌딩될 수 있다. 대조 층(230)은 배양 디바이스(210)와 마주하고 있는 균일한 표면을 포함할 수 있다.

[0063] 일부 실시 양태에서, 대조 층(230)은 예를 들어 금속, 금속 호일, 금속화된 중합체성 막, 또는 거울과 같은 반사 층을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 대조 층(230)은 정반사 층, 예컨대 정반사 막을 포함할 수 있다. 적합한 정반사 층의 예는 미국 미네소타주 세인트 폴(St. Paul, MN.) 소재의 쓰리엠 컴퍼니(3M Company)로부터 취득되는 비퀴티 강화 경면 반사기(Vikuiti Enhanced Specular Reflective, ESR) 막 (부품 번호 98044027500)이다.

[0064] 일부 실시 양태에서, 대조 층(230)은 배양 디바이스(210)에 커플링 (예를 들어, 접착성으로 커플링)될 수 있다. 대안의 실시 양태에서, 대조 층(230)은 배양 디바이스(210)의 베이스 부재(212) 상으로 코팅되는 조성물일 수 있다.

[0065] 샘플

[0066] 적합한 시험 샘플은 임의의 공급원으로부터 유래될 수 있다. 관심있는 샘플은 액체(예를 들어, 음료, 공정 스트림, 물), 고형물(예를 들어, 식품 성분, 식물, 육류, 공기, 표면(예를 들어, 바다, 벽, 기기, 식품 가공 설비) 등을 포함할 수 있다. 또한 샘플은 배양된 세포(예를 들어, 박테리아 배양물, 농축 브로쓰)를 포함할 수 있다.

[0067] 표면 상의 미생물의 검출을 위한 다양한 샘플링 기술이 공지되어 있다. 그러한 샘플링 기술은 본 발명의 방법에 또한 적합하다. 예를 들어, 식품 가공 설비의 표면을 닦음에 의해 또는 환자의 비공을 닦음에 의해 샘플을 취득하는 것이 일반적이다. 특히 바람직한 샘플링 기술은 표면을 살균 면봉, 스왑 또는 샘플링 디바이스와 접촉시키는 것(예를 들어, 스와빙(swabbing), 닦음)을 포함한다.

[0068] 매우 다양한 면봉 또는 기타 샘플 수합 디바이스는 예를 들어 미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니로부터 상표명 쓰리엠™ 퀵 스왑(Quick Swab)으로, 미국 메인주 길포드 소재의 퓨리탄 메디칼 프로덕츠 코. 엘엘씨(Puritan Medical Products Co. LLC)로부터 상표명 퓨어-랩스(PURE-WRAPS)로, 또는 미국 캘리포니아주 코로나 소재의 코판 다이아그노스틱스, 인크.(Copan Diagnostics, Inc.)로부터 상표명 에스왑 (ESWAB)으로, 또는 이탈리아 브레시아 소재의 마이크로레올로지스, 에스.알.엘(microRheologics, S.r.l.)로부터 상표명 플록트스왑 (FLOCKEDSWAB)으로 구매가능하다. 원할 경우 예를 들어 미국 특허 제5,879,635호 (네이슨(Nason))에 개시된 것과 같은 샘플 수합 수단이 또한 사용될 수 있다. 면봉은 면, 레이온, 알긴산칼슘, 데이크론(Dacron), 폴리에스테르, 나일론, 폴리우레탄 등을 비롯한 다양한 재료의 것일 수 있다.

[0069] 이어서 샘플 수합 디바이스 (예를 들어, 면봉)는 직접적으로 배양되거나, 직접적으로 분석되거나, 적절한 용액을 이용하여 (예를 들어 세척에 의해, 와동에 의한 용출에 의해) 추출될 수 있다. 그러한 추출(즉, 용출) 용액은 전형적으로 물을 포함하며, 완충제 및 하나 이상의 계면활성제를 선택적으로 포함할 수 있다. 용출 완충제의 예에는 예를 들어 인산염 완충 염수(PBS)가 포함되며, PBS는 예를 들어 트윈 20 또는 플루로닉(PLURONIC) L64와 조합되어 사용될 수 있다. 시험 샘플(예를 들어, 액체)은 추가 분석 이전에 처리될 수 있다. 이는 농축, 침전, 여과, 원심분리, 투석, 희석, 천연 성분들의 불활성화, 시약의 첨가, 화학적 처리 등을 포함한다.

[0070] 샘플 내의 미생물의 검출 방법

[0071] 본 개시문헌은 샘플 내 박테리아의 검출 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 방법은 액체 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 베이스 부재 및/또는 커버 시트에 커플링된 접착 층, 및 접착 층 상에 배치된 건조 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함하고, 디바이스는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된다.

[0072] 임의의 실시 양태에서, 방법은 디바이스의 성장 영역을 샘플로 수화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 샘플은 본래 액체 샘플 (예를 들어, 밀크, 처리 수(process water)) 및/또는 고형물 샘플 (예를 들어, 식품, 식품 성분, 환경 잔여물)일 수 있다. 액체 또는 고형물 샘플은 액체 배지 (예를 들어, 물, 완충제) 내에서 용해 또는 현탁될 수 있다. 배양 디바이스는 (예를 들어, 베이스 부재의 적어도 일부로부터 커버 시트를 분리하기 위해 커버 시트를 들어 올림으로써) 개방되고, 샘플이 든 액체가 베이스 부재와 커버 시트 사이의 성장 영역 내로 옮겨져서 (예를 들어, 파이펫으로 또는 부어져서) 액체 샘플이 겔화제와 접촉하게 된다. 액체 샘플과 접촉된 후, 겔화제는 하이드로겔용도로 수화된다.

[0073] 임의의 실시 양태에서, 방법은 일정 기간 동안 디바이스를 인큐베이션시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일정 기간은 소정의 시간일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 약 8 시간 이상, 약 12 시간 이상, 약 18 시간 이상, 약 24 시간 이상, 약 48 시간 이상 또는 약 72 시간 이상 동안 인큐베이션될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 약 24시간 이하, 약 48시간 이하, 또는 약 72시간 이하 동안 인큐베이션될 수 있다. 인큐베이션 온도는 검출되는 미생물에 따라 선택된다. 당업자는 검출될 미생물에 대해 적절한 인큐베이션 온도 (예를 들어, 약 25°C, 약 30°C, 약 35°C, 약 37°)를 선택할 것이다.

[0074] 임의의 실시 양태에서, 방법은 성장 영역 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 미생물의 존재 또는 부재의 검출은 성장 영역을 광원으로 조사하는 단계를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 광원 (예를 들어, 백색 광)은 상대적으로 넓은 스펙트럼의 광을 제공할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 광원은 상대적으로 좁은 띠(band)의 선택된 파장 (예를 들어, 광학적으로 여과된 백색 광 또는 자외선 광)을 제공할 수 있다.

[0075] 임의의 실시 양태에서, 방법은 성장 지표를 관찰하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 양태에서, 성장 지표는 개인이 시각적으로 관찰할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 성장 지표는 이미지 형성 디바이스를 사용해 관찰될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지 형성 디바이스는 성장 영역의 이미지를 디스플레이 또는 인쇄할 수 있어서, 개인은 디스플레이 또는 인쇄된 이미지를 시각적으로 관찰하고 분석할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지 형성 디바이스는 프로세서를 사용해 성장 영역의 이미지를 분석할 수 있고, 분석 결과는 전자 메모리에 저장되고, 디스플레이되고/되거나 인쇄될 수 있다.

[0076] 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 고도로 투과성인 광학 통로에서 물체를 관찰하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 물체는 광원으로부터 나오는 광을 반사, 흡수 또는 굴절시키는 미생물 콜로니일 수 있다. 콜로니는 콜로니 근처에 있는 하이드로겔과 대조를 이루는 밝은 스팟, 어두운 스팟, 또는 착색된 스팟으로서 관찰될 수 있다. 유리하게는, 고 광학 투과성을 위한 광학 디바이스의 성분 (예를 들어, 베이스 부재, 접착 층, 및 커버 시트)의 선택은 상대적으로 초기 성장 단계에서 미생물 콜로니를 검출하기 위해 증대된 대조를 제공한다.

[0077] 도 6은 본 개시문헌에 따라 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 한 실시 양태를 보여준다. 실시 양태는, 최외곽 제1 주 표면(604)으로부터 최외곽 제2 주 표면(606)까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열되는 배양 디바이스(610) (측면도에서 도시됨)를 제공하는 것을 포함한다. 배양 디바이스(610)는 베이스 부재(612), 베이스 부재(612)에 커플링된 임의의 접착 층(614), 커버 시트(622), 및 접착 층(614)과 커버 시트(622) 사이에 배치된 하이드로겔(617) (예를 들어, 수화된 겔화 층)을 포함한다. 예시된 실시 양태에서, 하이드로겔(617)은 액체 샘플로 수화된다.

[0078] 배양 디바이스(610)는 광원(670)으로부터의 광자에 의해 조사된다. 광자는 일반적으로 광학적으로 투과성인 배양 디바이스(610)를 통해 통과할 수 있다. 본래의 샘플 내에 존재하는 미생물은 배양 디바이스(610)의 하이드로겔(617) 내에서 미생물 콜로니(660)를 형성할 수 있다. 광원(670)으로부터의 광자는 미생물 콜로니(660)에 부딪히고, 콜로니에서 광자는 반사 (관찰자(690) 쪽으로 반사되는 광자 "A"로서 도시됨) 또는 흡수되어서, 배양 디바이스(610)의 성분 (예를 들어, 커버 층, 겔화 층, 접착 층, 및/또는 베이스 부재)의 휘도 및/또는 색상과 대조되는 관찰가능한 밝은 스팟, 어두운 스팟, 또는 착색된 스팟을 야기할 수 있다. 예시된 실시 양태에서, 광원은 배양 디바이스(610)의 제1 주 표면(604)과 마주하도록 위치된다. 예시된 실시 양태에서, 성장 지표를 관

찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치 (즉, 관찰자(690))로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함한다.

- [0079] 방법의 일부 실시 양태에서, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 광학 필터(650)를 제공하고 광학 필터(650)를 광원(670)과 배양 디바이스(610) 사이에 위치시키는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시 양태에서, 배양 디바이스(610)는 선택된 파장 (예를 들어, 적색 파장, 청색 파장, 자외선 파장)의 광으로 조사될 수 있다. 이러한 배열은 특히, 미생물 콜로니(660)의 색상이 배양 디바이스(610)의 하나 이상의 성분의 색상과 단지 약간만 상이할 때 유리할 수 있다.
- [0080] 방법의 일부 실시 양태에서 (도시되지 않음), 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면과 마주하는 관찰자가 배양 디바이스를 관찰하는 단계를 포함할 수 있다. 이들 실시 양태에서, 즉, 광원이 배양 디바이스의 제1 주 표면과 마주하고, 관찰자가 배양 디바이스의 제2 주 표면과 마주하는 경우, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물의 콜로니에 의해 및/또는 지시 시약에 의해 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0081] 방법의 일부 실시 양태에서, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 대조 층(630)을 제공하고, 배양 디바이스(610)를 관찰하기 전에, 배양 디바이스(610)의 제2 주 표면(606) 근처에 대조 층(630)을 위치시키는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시 양태에서, 대조 층(630)은 실질적으로 광원(670)으로부터의 광자를 반사 또는 흡수해서, 미생물 콜로니(660)와 배양 디바이스(610)의 하나 이상의 성분 사이에서 대조를 증가시킨다. 이들 실시 양태의 적합한 대조 층(630)은 본 명세서에서 기술된 대조 층 중 임의의 대조 층을 포함한다. 대조 층(630)은 배양 디바이스(610)의 성장 영역 (도시되지 않음)의 임의의 일부 또는 모두와 겹치도록 위치될 수 있다.
- [0082] 방법의 일부 실시 양태에서 (도시되지 않음), 미생물의 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스를 관찰하기 전에, 배양 디바이스의 제2 주 표면 근처에 제2 대조 층을 위치시키고, 배양 디바이스의 제1 주 표면과 마주하도록 위치된 광원으로부터 배양 디바이스를 조사하고, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시 양태는 2 개의 개별 미생물 (예를 들어, 개별 종; 개별 속; 및 예를 들어, 콜리포름과 같은 개별 군)을 검출하는 데 특히 유리할 수 있다. 그래서, 이들 실시 양태는 미생물의 검출 및 구별을 제공할 수 있다. 일부 실행에서, 이들 실시 양태는 특정 종, 속 또는 군의 미생물의 확인을 제공할 수 있다. 예를 들어, 제1 대조 층은 특정 미생물의 존재의 추정상의 지표 (예를 들어, 콜리포름 미생물에 의한 락토오스의 대사로 인한 CO₂ 생성)의 관찰을 제공할 수 있고, 제2 대조 층은 미생물의 존재의 확정상의 지표 (예를 들어, 콜리포름 미생물에서 발견되는 β-갈락토시다아제 효소에 대한 발색원성 효소 기질의 가수분해)의 관찰을 제공할 수 있다. 이들 실시 양태에서, 성장의 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면과 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함한다.
- [0083] 방법의 일부 실시 양태에서, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 지시 시약 (예를 들어, pH 지시 시약, 또는 발색원성 또는 형광원성 효소 기질)의 관찰가능한 변화를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시 양태에서, 지시 시약은 유도체 (예를 들어, 양자화된 지시 시약, 가수분해된 지시 시약)로 변화될 수 있고, 여기서 지시 시약의 변화 (예를 들어, 색상 변화 또는 형광 변화)는 미생물 콜로니(660) 내에서 및/또는 인접해서 관찰가능한 밝은 스팟, 어두운 스팟, 또는 색상 변화를 제공한다. 적합한 지시 시약에는 예를 들어 형광 또는 형광원성 분자 및 생물인광 화합물이 포함된다.
- [0084] 방법의 다른 실시 양태에서, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 도 7에서 도시된 바와 같이, 배양 디바이스의 제1 주 표면과 마주하도록 관찰자를 위치시키고 배양 디바이스의 제2 주 표면과 마주하도록 광원을 위치시키는 단계를 포함한다.
- [0085] 도 7의 예시된 실시 양태는 최외곽 제1 주 표면(704)으로부터 최외곽 제2 주 표면(706)까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열된 배양 디바이스(710) (측면도에서 도시됨)를 제공하는 것을 포함한다. 배양 디바이스(710)는 베이스 부재(712), 베이스 부재(712)에 커플링된 임의의 접착 층(714), 커버 시트(722), 및 접착 층(714)과 커버 시트(722) 사이에 배치된 겔화 층(716)을 포함한다. 예시된 실시 양태에서, 겔화 층(716)은 액체 샘플로 수화된다.
- [0086] 배양 디바이스(10)는 광원(770)에서 나오는 광자에 의해 조사된다. 광자는 일반적으로 광학적으로 투과성인 배양 디바이스(710)를 통해 통과할 수 있다. 본래의 샘플 내에 존재하는 미생물은 배양 디바이스(710)의 겔화 층(716) 내에서 미생물 콜로니(760)를 형성할 수 있다. 광원(770)으로부터의 광자는 미생물 콜로니(760)에 부딪히고, 콜로니에서 광자는 반사 (관찰자(790) 쪽으로 반사되는 광자 "A"로서 도시됨), 투과 또는 흡수되어서, 배

양 디바이스(710)의 성분 (예를 들어, 커버 층, 겔화 층, 접착 층, 및/또는 베이스 부재)의 휘도 및/또는 색상과 대조되는 관찰가능한 밝은 스팟, 어두운 스팟, 또는 착색된 스팟을 야기할 수 있다. 예시된 실시 양태에서, 광원(770)은 배양 디바이스(710)의 제2 주 표면(706)과 마주하도록 위치된다. 예시된 실시 양태에서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스(710)의 제1 주 표면(704)을 마주하는 관찰 위치 (즉, 관찰자(790))로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함한다.

[0087] 방법의 일부 실시 양태에서, 미생물 성장의 지표를 관찰하는 단계는 광학 필터 (도시되지 않음)를 제공하고, 광원(770)과 배양 디바이스(710) 사이에 광학 필터를 위치시키는 단계를 추가로 포함한다. 이들 실시 양태에서, 배양 디바이스(710)는 선택된 파장 (예를 들어, 적색 파장, 청색 파장, 자외선 파장)의 광으로 조사될 수 있다. 이러한 배열은 특히, 미생물 콜로니(760)의 색상이 배양 디바이스(710)의 하나 이상의 성분의 색상과 단지 약간만 상이할 때 유리할 수 있다.

[0088] 이들 실시 양태에서, 즉, 광원이 배양 디바이스의 제2 주 표면과 마주하고, 관찰자가 배양 디바이스의 제2 주 표면과 마주하는 경우, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물의 콜로니에 의한 및/또는 지시 시약에 의한 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0089] 비생물기원의 기체 방울의 관찰에 의한 미생물의 존재 또는 부재의 검출:

[0090] 또다른 측면에서, 본 개시문헌은 비생물기원의 기체 방울의 존재 또는 크기를 관찰함으로써 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 방법은 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 그 사이에 배치된 하이드로겔을 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함한다. 하이드로겔 안에는 다수의 비생물기원의 기체 방울이 분포되어 포함되어 있다. 하이드로겔은 배양 디바이스 내에서 성장 영역을 한정한다. 방법은, 디바이스의 성장 영역에 샘플을 접종하고, 디바이스를 일정 기간 동안 인큐베이션시키고, 배양 디바이스를 광원으로 조사하고, 제1 시점에서 배양 디바이스 내에서의 하나 이상의 비생물기원의 기체 방울의 크기 감소 또는 부재를 검출함으로써 배양 디바이스 내에서의 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 이들 방법은 유리하게는, 콜로니가 다른 수단에 의해 (예를 들어, 콜로니의 시각적 검출에 의해, 지시제 (예를 들어, 발색원성 효소 기질, 형광원성 효소 기질, Ph 지시제, 산화환원 지시제)의 광학 특성의 변화의 검출에 의해 (여기서, 변화는 미생물 콜로니의 존재와 연관 있음)) 검출될 수 있기 전에, 미생물 콜로니의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0091] 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스의 성장 영역은 미생물의 성장을 지지하기 위해 하나 이상의 영양분을 포함한다. 배양 디바이스의 성장 영역은 특정 미생물 또는 미생물 군 (예를 들어, 항생제 내성 미생물)의 성장을 선택하기 위한 하나 이상의 선별제를 추가로 포함할 수 있다. 특정 유기체 또는 유기체 군 (예를 들어, 호기성 박테리아)의 성장에 선호적인 영양분 및/또는 선별제는 당업자에게 알려져 있다. 영양분 또는 선별제는 그것이 실질적으로 하이드로겔에서 비생물기원의 기체 방울의 형성 및/또는 관찰을 방해하지 않도록 선택되어야 할 것이다.

[0092] 일부 실시 양태에서, 하이드로겔은 디바이스의 성장 영역을 통틀어서 배양 디바이스의 커버 층 및 베이스 부재와 균일하게 접촉해 있다 (즉, 하이드로겔은 베이스 부재와 커버 층 사이에서 "끼어 있음"). 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 미국 특허 제4,565,783 호에서 개시된 디바이스와 같은 박막 배양 디바이스일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 본 개시문헌에 따라 매우 광학적으로 투과성인 배양 디바이스일 수 있다.

[0093] 비생물기원의 기체 방울은 디바이스가 수성 액체로 수화되거나 액체 샘플 (예를 들어, 수성 액체 샘플)이 접종될 때 디바이스 내에서 자발적으로 형성될 수 있다. 이론에 구애되지 않으면서, 비생물기원의 기체 방울은, 건조된 냉각 수용성 겔화제가 수성 샘플을 이용해 수화되어서 겔화제가 팽윤됨에 따라 공기 방울이 하이드로겔 내에 포획되게 될 때, 형성될 수 있다. 디바이스가 수화 또는 접종된 후 비생물기원의 기체 방울이 배양 디바이스 내에서 관찰가능하게 되는 데에는 약 수 분 내지 약 수 시간이 걸릴 수 있다. 비생물기원의 기체 방울은 배양 디바이스의 성장 영역을 통틀어서 규칙적으로 분포 또는 무작위적으로 분포될 수 있다. 바람직하게는, 비생물기원의 기체 방울은 배양 디바이스의 성장 영역을 통틀어서 균일하게 분포된다. 소정의 바람직한 실시 양태에서, 비생물기원의 기체 방울은 크기가 대략 균일하다. 일부 실시 양태에서, 비생물기원의 기체 방울의 직경은 약 1 mm 미만이다. 소정의 바람직한 실시 양태에서, 비생물기원의 기체 방울의 직경은 약 0.5 mm 내지 약 1.0 mm이다. 일부 실시 양태에서, 비생물기원의 기체 방울의 직경은 약 0.5 mm 미만이다. 일반적으로, 더 작고 균일하게 분포된 비생물기원의 기체 방울은 배양 디바이스 내에서 미생물의 개별 콜로니의 검출의 더 큰 민감도 및 해상도를 허용할 수 있다.

- [0094] 비생물기원의 기체 방울의 수 및 공간적인 분포는 배양 디바이스 내에서의 미생물의 검출을 촉진시킬 수 있다. 바람직하게는, 하이드로겔 평방 cm 당 약 50 개 내지 100 개의 비생물기원의 기체 방울이 존재한다. 더욱 바람직하게는, 하이드로겔 평방 cm 당 약 100 개 내지 약 500 개의 비생물기원의 기체 방울이 존재한다. 일부 실시 양태에서, 평방 cm 당 약 200 개의 비생물기원의 기체 방울이 존재한다.
- [0095] 배양 디바이스의 성장 영역에 샘플이 접종된다. 일부 실시 양태에서, 하이드로겔은 겔화제 (예를 들어, 냉각 수용성 겔화제)를 수성 액체 (예를 들어, 멸균수, 멸균 완충제)로 수화시켜서 형성된다. 이들 실시 양태에서, 배양 디바이스는 하이드로겔 중 적어도 일부를 노출시키도록 (예를 들어, 커버 층을 들어올려서) 개방될 수 있고, 하이드로겔은 샘플과 접촉될 수 있다. 예를 들어, 샘플 수합 디바이스 (예를 들어, 면봉)는 하이드로겔과 접촉되어서, 고형물 또는 액체 샘플을 배양 디바이스에 옮길 수 있다. 대안적인 실시 양태에서, 액체 샘플은 하이드로겔 상으로 파이펫팅될 수 있다. 추가의 대안적인 실시 양태에서, 하이드로겔은 표면 (예를 들어, 장비, 바닥, 벽)과 접촉되어서 표면 상에 존재했던 물질 (예를 들어, 얼룩, 먼지, 잔여물)이 하이드로겔에 접촉될 수 있다. 하이드로겔의 접촉 후, 배양 디바이스는 폐쇄된다.
- [0096] 배양 디바이스가 건조된 재수화성 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 실시 양태에서, 하이드로겔은 샘플을 포함하는 수성 액체 중 소정의 부피 (예를 들어, 약 1 mL, 약 5 mL)와 건조 겔화제를 접촉시킴으로써 형성될 수 있다.
- [0097] 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 상기 기술된 바와 같이 미생물의 성장을 지지하기 위한 영양분을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 미생물의 성장을 지지하기 위한 영양분은 액체 샘플 내에서 제공된다 (예를 들어, 액체 샘플은 디바이스에 액체 샘플을 접종하기 전에 영양분과 혼합됨). 접종 후, 배양 디바이스는 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 일정 기간 동안 인큐베이션될 수 있다.
- [0098] 접종 후, 그리고 실질적인 미생물 성장이 배양 디바이스 내에서 발생하기 전에 (예를 들어, 약 1 회 내지 2 회 의 세포 분열이 발생하는 데까지 걸리는 시간보다 더 적음), 배양 디바이스는 실질적인 미생물 성장이 발생한 후에 동일한 배양 디바이스와 비교되도록 관찰 또는 이미징화될 수 있다. 대안적으로, 유사한 배양 디바이스는 대조군으로서 멸균 액체가 접종될 수 있다.
- [0099] 인큐베이션 후, 배양 디바이스는 미생물의 존재 또는 부재의 지표에 대해 관찰될 수 있다. 미생물의 존재는 제 1 시점에서 배양 디바이스 내에서의 다수의 비생물기원의 기체 방울의 불연속성에 의해 지시될 수 있다. 즉, 배양 디바이스는 성장 영역 내에 분포된 다수의 비생물기원의 기체 방울의 존재에 대해 관찰될 수 있다. 불연속성은, 성장 영역의 구역 내에서, 하나 이상의 비생물기원의 기체 방울이 실질적으로 성장 영역 내의 전형적인 비생물기원의 기체 방울보다 더 작고/거나 하나 이상의 비생물기원의 기체 방울이 없는 영역이 존재할 때, 관찰될 수 있다. 이론에 구애되지 않으면서, 비생물기원의 기체 방울은 하나 이상의 비생물기원의 기체 방울을 분산시키는 계면활성제의 미생물 생성에 의해 또는 미생물에 의한 기체 (산소, 이산화탄소 및/또는 질소)의 대사에 의해 크기가 줄어들거나 사라질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스 내에서의 비생물기원의 기체 방울의 불연속성의 존재는, 배양 디바이스가 2 개 이상의 시점 (예를 들어, 실질적인 미생물 성장이 발생하기 전 및 미생물 성장이 발생한 후)에서 관찰 (또는 이미징화)되고 각 시점에서의 관찰이 비교될 때, 더욱 분명해질 수 있다.
- [0100] 도면으로 되돌아가서, 도 3은 제1 시점에서 배양 디바이스의 한 실시 양태의 상면도를 보여준다. 배양 디바이스는 비생물기원의 방울을 포함한다. 도 3에서 예시된 배양 디바이스(310)는, 비생물기원의 기체 방울(340)이 디바이스 내에서 형성된 후에 그러나 실질적인 미생물 성장이 발생되기 전의 (예를 들어, 접종 후 약 1 분 내지 약 15 분) 배양 디바이스(310)를 나타낸다. 배양 디바이스(310)는, 하이드로겔(317) 내에 비생물기원의 기체 방울(340)을 함유하는 스페이서(318)에 의해 경계가 지어진(bounded) 원형 성장 영역(326)을 포함한다. 기체 방울(340)은 성장 영역(326)을 통틀어서 무작위적으로 분포된다.
- [0101] 도 4a는 제2 시점 (예를 들어, 접종 후 약 8 시간)에서 도 3의 배양 디바이스의 상면도를 보여준다. 도 4b는 도 4a의 배양 디바이스(410)의 일부의 확대도를 보여준다. 확대도는 하이드로겔(417) 내에 분포된 다수의 비생물기원의 기체 방울(440)뿐만 아니라 다수의 크기 감소된 비생물기원의 기체 방울(442)을 보여준다. 크기 감소된 기체 방울(442)은 성장 영역 내의 전형적인 비생물기원의 기체 방울(440)보다 관찰가능하게 더 작다. 배양 디바이스(410) 내에서의 비생물기원의 기체 방울의 불연속성은, 이 시점에서 미생물 콜로니의 다른 시각적 지표가 없다고 하더라도 미생물의 존재를 지시할 수 있는 것으로 여겨질 것이다.
- [0102] 도 5a는 제3 시점 (예를 들어, 접종 후 약 12 시간)에서 도 3의 배양 디바이스의 상면도를 보여준다. 도 5b는 도 5a의 배양 디바이스(510)의 일부의 확대도를 보여준다. 확대도는 하이드로겔(517) 내에 분포된 다수의 비생

물기원의 기체 방울(540) 및 다수의 관찰가능하게 작은 비생물기원의 기체 방울(542)을 보여준다. 도 5b는 관찰가능하게 방울-없는 구역(544)을 또한 보여준다. 비생물기원의 기체 방울(540), 관찰가능하게 작은 비생물기원의 기체 방울(542) 및 방울-없는 구역(544)은 모두 시각적 미생물 콜로니(560)에 근접해 있다. 관찰가능하게 작은 비생물기원의 기체 방울(542)은, 이들이 하이드로겔(517)을 통틀어서 분포된 비생물기원의 기체 방울(542)의 정상 크기 범위보다 훨씬 더 작다는 점에서 비생물기원의 기체 방울(540)과 구별가능하다.

- [0103] 방법의 일부 실시 양태에서, 2 개 이상의 시점에서 배양 디바이스의 지표를 비교하는 것은 배양 디바이스 내의 비생물기원의 기체 방울의 존재 또는 크기의 (예를 들어, 미생물의 존재로 인한) 불연속성의 발달을 확인할 수 있다.
- [0104] 방법의 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 주변 광 (예를 들어, 햇빛)으로 조사된다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스는 선택된 파장의 광 (예를 들어, 백색 광, 자외선 광)을 방출하는 광원으로 조사된다.
- [0105] 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스를 조사하는 단계는, 상기 기술된 바와 같이 배양 디바이스의 최외곽 제1 주 표면 또는 제2 주 표면과 마주하도록 위치된 광원으로 배양 디바이스를 조사하는 단계를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 성장의 지표를 관찰하는 단계는 상기 기술된 바와 같이 배양 디바이스의 제1 주 표면 또는 제2 주 표면과 마주하는 관찰자가 성장의 지표를 관찰하는 단계를 포함한다.
- [0106] 일부 실시 양태에서, 성장의 지표를 관찰하는 단계는 관찰자 (예를 들어, 작동자 또는 이미지 형성 디바이스)가 마주하는 주 표면과 반대쪽에 있는 배양 디바이스의 주 표면 상에 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함한다. 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 광의 산란, 흡수 또는 투과(예를 들어, 미생물 콜로니에 의한 광의 산란, 흡수 또는 투과)를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물을 열거하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0107] 이미지 형성 시스템을 사용한 미생물 성장의 지표의 검출:
- [0108] 상기 실시 양태 중 임의의 실시 양태에서, 본 방법은 이미지 형성 시스템을 제공하고 배양 디바이스의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이들 실시 양태에서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 배양 디바이스의 이미지를 디스플레이, 인쇄 또는 분석하는 단계를 포함한다. 이미지 형성 시스템은 이미지 형성 디바이스를 포함하며, 프로세서를 포함할 수도 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지 형성 디바이스는 라인-스캐너 또는 영역 스캐너 (예를 들어, 카메라)를 포함할 수 있다. 이미지 형성 디바이스는 단색(예를 들어, 흑백) 또는 다색(예를 들어, 컬러) 스캐너를 포함할 수 있다. 유리하게는, 단색 이미지 형성 시스템은 더욱 높은 해상도의 이미지를 제공할 수 있으며, 이 이미지는 결과의 정확도를 개선시키고/시키거나 배양 디바이스 중 미생물의 존재를 검출하는 데 필요한 시간을 감소시킬 수 있다.
- [0109] 일부 실시 양태에서, 이미지 형성 시스템은 조명 시스템을 추가로 포함한다. 조명 시스템은 넓은 스펙트럼의 가시광(예를 들어, "백색" 광)의 하나 이상의 공급원을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 조사 시스템은 좁은 스펙트럼의 가시광의 하나 이상의 공급원(예를 들어, 상대적으로 좁은 대역폭의 가시광, 예컨대 적색광, 녹색광 또는 청색광을 방출하는 발광 다이오드)을 포함할 수 있다. 소정의 실시 양태에서, 조명 시스템은 약 525 nm의 발광 피크를 갖는 좁은 스펙트럼의 가시광의 공급원(예를 들어, 발광 다이오드)을 포함할 수 있다.
- [0110] 이미지는 배양 디바이스 내의 하이드로겔에 의해 반사되는 광으로부터 획득될 수 있거나, 이미지는 배양 디바이스 내의 하이드로겔을 통해 투과되는 광으로부터 획득될 수 있다. 적합한 이미지 형성 시스템 및 상응하는 조명 시스템은 예를 들어 각각이 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 국제특허 공개 WO 2005/024047호 및 미국 특허 출원 공개 제2004/0101954호 및 미국 특허 출원 공개 제2004/0102903호에 기술되어 있다. 적합한 이미지 형성 시스템의 비제한적 예에는 쓰리엠 컴퍼니(미국 미네소타주 세인트 폴 소재)로부터 입수가 가능한 페트리필름 플레이트 판독기(PETRIFILM Plate Reader; PPR), 스파이럴 바이오테크(Spiral Biotech; 미국 매사추세츠주 노르우드(Norwood, MA) 소재)로부터 입수가 가능한 페트리스캔 콜로니 계수기(PETRISCAN Colony Counter), 및 신바이오시스(Symbiosis; 영국 캠브리지 소재)로부터 입수가 가능한 프로토콜(PROTOCOL) 및 아콜라이트(ACOLYTE) 플레이트 스캐너가 포함된다.
- [0111] 일부 실시 양태에서, 이미지 획득은 파장-바이어스된 이미지를 획득하는 것을 포함한다. 예를 들어, 이미지 형성 시스템은 이미지 형성 디바이스에 의해 수렴되는 광을 바이어스시키는 바이어스 필터를 포함할 수 있다. 필터 요소는 당업계에 공지되어 있으며, "컷오프(cut-off)" 필터(즉, 소정의 특정한 파장보다 큰 또는 그보다 작은 광 파장의 통과를 허용하는 필터) 및 "밴드패스(band-pass)" 필터(즉, 소정의 특정한 상한치와 하한치 사이

의 광 파장의 통과를 허용하는 필터) 둘 모두를 포함한다. 바이어스 필터는 조명원과 배양 디바이스 사이에 위치될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 바이어스 필터는 배양 디바이스와 이미지 형성 디바이스 사이에 위치될 수 있다.

- [0112] 소정의 바람직한 실시 양태에서, 이미지 수득은 적색 파장의 통과를 선택적으로 허용하는 바이어스 필터를 사용하여 이미지를 수득하는 것을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미지 수득은 약 500 nm 내지 약 550 nm의 파장의 통과를 선택적으로 허용하는 바이어스 필터를 사용하는 것을 포함한다.
- [0113] 도 8은 이미지 형성 시스템(870)의 내부 작동법을 예시하는 블록 다이어그램이다. 도 8에 예시된 바와 같이, 배양 디바이스(882)는 이미지 형성 시스템 내에서 (예를 들어, 플랫폼 상의) 촛점면 (도시되어 있지 않음) 내에 위치된다. 본 발명에 따르면, 이미지 형성 디바이스(892)는 배양 디바이스(882)의 전면 및/또는 후면 조명을 위한 다색 조명 시스템 (도시되어 있지 않음)과, 배양 디바이스(882)의 이미지를 포착하는 단색 라인 또는 영역 스캐너를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 예를 들어 이미지 형성 디바이스(892)는 2차원 단색 카메라의 형태를 취할 수 있다.
- [0114] 일반적으로, 이미지 형성 디바이스(892)는 하나 이상의 상이한 조명 색으로 배양 디바이스를 조명하는 동안 배양 디바이스(882) 또는 그의 적어도 일부분의 이미지를 포착한다. 일부 실시 양태에서, 동일한 배양 디바이스(882)의 다수의 이미지가 다양한 조명 지속 기간 또는 강도로 생성될 수 있으며, 다수의 이미지 중 하나 이상이 분석용으로 선택될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 배양 디바이스(882)의 제1 면 및 제2 면의 선택적 조명을 이용하여 배양 디바이스의 다수의 이미지를 생성할 수 있으며, 이미지들 중 하나 이상이 분석용으로 선택될 수 있다. 분석용 이미지의 선택은 예를 들어 개별 이미지의 사물 해상 특성 및/또는 색 대비를 기반으로 할 수 있다. 이미지의 색 대비 및 사물 해상 특성의 결정 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 전체적으로 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제6,243,286호에 개시되어 있다.
- [0115] 프로세서(894)는 이미지 형성 디바이스(892)의 작동을 제어한다. 작동자에 의한 시각적 개관을 위하여 프로세서(894)로부터 이미지를 받을 수 있는 선택적 디스플레이(876)가 도 8에 또한 도시되어 있다. 작동에 있어서, 프로세서(894)는 이미지 형성 디바이스(892)가 배양 디바이스(882)를 조명하여 이미지를 수득하는 것을 제어한다. 프로세서(894)는 이미지 형성 디바이스(892)로부터의 스캐닝된 이미지를 나타내는 이미지 데이터를 받는다. 일부 실시 양태에서, 프로세서(894)는 분석 및/또는 디스플레이용으로 다수의 이미지로부터의 하나의 이미지를 선택할 수 있다. 프로세서(894)는 배양 디바이스(882)의 하나 이상의 이미지를 분석하며, 분석 결과, 예를 들어 미생물 콜로니의 계수, 또는 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재의 결정을 생성할 수 있다. 분석 결과 (예를 들어, 정성적 또는 정량적 결과)는 디스플레이(876) 상에 디스플레이되거나, 선택적 데이터 저장 메모리(898)에 저장되거나, 선택적 통신 포트(895)를 통하여 호스트 컴퓨터(도시되어 있지 않음)에 의해 검색될 수 있다.
- [0116] 배양 디바이스의 이미지의 분석은 이미지에서 색상 및/또는 다양한 색조의 색상 (예를 들어, 적색, 녹색, 청색, 회색)을 검출하는 시스템을 사용하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 이미지 분석 시스템은 예를 들어, 미국 특허 제5,448,652 호; 제6,243,486 호; 및 제6,153,400 호에서 기술된 이미지 분석 시스템을 포함하며; 이의 각각은 그 전체가 참고에 의해 본 명세서에 삽입되어 있다.
- [0117] 소정의 실시 양태에서, 배양 디바이스의 이미지 분석은 이미지의 선택된 파장의 분석을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이미지는 광범위한 스펙트럼의 가시광 (예를 들어, "백색" 광)의 공급원을 이용하여 배양 디바이스를 조사함으로써 수합된 색상 이미지일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지는 상대적으로 좁은 스펙트럼의 가시광의 다수의 공급원 (예를 들어, 각각이 상대적으로 좁은 대역폭의 가시광, 예컨대 적색광, 녹색광 또는 청색광을 방출하는 발광 다이오드들의 조합)을 이용하여 배양 디바이스를 조사함으로써 수합된 색상 이미지일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지는 상대적으로 좁은 스펙트럼의 가시광 (예를 들어, 적색광, 녹색광 또는 청색광)의 2가지 이상의 상이한 공급원을 이용하여 배양 디바이스를 조명하면서 수합한 2가지 이상의 이미지를 조합함으로써 만들어진 복합 이미지일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이미지는 상대적으로 좁은 스펙트럼의 가시광 (예를 들어, 녹색광)의 공급원을 이용하여 배양 디바이스를 조사하면서 수합된 이미지일 수 있다. 이들 실시 양태에서, 소정의 파장의 이미지가 이미지의 디스플레이 또는 인쇄 및/또는 이미지 분석용으로 선택될 수 있다.
- [0118] 일부 실시 양태에서 (예를 들어, pH 지시제의 색상이 적색 내지 황색의 범위임), 이미지 분석용으로 선택된 파장은 녹색 범위의 파장(예를 들어, 약 500 nm 내지 약 550 nm의 파장)일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 분석용으로 선택된 파장은 약 520 nm 내지 약 530 nm의 파장이다. 일부 실시 양태에서, 분석용으로 선택된 파장은 약

525 nm이다.

- [0119] 파장은 예를 들어 디스플레이, 인쇄 및/또는 분석용 이미지에서 소정의 범위의 파장을 전자적으로 선택하는 컴퓨터 프로그램을 사용함으로써 선택될 수 있다. 예를 들어, 소정의 녹색 파장 또는 일련의 녹색 파장들은 적색 배양 배지(예를 들어, 클로로페놀 레드)를 포함하는 배양 배지에서 성장하는 미생물 콜로니에 인접한 황색 구역의 이미지의 디스플레이, 인쇄 또는 분석에 특히 적합할 수 있다. 이미지에서 소정의 범위의 파장을 선택하기 위하여 임의의 적합한 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다. 적합한 컴퓨터 프로그램의 비제한적인 예에는 어도비 시스템즈, 인크.(Adobe Systems, Inc.; 미국 캘리포니아주 산호세(San Jose, CA) 소재)로부터 입수가능한 포토샵(PHOTOSHOP) CS4 소프트웨어 및 미디어 사이버네틱스(Media Cybernetics; 미국 매릴랜드주 실버 스프링스(Silver Springs, MD) 소재)로부터 입수가능한 이미지-프로 플러스(IMAGE-PRO Plus) 소프트웨어가 포함된다.
- [0120] 배양 디바이스에서 하이드로겔을 통해 투과되고/되거나 이에 의해 반사되는 녹색 파장의 이미지의 수합에 바이어스되는 방식으로 배양 디바이스의 이미지가 수득되고/되거나 분석된 소정의 실시 양태에서, 박테리아 콜로니에 인접한 산 구역(예를 들어, 황색 클로로페놀 레드)과 배양 배지 중 pH 지시제(예를 들어, 적색 클로로페놀 레드) 사이의 대조가 유의하게 증진된다. 그래서, 이들 실시 양태에서, 젖산 박테리아는 수합되는 이미지의 파장들을 바이어스시키지 않는 비견되는 방법에서보다 더욱 초기에 검출가능하다.
- [0121] 실시에
- [0122] 실시 양태 1은:
- [0123] 액체 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 베이스 부재 및/또는 커버 층 상에 배치된 건조 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계;
- [0124] (여기서, 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면, 최외곽 제2 주 표면, 및 성장 영역을 포함하고;
- [0125] 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면으로부터 최외곽 제2 주 표면까지 뻗어 있는 고도로 투과성인 광학 통로를 형성하도록 배열됨);
- [0126] 디바이스의 성장 영역을 샘플로 수화시키는 단계;
- [0127] 일정 기간 동안 디바이스를 인큐베이션시키는 단계; 및
- [0128] 성장 영역을 광원으로 조사하는 단계, 및
- [0129] 성장 영역에서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계;
- [0130] (여기서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표를 관찰하는 단계를 포함함)를 포함하는, 샘플 내 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법이다.
- [0131] 실시 양태 2는, 배양 디바이스가 베이스 부재 및/또는 커버 시트에 커플링된 접착 층을 추가로 포함하고, 겔화제는 접착 층 상에 배치되는 실시 양태 1의 방법이다.
- [0132] 실시 양태 3은, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하도록 위치된 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 또는 실시 양태 2에 따른 방법이다.
- [0133] 실시 양태 4는, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 3 중 어느 한 실시 양태에 따른 방법이다.
- [0134] 실시 양태 5는, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하도록 위치된 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 또는 실시 양태 2에 따른 방법이다.
- [0135] 실시 양태 6은, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는, 실시 양태 5에 따른 방법이다.
- [0136] 실시 양태 7은, 배양 디바이스의 성장 영역 중 적어도 일부를 겹치는 단계를 포함하며, 배양 디바이스의 제2 주 표면은 대조 층을 포함하는, 실시 양태 1 내지 4 중 어느 한 실시 양태에 따른 방법이다.
- [0137] 실시 양태 8은:
- [0138] 제1 대조 층을 제공하는 단계; 및
- [0139] 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 주변에 제1 대조 층을 위치시키는 단계

를 추가로 포함하는, 실시 양태 4의 방법이다.

- [0140] 실시 양태 9는:
- [0141] 제2 대조 층을 제공하는 단계; 및
- [0142] 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 주변에 제2 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함하는, 실시 양태 8의 방법이다.
- [0143] 실시 양태 10은, 하나 이상의 대조 층이 실질적으로 광을 반사시키는, 실시 양태 7 내지 9 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0144] 실시 양태 11은, 하나 이상의 대조 층이 경면 반사 층인, 실시 양태 7 내지 9 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0145] 실시 양태 12는, 하나 이상의 대조 층이 선택된 파장의 광을 실질적으로 흡수시키는, 실시 양태 7 내지 9 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0146] 실시 양태 13은, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 3 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0147] 실시 양태 14는, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 13 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0148] 실시 양태 15는, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물의 콜로니에 의한 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 14의 방법이다.
- [0149] 실시 양태 16은, 지시 시약을 첨가하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 지시 시약에서의 관찰가능한 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 15 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0150] 실시 양태 17은 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 형광 신호를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 16 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0151] 실시 양태 18은:
- [0152] 샘플, 및 베이스 부재, 커버 층, 및 그 사이에 배치된 다수의 비생물기원의 기체 방울을 포함하는 하이드로겔을 포함하는 배양 디바이스를 제공하는 단계;
- [0153] (여기서, 배양 디바이스는 최외곽 제1 주 표면 및 최외곽 제2 주 표면을 포함하며; 하이드로겔은 성장 영역을 한정함);
- [0154] 제1 시점에서 디바이스의 성장 영역에 샘플을 접종하는 단계;
- [0155] 일정 기간 동안 디바이스를 인큐베이션시키는 단계;
- [0156] 성장 영역을 광원으로 조사하는 단계; 및
- [0157] 제2 시점에서 성장 영역 내의 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계;
- [0158] (여기서, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 성장 지표를 관찰하는 단계를 포함하며; 성장 지표를 관찰하는 단계는 하이드로겔 내 비생물기원의 기체 방울 하나 이상의 크기 감소 또는 부재를 제2 시점에서 검출하는 단계를 포함함)를 포함하는, 샘플에서 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법이다.
- [0159] 실시 양태 19는;
- [0160] 배양 디바이스를 제공하는 단계는 건조한 냉각 수용성 겔화제를 포함하는 박막 배양 디바이스를 제공하는 단계를 포함하며, 방법은 겔화제를 수성 액체로 수화시키는 단계를 추가로 포함하는, 실시 양태 18의 방법이다.
- [0161] 실시 양태 20은, 수성 액체가 샘플을 포함하는, 실시 양태 19의 방법이다.
- [0162] 실시 양태 21은, 겔화제가 투명한 수성 액체로 수화될 때 디바이스가 실질적으로 광학적 투과성인 실시 양태 19 또는 실시 양태 20의 방법이다.

- [0163] 실시 양태 22는:
- [0164] 제3 시점에서 기체 방울의 크기 또는 부재와 관련하여 성장 영역을 관찰하는 단계 (여기서, 제3 시점은 제2 시점 이후에 발생함); 및
- [0165] 두 시점에서 성장 영역의 관찰을 비교하는 단계를 추가로 포함하는, 실시 양태 18 내지 21 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0166] 실시 양태 23은, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 실시 양태 18 내지 22 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0167] 실시 양태 24는, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 관찰 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 실시 양태 18 내지 23 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0168] 실시 양태 25는, 성장 영역을 조사하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하게 위치한 광원으로 성장 영역을 조사하는 단계를 포함하는 실시 양태 18 내지 22 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0169] 실시 양태 26은, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제1 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는 실시 양태 23의 방법이다.
- [0170] 실시 양태 27은, 배양 디바이스의 성장 영역 중 적어도 일부를 겹치는 단계를 포함하며, 배양 디바이스의 제2 주 표면은 대조 층을 포함하는 실시 양태 18 내지 22 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0171] 실시 양태 28은:
- [0172] 제1 대조 층을 제공하는 단계; 및
- [0173] 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 주변에 제1 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함하는, 실시 양태 22의 방법이다.
- [0174] 실시 양태 29는:
- [0175] 제2 대조 층을 제공하는 단계; 및
- [0176] 미생물의 존재 또는 부재를 검출하기 전에 배양 디바이스의 제2 주 표면 주변에 제2 대조 층을 위치시키는 단계를 추가로 포함하는, 실시 양태 28의 방법이다.
- [0177] 실시 양태 30은, 하나 이상의 대조 층이 실질적으로 광을 반사시키는, 실시 양태 27 내지 29 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0178] 실시 양태 31은, 하나 이상의 대조 층이 경면 반사 층인, 실시 양태 27 내지 29 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0179] 실시 양태 32는, 하나 이상의 대조 층이 선택된 파장의 광을 실질적으로 흡수하는, 실시 양태 27 내지 29 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0180] 실시 양태 33은, 성장 지표를 관찰하는 단계는 배양 디바이스의 제2 주 표면을 마주하는 위치로부터 성장 영역을 관찰하는 단계를 포함하는, 실시 양태 27 내지 29 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0181] 실시 양태 34는, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 33 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0182] 실시 양태 35는, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물의 콜로니에 의한 광의 산란, 흡수 또는 투과를 검출하는 단계를 포함하는, 실시 양태 32의 방법이다.
- [0183] 실시 양태 36은, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 미생물을 열거하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 실시 양태 35 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0184] 실시 양태 37은, 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는 2 개 이상의 유형의 미생물을 검출하고 구별하는 단계를 포함하는 실시 양태 1 내지 36 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0185] 실시 양태 38은 미생물의 존재 또는 부재를 검출하는 단계는:
- [0186] 이미지 형성 시스템을 제공하는 단계; 및

- [0187] 배양 디바이스의 성장 영역의 이미지를 획득하는 단계를 추가로 포함하고;
- [0188] 여기서, 성장 지표를 관찰하는 단계는 성장 영역의 이미지를 디스플레이, 인쇄 또는 분석하는 단계를 포함하는, 실시 양태 1 내지 37 중 어느 한 실시 양태의 방법이다.
- [0189] 실시 양태 39는:
- [0190] 베이스 부재;
- [0191] 커버 층; 및
- [0192] 접착 층 상에 배치된 냉각 수용성 겔화제를 포함하는, 미생물 검출용 디바이스로서,
- [0193] 여기서, 디바이스는 겔화제가 투명한 수성 액체로 수화될 때 실질적으로 광학적으로 투과성인, 디바이스이다.
- [0194] 실시 양태 40은, 베이스 부재 또는 커버 층 중 하나에 커플링된 제1 접착 층을 추가로 포함하는 실시 양태 39의 디바이스이다.
- [0195] 실시 양태 41은, 베이스 부재 또는 커버 층 중 다른 하나에 커플링된 제2 접착 층을 추가로 포함하는 실시 양태 40의 디바이스이다.
- [0196] 실시 양태 42는, 제1 또는 제2 접착 층 상에 배치된 영양분 배지를 추가로 포함하는 실시 양태 41의 디바이스이다.
- [0197] 실시 양태 43은, 지시 시약을 추가로 포함하는 실시 양태 40 내지 42 중 어느 한 실시 양태의 디바이스이다.
- [0198] 실시 양태 44는, 광학 필터 층 또는 대조 층을 추가로 포함하는 실시 양태 40 내지 43 중 어느 한 실시 양태의 디바이스이다.
- [0199] 실시 양태 45는, 디바이스를 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 배양 디바이스의 광학 탁도는 ASTM 1003에 따라 측정될 때 95% 이하인 실시 양태 40 내지 44 중 어느 한 실시 양태의 디바이스이다.
- [0200] 실시 양태 46은, 디바이스를 투명한 수성 액체로 수화시킨 후 배양 디바이스의 광학 투명도는 ASTM 1003에 따라 측정될 때 10% 이상인, 실시 양태 40 내지 45 중 어느 한 실시 양태의 디바이스이다.
- [0201] 본 발명을 하기 비제한적인 실시예를 참고로 하여 추가로 예시할 것이다. 모든 부 및 백분율은 달리 표시되지 않으면 중량부로 표현된다.
- [0202] 실시예
- [0203] 실시예 1
- [0204] 효모 및 곰팡이 검출용 박막 배양 디바이스의 제조
- [0205] 실리콘 감압성 접착제 (미국 미네소타주 세인트 폴 소재의 쓰리엠 컴퍼니로부터 입수가 가능한 쓰리엠™ 어드밴스드 폴리올레핀 다이아그노스틱 테이프 카탈로그 번호 9795R)를 갖는 감압성 접착제 코팅된 폴리올레핀 필름을 사용하여 박막 배양 디바이스용의 분말 코팅된 베이스 부재를 제조하였다. 테이프는 50.8 미크론 (2-mil) 두께의 투명한 폴리올레핀 배킹 및 50.8 미크론 (2-mil) 두께의 실리콘 감압성 접착제 층, 및 백색 이형 라이너를 가졌다.
- [0206] 14.3% (모든 백분율은 중량%임)의 카제인 체장 소화물, 25.5% 고기 펩톤, 9.5% 효모 추출물, 43.4% 텍스트로스, 6% 펩티카아제, 1% 시트르산 암모늄 제2철, 0.3% 염화칼슘, 및 pH를 약 7로 조정하기 위한 충분한 탄산나트륨을 함유하는 분말을 완전히 혼합해서 분말 영양분 조성물을 제조하였다. 1:1 중량비로 잔탄 고무 분말과 쥐엄나무 고무 분말 (둘다 미국 캘리포니아주 가데나(Gardena, CA) 소재의 스펙트럼 케미칼 엔에프지. 코프(Spectrum Chemical Mfg. Corp)로부터 입수가 가능함)을 혼합해서 겔화 분말 조성물을 제조하였다. 충분한 실리카 (카봇 코프.(Cabot Corp.) (미국 메사추세츠주 빌레리카(Billerica, MA) 소재)로부터 입수가 가능한 캅-오-실 M5)를 첨가해서 유동을 증진시키고 클립핑을 방지하였다. 양은 약 0.5 중량% 미만이다. 영양분 조성물을 겔화 분말 조성물과 1:4 중량비로 혼합하였다. 과량의 혼합된 분말 조성물을 테이프의 접착제 코팅된 면 상으로 뿌려서 베이스 부재를 제조하였다. 시트를 기울이고 손으로 가볍게 쳐서 과량의 분말을 제거하였다.
- [0207] 500 g의 잔탄 고무 분말 (미국 캘리포니아주 가데나 소재의 스펙트럼 케미칼 메뉴팩처링 코프.(Spectrum Chemical Manufacturing Corp.)로부터 입수된 NF 등급 잔탄 고무) 및 500 g의 쥐엄나무 고무 (미국 캘리포니아

주 가테나 소재의 스펙트럼 케미칼 메뉴팩처링 코프.로부터 입수된 FCC 등급 쥐엄나무 고무)를 약 2.9 g의 실리카 (캡-오-실 M5)와 함께 혼합하여 분말 겔화 조성물을 제조하였다. 분말 조성물을 투명한 접착제 코팅된 테이프 (쓰리엠™ 어드밴스드 폴리올레핀 다이아그노스틱 테이프 카탈로그 번호 9795R) 상으로 뿌리고 시트를 기울이고 손으로 가볍게 쳐서 과량의 분말을 제거함으로써, 커버 시트를 제조하였다.

[0208] 7.6 cm (3 인치) x 9.5 cm (3.75 인치)의 크기의 직사각형 플레이트 디바이스를 코팅된 시트로부터 절단해서 베이스 부재를 형성하였고, 코팅된 필름으로부터 절단해서 커버 필름을 형성하였다. 코팅된 베이스 플레이트의 한 쪽 말단 상에 이중 코팅된 감압성 접착제 테이프의 줄을 부착시키고, 커버 시트의 한 쪽 말단을 거기에 부착시켜서 코팅된 면이 서로 마주보게 하고, 테이프가 커버 시트를 도 1의 베이스 부재에 고정되도록 힌지로서 기능하게 해서, 박막 배양 디바이스를 조립하였다.

[0209] 실시예 2

[0210] 효기성 박테리아 검출용 박막 배양 플레이트의 제조

[0211] 베이스 부재용 영양분 조성물을 22.8 부의 카제인의 추출 소화물, 15.9 부의 효모 추출물, 45.5 부의 소듐 피루베이트, 4.1 부의 텍스트로스, 9.0 부의 이염기성 인산칼륨, 및 2.8 g의 일염기성 인산칼륨을 완전히 혼합해서 제조하는 점을 제외하고는, 박막 배양 디바이스를 실시예 1의 절차에 따라 제조하였다. 클럼핑을 방지하고 유동을 증진시키기 위해 (약 .5% 미만), 구아 고무 (M150 구아 메이프로가트 고무, 메이홀 케미칼 아게)를 충분한 양의 실리카 (캡-오-실 M5실리카)와 혼합해서 분말 겔화 조성물을 제조하였다.

[0212] 클럼핑을 방지하기 위해 분말 겔화제 조성물을 잔탄 고무 분말 (스펙트럼 케미칼 엠에프지. 코프. (미국 캘리포니아주 가테나 소재)로부터 입수됨) 쥐엄나무 고무 분말 (스펙트럼 케미칼 엠에프지. 코프. (미국 캘리포니아주 가테나 소재)로부터 입수됨)을 실리카와 함께 1:1 중량비로 혼합하여 제조하는 점을 제외하고는, 커버 시트를 실시예 1의 절차에 따라 제조하였다.

[0213] 실시예 3

[0214] 효모 및 곰팡이용 박막 배양 디바이스의 시험

[0215] 곰팡이 (사상균)인 파에실로마이세스 종 (쓰리엠 배양 명칭 M-10)을, 병에 있는 99 mL 버터필즈 인산염 희석제 (엣지 바이올로지칼스(Edge Biologicals) (미국 테네시주 멤피스(Memphis, TN) 소재)로부터 입수된 BPD) 내에서 하나의 동결건조된 곰팡이 펠렛 (마이크로바이올로지스(Microbiologics) (미국 미네소타주 세인트 클라우드(St. Cloud, MN) 소재)로부터 입수됨)을 무균 위치시키고, 병을 진탕하고, 혼합물이 실온 (약 23°C)에서 30 분 동안 있게 놔두어서, 조장(propagate)하였다. 현탁액을 다시 진탕시켰고, 2 mL을 99 mL의 BPD가 든 제2 병에 옮기고 진탕하였다. 제2 현탁액 중 1 mL을 실시예 1의 박막 배양 디바이스 상으로 그리고 또한 대조군 디바이스 (쓰리엠 컴퍼니 (미국 미네소타주 세인트 폴 소재)로부터 입수된 쓰리엠 페트리필름 효모 & 곰팡이 계수 플레이트)) 상으로 제조업자의 지침에 따라 접종하였다.

[0216] 접종된 디바이스를 하기와 같이 인큐베이션 및 이미지 형성 시스템을 사용하여 25°C에서 동시에 인큐베이션시켰다. 시스템은 온도 제어기 (TE 테크놀로지, 인크.(TE Technology, Inc.) (미국 마이애미주 트래버스버시티(Traverse City, MI) 소재)로부터 입수된 제품 번호 TC-36-25-RS232)에 커플링된 플랫폼, 2 개의 조명 가이드 (스코트 노스 아메리카, 인크.(Schott North America, Inc.) (미국 메사추세츠주 사우쓰브릿지(Southbridge, MA) 소재)로부터 입수가 가능한 스킵트(Schott) A08975)에 커플링된 조명원 (레이카 마이크로시스템즈 게엠베하(Leica Microsystems GmbH) (독일 베츨라(Wetzlar, Germany) 소재)로부터 입수가 가능한 레이카(Leica) KL2500LCD 3000 디그리즈(degrees) K), 및 카메라 (니콘 쿨픽스(NIKON Coolpix) 8400)를 갖는 인큐베이션 시스템을 포함하였다. 카메라를 플랫폼 위 약 35.6 cm (14 인치)쯤에 위치시켜서, 박막 배양 디바이스의 인큐베이션 동안에 60 분 간격으로 이미지를 취하였다. 가열 플랫폼 상의 반짝거리는 알루미늄 플레이트 상에 나란히 위치한 2 개의 디바이스를 인큐베이션시켰고 동시에 이미지화하였다. 2 개의 조명 가이드를, 플랫폼에 대해 약 45 도 각도로, 그리고 디바이스의 상부 표면 상으로의 각도에서 직사광에 대해 반대 면으로부터 약 20.3 cm (8 인치) 떨어지도록 위치시켰다. 대안적으로, 알루미늄 플레이트 대신에, 거울이나 비퀴티™ 강화 경면 반사기 (쓰리엠 컴퍼니 (미국 미네소타주 세인트 폴 소재)로부터 입수가 가능함)와 같은 거울 필름을 사용할 수 있다. 일련의 고정된 일시적인 (고정된 60 분의 자동 수득 간격(fixed 60 minute automatic acquisition interval)) 이미지를 56 시간의 인큐베이션 기간 동안에 플레이트에서 취하였다. 이미지는 대조군 디바이스 옆의 실시예 1의 디바이스 옆고 둘다에 동일한 배양물을 접종하였다.

[0217] 실시예 1의 디바이스 상에서의 검출을 위한 경과 시간은, 투명 구역 도 4a 및 4b에 의해 나타나는 바와 같이 디

바이스를 통한 광 산란을 관찰하고 산란 변화가 검출된 최초의 시간을 기록함으로써 측정하였다. 대조군 디바이스에 대한 경과 시간은, 변화가 검출된 최초의 시간에서 디바이스 내 지시제의 색상 변화를 관찰함으로써 측정하였다. 실시예 1과 대조군의 디바이스 상에서의 파에실로마이세스 종에 대한 이미지를 관찰한 것을 표 2에 나타낸다. 관찰은, 접종 시부터 경과된 시간에서 이미지의 시각적 변화를 기록한다. 시각적 인지 역치가 콜로니 형성 단위(CFU)를 규명하는 데 도달되는 최초 시간이 인큐베이션 기간을 통틀어서 계속되는 변화와 더불어 기록된다. 모든 플레이트에 대한 최초 검출을 위한 경과 시간은 표 3에 요약된다.

[0218] 효모인 사카로마이세스 세레비시에 (마이크로바이올로지 (미국 미네소타주 세인트 클라우드 소재)으로부터 입수됨)를 상기 기술된 동일한 제조 방법을 사용해 실시예 1로부터 디바이스 상에서 시험하였고 대조군과 함께 시험하였다. 결과가 표 3에 요약되어 있다.

[0219] [표 2]

파에실로마이세스 종의 경과 시간 관찰

경과 시간	관찰	
	실시예 1	대조군
32 시간	관찰가능한 변화가 없음; 플레이트 상에 작은 방울이 균일한 장(field) - 도 3	관찰가능한 변화가 없음
34 시간	곰팡이는 CFU 가시적 인식 역치에 있음 - 도 4a 및 4b	관찰가능한 변화가 없음
36 시간	CFU 형태 취하는 형; 국소적인 방울의 크기가 작아지기 시작함 - 도 5a 및 5b	관찰가능한 변화가 없음
56 시간	대조군 플레이트의 지시제 영역보다 훨씬 더 크고 예리하게 한정된 곰팡이 CFU 형태; 방울의 크기가 감소하고 그런 다음 투명해짐 - 도 5 및 5b	청색-녹색 색상의 지시제의 시각적 인식 역치에서의 CFU.
76 시간*	플레이트 상에서 보여지는 1 개의 콜로니; 대조군 플레이트 상의 지시제 영역보다 더 큰 콜로니	가시적인 4 개의 콜로니

*접종물 군집(population)은 내부적으로 낮게 유지되어서 콜로니의 수는 이 시험에서 유의한 수로서 여겨지지 않았음.

[0220]

[0221] [표 3]

효모 및 곰팡이 플레이트 상에서의 검출까지의 초기 경과 시간

유기체	경과 시간 실시예 1	경과 시간 대조군	시간 차
파에실로마이세스 종	33 시간	55 시간	23 시간 (42%)
사카로마이세스 세레비시에(Saccharomyces cerevisiae)	23 시간	45 시간	22 시간 (49%)

[0222]

[0223] 실시예 4

[0224] 호기성 박테리아용 박막 배양 디바이스의 시험

[0225] 사용된 대조군 플레이트는 쓰리엠 컴퍼니 (미국 미네소타주 세인트 폴)에서 입수된 쓰리엠 페트리필름 호기성 계수 플레이트였다.

[0226] 미국 타입 컬처 컬렉션 (미국 버지니아주 마나쓰(Manassas, VA) 소재)으로부터 취득된 2 개의 박테리아 유기체를 사용하여 실시예 1 및 대조군의 배양 디바이스를 평가하였다. 유기체는 에스케리키아 콜라이 (ATCC 51813) 및 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus) (ATCC 25923)였다.

[0227] 박테리아 배양물을 트라이픽 쏘이 브로쓰 (미국 켄자스주 레넥사(Lenexa KS) 소재의 레멜(Remel)로부터 입수가 가능한 TSB) 내로 순수한 배양물을 접종해서 제조하였고, 35°C에서 21 시간 동안 정적인 상태로 인큐베이션시켰다. 1 개의 루프 (약 5 마이크로리터)를 신선한 TSB에 옮기고, 35°C에서 21 시간 동안 정적인 상태로 인큐베이션시켰다. 처음 희석 시, 10 마이크로리터의 와동된 배양물을 샘플 병에 있는 99 mL의 버터필

즈 인산염 회석제 (엡지 바이알리지칼즈 (미국 테네시주 멤피스 소재)로부터 입수가능한 BPD) 내로 파이펫팅하였고, 진탕시켜 혼합하였다. 제2 회석 시, 제1 회석물로부터의 30 마이크로리터를 99 mL의 BPD에 첨가하였고, 진탕시켜 혼합하였다. 약 10 콜로니 형성 단위(CFU)를 함유하는 제2 회석물 중 1 mL을 사용하여 제조업자의 지침에 따라 쓰리엠 페트리필름 호기성 계수 플레이트에 접종하였다. 1 mL을 사용하여 동일한 방식으로 실시예 1의 디바이스에 접종하였다. 접종된 플레이트를 35°C에서 48 시간 동안 인큐베이션시켰고, 실시예 3에서 기술된 방법과 시스템을 사용해 이미지화하였다. 30 분 간격으로 이미지를 취하였다. 제1 CFU를 관찰하기 위한 경과 시간은 표 4에 요약된다.

[0228] [표 4]

유기체	경과 시간 실시예 1	경과 시간 대조군	시간 차
에스케리키아 콜라이	7.5 시간	16.5 시간	9 시간 (55%)
스타필로코커스 아우레우스	8 시간	12.5 시간	4.5 시간 (36%)

[0229]

[0230] 실시예 5

[0231] 검출을 증대시키기 위한, 대조 층의 사용

[0232] 배양 디바이스는 실시예 2의 방법에 따라 제조하였고, 에스케리키아 콜라이 (ATCC 51813)를 사용하여 실시예 4의 방법에 따라 시험하였다. 대조군 디바이스를 또한 제조하고 시험하였다. 배양 디바이스를 35°C에서 48 시간 동안 인큐베이션시켰다. 이. 콜라이가 있는 실시예 2의 디바이스를 반사기 (비퀴티™ 강화 경면 반사기) 상에 두었다. 콜로니는, 디바이스가 반사기 상에서 관찰될 때 맨눈으로 더욱 뚜렷하게 감지가능하였다. 반사기 배경은 증대된 대조때문에 CFU 형태를 더 보기 쉽게 하였다. 방울이 있는 구역과 방울이 없는 구역 사이에 더 양호한 대조가 또한 존재하였다. 대조군에서 사용될 때 황색 그리드라인(gridline)으로 인쇄된 백색 종이는 배양 디바이스의 하부 면과 반사기 사이에 놓였다. 형태의 변화와 방울 제거는 종이를 이용한 경우 보기가 덜하였다.

[0233] 대조군의 커버 필름을 조심스럽게 들었고, 비퀴티™ 강화 경면 반사기의 한 조각을 삽입해서 그 조각이 접종된 구역의 약 1/3을 덮도록 하였다. 지시제로부터의 적색 콜로니는 삽입되는 반사기를 이용해서 방울 상에서 패가시적이었다. 반사기는 방울 제거 구역의 가시성을 증대시켰다.

[0234] 실시예 6

[0235] 개질된 구아 고무가 있는 박막 배양 디바이스

[0236] 사용된 고무가 개질된 구아 분말 (로디아(Rhodia)에서 입수된 재규어(Jaguar) C162)인 점을 제외하고는, 실시예 2의 방법에 따라 박막 배양 디바이스를 제조하였다.

[0237] 실시예 7

[0238] 필름 및 배양 디바이스의 탁도, 투명도, 및 투과율 특성

[0239] 박막 배양 디바이스 및 구성 부품을 광학 특성 - 광 투과율, 탁도, 및 투명도에 대해 측정하였다. % 탁도는 광산란의 양의 지표이고, 인큐베이션 동안에 CFU 형태의 변화를 관찰하는 것이 얼마나 쉬운지의 지표이다. 탁도, 투명도 및 투과율의 측정은 제조업자의 지시에 따라 그리고 광 측정 장비 (미국 메릴랜드주 컬럼비아(Columbia, MD) 소재의 비와이케이-가드너 USA로부터 입수가능한 비와이케이 가드너 탁도-가드 플러스(BYK Gardner Hazegard plus), 카탈로그 번호 4725, 시리얼 번호 102485)를 사용해 ASTM 1003에 따라 투과 모드로 측정하였다. 장비를 위한 기준선은 시험 하에 디바이스 없이, 즉 샘플 내 테이프 또는 박막 배양 디바이스 등이 없이 구축하였는데, 결과는 예상되는 바와 같이 0% 탁도, 100% 투명도, 및 100% 투과율이었다.

[0240] 광학 특성은 표 9에서 나타난다. 그래프 상의 각 지점은 4 회 또는 5 회의 관독의 평균을 나타낸다. 샘플 1은 광 검출기 구(sphere)와 마주하는 분말 면을 이용해 시험되는 쓰리엠 페트리필름 호기성 계수 플레이트 (AC 플레이트)로부터 건조 분말 코팅된 커버 시트였다. 샘플 2는 완충제가 접종된 AC 플레이트로부터의 2 개의 커버 시트였다. 샘플 3은 AC 플레이트로부터의 접착제가 없는 이축 배향된 폴리프로필렌 (BOPP) 필름이었다. 샘플 4는 AC 플레이트로부터의 접착제가 있는 BOPP 필름이었다. 샘플 5는 쓰리엠™ 어드밴스드 폴리올레핀 다이어그

노스틱 테이프 카탈로그 번호 9795R이었다. 샘플 6은 실시예 2로부터의 커버 시트가 커플링되고 액체 희석제가 집중된 베이스 부재였다. 샘플 7은 액체 희석제가 집중된 실시예 6의 디바이스였다.

[0241] 라이너가 없는 샘플 5는 94.5%의 평균 광 투과율, 8.8%의 탁도, 및 95.8%의 투명도를 가졌다. 집중 후 박막 배양 디바이스인 샘플 6은 91.9%의 광 투과율, 34.7%의 탁도, 및 66%의 투명도를 가졌다.

[0242] 실시예 8

[0243] 성분의 멸균화

[0244] 실시예 1 및 2의 커버 시트용 분말을 에틸렌 옥사이드 가스로 처리해서 멸균시킨 다음, 임의의 잔여 에틸렌 옥사이드 가스를 제거하기 위해 통기시키고 그런 다음 코팅시킨다.

[0245] 실시예 9

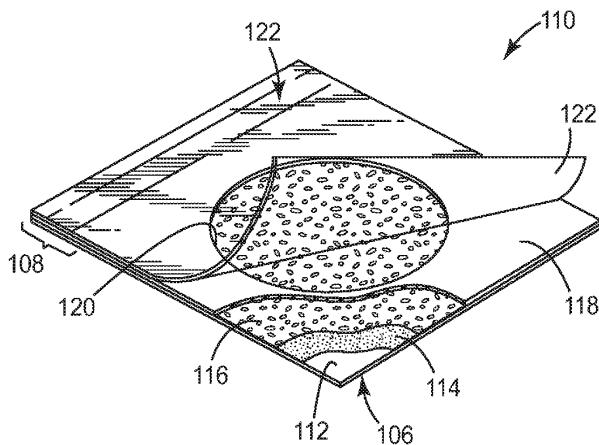
[0246] 박막 배양 디바이스의 멸균화

[0247] 실시예 1 및 2의 박막 배양 디바이스를 밀폐된 챔버 내의 에틸렌 옥사이드 분위기에 두고, 멸균시킨다.

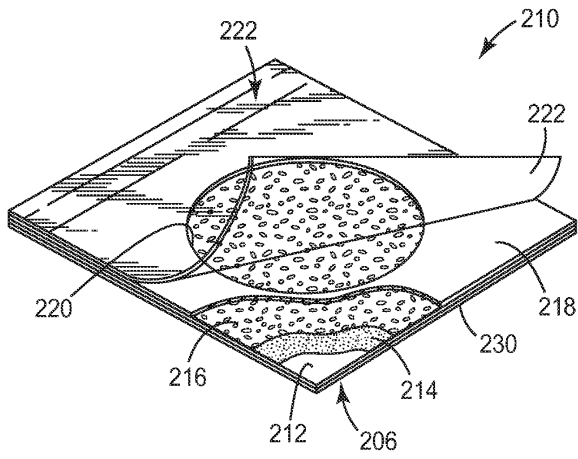
[0248] 권한이 부여된 설명을 할 수 있는 발명자가 예견한 몇몇 특정 실시 양태들을 참고로 하여 본 발명이 이제까지 설명되었다. 그럼에도 불구하고, 현재 예견되지 않은 변경을 비롯한 본 발명의 가상의 변경이 본 발명에 대한 등가물을 구성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 범주는 본 명세서에 기재된 상세 내용 및 구조에 의해 제한되어서는 아니되며, 오히려 하기 특허청구범위 및 그 등가물에 의해서만 제한되어야 한다.

도면

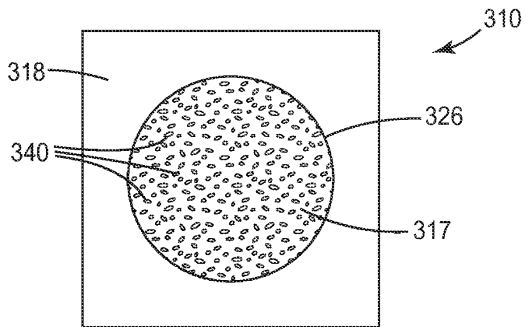
도면1



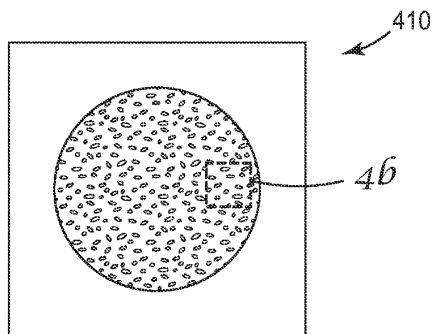
도면2



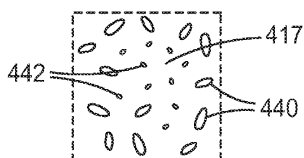
도면3



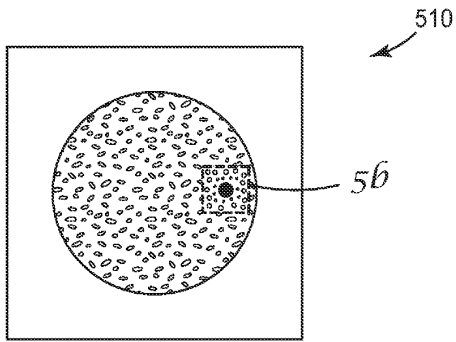
도면4a



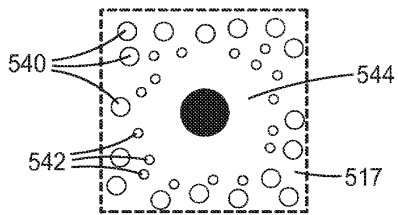
도면4b



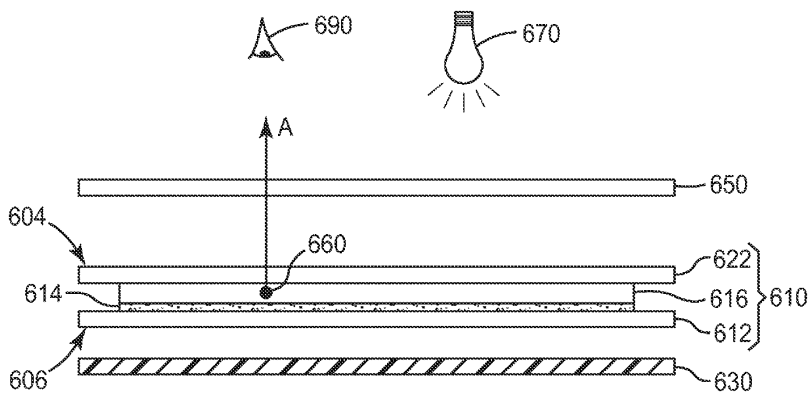
도면5a



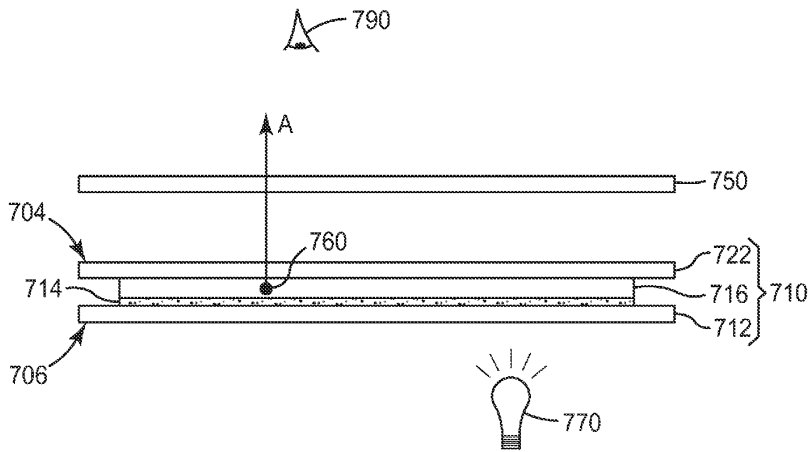
도면5b



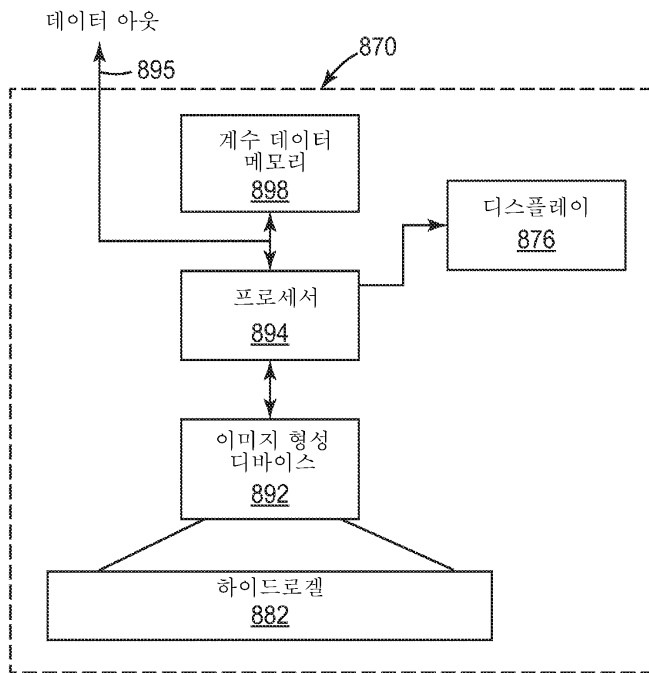
도면6



도면7



도면8



도면9

