



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 33 366 T2 2006.01.26

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 973 863 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 33 366.3

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US97/14134

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 935 341.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 98/045406

(86) PCT-Anmeldetag: 08.08.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 15.10.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 26.01.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.05.2005

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 26.01.2006

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12M 1/20 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

838397 09.04.1997 US

(73) Patentinhaber:

Minnesota Mining and Mfg. Co., St. Paul, Minn., US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(72) Erfinder:

WILLIAMS, G., Michael, Saint Paul, US;  
HALVERSON, J., Kurt, Saint Paul, US;  
KREJCAREK, E., Gary, Saint Paul, US; WEI,  
Ai-Ping, Saint Paul, US; BERG, G., James, Saint  
Paul, US; WICKERT, D., Peter, Saint Paul, US;  
CALHOUN, D., Clyde, Saint Paul, US; DEBE, K.,  
Mark, Saint Paul, US; QIU, Jun, Saint Paul, US

(54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNGEN ZUR UNTERTEILUNG BIOLOGISCHER PROBENFLÜSSIGKEITEN IN MIKROFLÜSSIGKEITSMENGEN

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Diese Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Aufteilung von biologischen Proben in Mikrovolumenanteile, basierend auf der Tendenz wässriger Proben, in den hydrophilen Zonen der Vorrichtungen zurückgehalten zu werden, während sie von den hydrophoben Zonen der Vorrichtungen im wesentlichen abgestoßen werden.

**[0002]** Die Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen wird in vielen Umfeldern durchgeführt, darunter in der nahrungsmittelverarbeitenden Industrie (Testen auf Verunreinigung von Nahrungsmitteln durch Mikroorganismen wie *E. coli* und *S. aureus*), das Gesundheitswesen (Testen von Proben von Patienten oder sonstigen klinischen Proben auf Infektion oder Kontamination), die Umweltanalytik, die pharmazeutische Industrie und die kosmetische Industrie).

**[0003]** Auf dem Wachstum basierende Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen wird im allgemeinen durchgeführt, indem entweder flüssige Nährstofflösungen (Analyse der wahrscheinlichsten Anzahl, most probable number(MPN)) oder halbfeste Nährstoffböden (Agar-Petrischalen) verwendet werden. Auszählung mit der flüssig-MPN-Methode wird üblicherweise erreicht, indem 10-fache Verdünnungsreihen einer betrachteten Probe in Sätze von gleichen Reagenzgläsern mit selektiven Nährmedien und chemischen Indikatoren eingebracht werden. Die Reagenzgläser werden bei erhöhter Temperatur bebrütet (24 – 48 Stunden), und danach auf Wachstum von Organismen untersucht.

**[0004]** Eine auf der Anzahl von positiven und negativen Reagenzgläsern in jedem Satz beruhende statistische Formel wird verwendet, um die Anzahl der in der ursprünglichen Probe vorhandenen Organismen zu schätzen.

**[0005]** Dieses Verfahren, die MPN-Analyse durchzuführen, hat mehrere Nachteile. Es ist arbeitsaufwendig wegen der mehrfachen Verdünnungs- und Pipettierschritte, die für die Durchführung der Analyse nötig sind. Zusätzlich ist es in der Praxis nur durchführbar, Sätze von drei bis fünf Reagenzgläsern für jede Verdünnung zu verwenden. Das führt dazu, dass die 95% Vertrauensgrenzen für eine MPN-Schätzung der Mikrobenkonzentration extrem weit sind. Zum Beispiel hat eine auf drei Reagenzgläsern basierende MPN-Schätzung von 20 95%-Vertrauensgrenzen von 7 bis 89.

**[0006]** Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Verfahren kann eine direkte Zählung der lebenden Mikroorganismen in einer Probe erhalten werden, indem die Probe unter Verwendung eines Nährmediums, das ein Geliermittel enthält, auf einer definierten Fläche ausgestrichen wird. Das Geliermittel (Agar) verhindert die Diffusion der Organismen während dem Bebrüten (24–48 Stunden), so dass in dem Bereich, in dem der ursprüngliche Organismus aufgebracht wurde, eine Kolonie entsteht. Es gibt allerdings eine Grenze der Anzahl von Kolonien, die auf eine gegebene Fläche von Nährmedium passen, bevor das Zusammenwachsen mit benachbarten Kolonien das Zählen schwierig macht. Das macht es meist nötig, verschiedene Verdünnungen jeder Probe durchzuführen. Zusätzlich sind die Klassen von chemischen Indikatormolekülen, die zur Identifikation individueller Typen von Mikroorganismen, die in einer gemischten Population vorliegen, verwendet werden können auf solche beschränkt, die ein Produkt erzeugen, das in dem gelierten Nährmedium unlöslich ist.

**[0007]** Zusätzlich zu diesen Nachteilen erfordern sowohl die derzeit verwendete MPN-Analyse als auch Gel-basierende Systeme eine relativ lange Bebrütungszeit, bevor ein positives Signal erfasst werden kann.

**[0008]** DE-A-37 32 142 bezieht sich auf ein Herstellungsverfahren eines Glaselements mit einer Maske und einen Stempel zur Durchführung des Herstellungsverfahrens. Insbesondere werden mittels hydrophoben Bereichen des Stempels hydrophile Bereiche erzeugt.

**[0009]** US-Patentschrift 5,229,163 betrifft eine Mikrotiter-Platte, die eine Vielzahl von Reaktionsmulden zur Durchführung von immunogenen Reaktionen enthält. Der Boden der Reaktionsmulde hat eine innere Oberfläche, die im wesentlichen hydrophil ist, und eine Seitenwand der Reaktionsmulde hat eine innere Oberfläche, die im wesentlichen hydrophob ist.

**[0010]** GB-A-2 106 539 offenbart einen Teststreifen für die Auszählung der wahrscheinlichsten Bakterienanzahl von Mikroorganismen in Flüssigkeiten oder Suspensionen, wobei eine biologische Probe in Volumen von einmal 50 ml, fünfmal 10 ml und fünfmal 1 ml aufgeteilt werden kann.

**[0011]** Die Erfindung basiert auf der Entdeckung, dass biologische Flüssigkeitsproben mit nur minimaler Ma-

nipulation durch Personal in diskrete Mikrovolumen aufgeteilt werden können. Das Aufteilungsverfahren verwendet Vorrichtungen, die hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen haben, die von hydrophoben trockenbleibenden Flächen umgeben sind. Das Verfahren und die Vorrichtungen stellen ein System zur Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen und anderen biologischen Materialien bereit, das die mit den derzeit verwendeten Systemen zusammenhängenden Probleme löst. Das System ist ein flüssigkeitsbasiertes System, das die effiziente und wirksame Aufteilung der Probe in diskrete Mikrovolumen zum Testen erlaubt, und eine schnelle Erfassung und Auszählung erlaubt.

**[0012]** Im Fall der MPN-Analyse für die Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen erlauben die hier beschriebenen Vorgehensweisen die Verwendung von wasserlöslichen Indikatorarten, und reduzieren oder eliminieren die Notwendigkeit der bei der herkömmlichen MPN-Analyse üblicherweise benötigten mehrfachen Verdünnung.

**[0013]** Ganz allgemein ist ein Grundzug der Erfindung ein Verfahren zur Aufteilung einer wässrigen, flüssigen Probe in diskrete Mikrovolumen, das folgendes umfasst:

- a) Bereitstellen einer Vorrichtung zum kultivieren eines Mikroorganismus, wobei die Vorrichtung eine Auswerteoberfläche hat, wobei die Auswerteoberfläche flüssigkeitszurückhaltende Zonen umfasst, und eine hydrophobe trockenbleibende Fläche zwischen den Zonen, wobei jede Zone die Flüssigkeitsrückhaltekapazität eines Mikrovolumens hat; und
- b) in Kontakt bringen der flüssigen Probe mit der Auswertungsoberfläche, so dass die flüssige Probe in die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt wird.

**[0014]** Die Zonen können eine Beschichtung oder Ablagerung eines Auswertungsreagens, wie eines Nährmediums oder einer Indikatorsubstanz umfassen. Geeignete Indikatorsubstanzen umfassen ohne Einschränkung Farbindikatoren, fluoreszierende Indikatoren, lumineszierende Indikatoren und elektrochemische Indikatoren. Für die Zwecke dieser Anwendung bedeutet der Begriff "elektrochemisch" einen chemischen Indikator, der bei Reaktion mit dem Mikroorganismus den Widerstand oder die Leitfähigkeit der Probe ändert.

**[0015]** Die Zonen können eine einheitliche Größe haben, wobei jede Zone eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 0,01 bis etwa 25 Mikrolitern, vorzugsweise etwa 1 bis etwa 2 Mikrolitern hat.

**[0016]** Die Kulturvorrichtung kann zum Beispiel etwa 10 bis etwa 10 000 hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen aufweisen, vorzugsweise etwa 400 bis etwa 600 flüssigkeitszurückhaltende Zonen.

**[0017]** Die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen können Mikrovolumenmulden umfassen, die von hydrophilen Erhöhungen umgeben sind. Alternativ dazu kann die Kulturvorrichtung trockene Flächen umfassen, die einen behandelten nanostrukturierten Film umfassen. In weiteren alternativen Ausführungsformen können die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen hydrophile Fasermaterialien umfassen, die aus der Auswertungsoberfläche hervortreten. Das Fasermaterial kann aus hydrophilen absorbierenden Scheiben oder hydrophilem, nichtgewebtem Faserschlaufenmaterial hergestellt sein.

**[0018]** In einer alternativen Ausführungsform kann die Kulturvorrichtung mehrere Sätze von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen umfassen, wobei jeder dieser Sätze Zonen von einheitlicher Größe aufweist, wobei die Sätze sich in der Flüssigkeitsrückhaltekapazität unterscheiden, und die Vorrichtung mindestens zwei Sätze von Zonen aufweist.

**[0019]** In einem anderen Aspekt ist ein Grundzug der Erfindung eine Kulturvorrichtung zum Erfassen und Auszählen eines Mikroorganismus, wobei die Vorrichtung eine Auswerteoberfläche umfasst, wobei die Auswerteoberfläche flüssigkeitszurückhaltende Zonen umfasst, und eine hydrophobe trockenbleibende Fläche zwischen den Zonen, wobei jede Zone die Flüssigkeitsrückhaltekapazität eines Mikrovolumens hat, und mindestens einige der Zonen ein Auswertungsreagens umfassen.

**[0020]** Der Begriff "Mikroorganismus", wie er hier verwendet wird, umfasst alle mikroskopischen Organismen und Zellen, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Bakterien, Mykoplasmata, Rickettsien, Spirocheten, Hefen, Schimmel, Protozoen, sowie mikroskopische Formen von eukaryotischen Zellen, zum Beispiel einzelne Zellen (kultiviert oder direkt aus einem Gewebe oder Organ erhalten) oder kleine Zellklumpen. Mikroorganismen werden nicht nur erfasst und/oder ausgezählt, wenn ganze Zellen direkt erfasst werden, sondern auch wenn solche Zellen indirekt erfasst werden, wie durch die Erfassung und Quantifizierung von Zellfragmenten, von der Zelle herrührenden biologischen Molekülen oder Nebenprodukten der Zelle.

**[0021]** Die Begriffe "hydrophob" und "hydrophil" haben hierin die im Fachgebiet allgemein verstandenen Bedeutungen. So hat ein "hydrophobes" Material eine geringe oder keine Affinität für Wasser, während ein "hydrophiles" Material eine relativ starke Affinität für Wasser oder wässrige Medien hat. Die relativen Hydrophobien oder Hydrophilien der hier beschriebenen Vorrichtung sind so, dass die Aufteilung von flüssigen Proben beim Auftragen der Probe im wesentlichen in die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen sichergestellt ist. Die nötigen Ausmaße der Hydrophobie und Hydrophilie können je nach der Art der Probe variieren, aber können leicht auf der Basis einfacher empirischer Beobachtung der flüssigen Proben beim Auftragen auf die Vorrichtung angepasst werden.

**[0022]** Andere Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung und den Figuren hervorgehen.

**[0023]** [Fig. 1](#) ist eine perspektivische Ansicht einer Ausführungsform einer Auswertungsvorrichtung.

**[0024]** [Fig. 2](#) ist eine Ansicht von oben einer Auswertungsvorrichtung, die Sätze von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen hat, die in der Flüssigkeitsrückhaltekapazität der Mikrovolumen variieren.

**[0025]** [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung einer Auswertevorrichtung, die einen hydrophoben nanosstrukturierten Film umfasst.

**[0026]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung einer Auswertungsvorrichtung, in der die hydrophilen flüssigkeitszurückweisenden Zonen aus Papierscheiben hergestellt sind.

**[0027]** [Fig. 5a](#) ist eine perspektivische Ansicht einer Auswertungsvorrichtung, in der die hydrophilen flüssigkeitszurückweisenden Zonen aus ungewebtem Faserschlaufenmaterial hergestellt sind.

**[0028]** [Fig. 5b](#) ist eine vergrößerte Ansicht von oben der in [Fig. 5a](#) dargestellten Vorrichtung.

**[0029]** [Fig. 6a](#) ist eine Photographie der Ansicht von oben einer Auswertevorrichtung, in der die Auswertungsoberfläche hydrophil ist.

**[0030]** [Fig. 6b](#) ist eine Photographie der Ansicht von oben einer Auswertevorrichtung mit hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen und hydrophoben trockenbleibenden Zonen.

**[0031]** Diese Erfindung betrifft das Aufteilen von biologischen Proben in Mikrovolumen-Probenanteile für die signalbasierende Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen in Flüssigkeitsproben.

**[0032]** Unter den Problemen, die im Fachgebiet beim Testen von flüssigen Proben auf Mikroorganismen auftreten, sind die relativ langen Bebrütungszeiten, die Notwendigkeit, mehrfache Pipettierschritte für die getesteten Teilvolumina zu unternehmen, und die Notwendigkeit eines relativ großen Probenvolumens zum Testen.

**[0033]** Die vorliegende Erfindung stellt eine Lösung für diese und andere mit dem Testen verbundene Probleme dar.

**[0034]** Es werden Verfahren und Vorrichtungen bereitgestellt, um eine flüssige Probe in Mikrovolumen-Abteilungen einer Testvorrichtung aufzuteilen, wobei nur eine minimale Manipulation der flüssigen Probe durch den Labortechniker oder anderes Personal erforderlich ist. Ein „Mikrovolumen“, wie der Begriff hier gebraucht wird, bezieht sich auf ein Volumen von weniger als etwa 25 Mikrolitern, und umfasst Volumen im Bereich von weniger als einem Mikroliter. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben entdeckt, dass die Verwendung von Mikrovolumen bei der signalbasierenden Erfassung von Mikroorganismen in flüssigen Proben zu einer merklichen Verkürzung der zum hervorrufen eines erfassbaren Signals nötigen Bebrütungszeit führt. Weil kürzere Bebrütungszeiten in diesem Bereich höchst wünschenswert sind, bietet dieses Merkmal der Erfindung einen deutlichen Vorteil.

**[0035]** Zusätzlich zum Erreichen kürzerer Bebrütungszeiten, kann die Verwendung von Mikrovolumina beim Testen von flüssigen Proben die Verwendung von erheblich kleineren Testproben erlauben. Sehr kleine Testproben sind manchmal nötig aufgrund der sehr kleinen Volumen der Probenquellen. Kleine Volumen der Testproben sind manchmal auch wünschenswert, zum Beispiel zur Erleichterung der Handhabung oder des Transports der Probe zu einer Einrichtung, die das Testen durchführt.

**[0036]** Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben eine Anzahl von neuartigen Vorrichtungen zur Aufteilung von biologischen flüssigen Proben in diskrete Mikrovolumen innerhalb von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen (auch als "flüssigkeitszurückhaltende Zonen" oder "Zonen" bezeichnet) entwickelt. Nicht einschränkende Beispiele dieser Vorrichtungen umfassen: mikrogeprägte oder gepresste Filme, die eine Vielzahl von Mikroabteilungen haben, zum Beispiel Mikrovolumen-Mulden, die als flüssigkeitszurückhaltende Zonen fungieren, wobei die Fläche zwischen den Mulden ("trockenbleibende Fläche") hydrophob ist, und die Mulden hydrophil sind; nanostrukturierte hydrophobe Filme, in denen diskrete flüssigkeitszurückhaltende Bereiche des Films hydrophil sind, und zum Zurückhalten von Mikrovolumina einer flüssigen Probe zum Testen geeignet sind; und Vorrichtungen, die hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen und hydrophobe trockenbleibende Flächen haben, wobei eine gegebene hydrophile Zone aus hydrophilem Fasermaterial hergestellt ist, und nach oben oder unten aus der Ebene der umgebenden trockenbleibenden Fläche hervorsteht.

**[0037]** Vorteilhafterweise erlauben die oben zusammengefassten Vorrichtungen das Testen von flüssigen Proben unter Verwendung von Mikrovolumenanteilen in einer einzigen Vorrichtung, wodurch die Notwendigkeit getrennter Gefäße bei solchen Tests eliminiert wird. Eine Testprobe kann auf Hunderte oder sogar Tausende von diskreten flüssigkeitszurückhaltenden Zonen aufgeteilt werden, was die Anzahl der Datenpunkte in einem Test der flüssigen Probe erheblich erhöht.

**[0038]** Eine besonders nützliche Anwendung dieser Verfahren und Vorrichtungen ist in der wachstumsbasierenden Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen in flüssigen Testproben. Solche wachstumsbasierende Erfassung und Auszählung ist sehr wichtig beim Testen von Nahrungsmittel-, Umwelt-, klinischen, pharmazeutischen, kosmetischen und anderen Proben auf Verunreinigung mit Mikroorganismen. Die Verfahren und Vorrichtungen dieser Erfindung erlauben das effiziente, akkurate, bequeme und kostengünstige Testen solcher Proben.

**[0039]** Eine bevorzugte Verwendung der Verfahren und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung für solche mikrobiologischen Tests ist bei der MPN-Analyse. Bei der traditionellen MPN-Analyse werden Verdünnungsreihen (10-fache Verdünnung) einer betrachteten Probe erstellt, und in gleicher Menge in Sätze von gleichen Reagenzgläsern mit selektiven Nährmedien und chemischen Indikatoren pipettiert. Die Reagenzgläser werden bei erhöhter Temperatur bebrütet (24 – 48 Stunden), und danach auf Wachstum von Organismen untersucht. Eine auf der Anzahl von positiven und negativen Reagenzgläsern in jedem Satz beruhende statistische Formel wird verwendet, um die Anzahl der in der ursprünglichen Probe vorhandenen Organismen zu schätzen. So wie es derzeit verwendet wird, hat dieses traditionelle Verfahren mehrere Nachteile. Es ist arbeitsaufwendig wegen der mehrfachen Verdünnungs- und Pipettierschritte, die für die Durchführung der Analyse nötig sind. In der Praxis werden üblicherweise nur Sätze von etwa drei bis fünf gleichen Reagenzgläsern für jede Verdünnung verwendet. Das führt dazu, dass die 95%-Vertrauensgrenzen für eine MPN-Schätzung der Mikrobenkonzentration mit diesem verfahren extrem weit sind. Zum Beispiel hat eine auf neun Reagenzgläsern (3 zehnfache Verdünnungen) basierende MPN-Schätzung von 20 95%-Vertrauensgrenzen von 7 bis 89.

**[0040]** Die Verwendung von Verfahren und Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung bei der MPN-Analyse überwindet mehrere der obengenannten Schwierigkeiten. Der Arbeitsaufwand ist stark reduziert, weil kein Pipettieren in die individuellen Reagenzgläser nötig ist, und wenig oder kein Schütteln, Rühren oder sonstige Manipulationen benötigt werden. Statt dessen wird die Probe auf die Mikrovolumen der flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt, indem einfach die flüssige Probe mit der Vorrichtung in Kontakt gebracht wird. Zusätzlich sind weniger Verdünnungen der Probe nötig, wenn große Anzahlen von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen auf der Vorrichtung vorliegen. Die relativ große Anzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen bietet auch eine genauere Schätzung der Mikrobenkonzentration. Das liegt daran, dass die entsprechend größere Anzahl von Datenpunkten ein entsprechend engeres Vertrauensintervall bietet.

**[0041]** Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Erfassung (inklusive Auszählung) eines Mikroorganismus in einer flüssigen Testprobe bereit. Das Verfahren umfasst das Verteilen von Mikrovolumina der Testprobe auf eine Vielzahl von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen einer Auswerteoberfläche. Die Auswertevorrichtung kann jede Vorrichtung sein, die eine Auswerteoberfläche umfasst, die eine Vielzahl von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen aufweist, wobei jede Zone die Flüssigkeitsrückhaltekapazität eines Mikrovolumens hat. Die Vorrichtung umfasst auch trockenbleibende Flächen zwischen den Zonen, die hydrophob sind und im wesentlichen flüssigkeitsfrei bleiben, nachdem die biologische Probe in die flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt worden ist. Nicht einschränkende Beispiele solcher Auswertevorrichtungen umfassen die hierin Beschriebenen.

**[0042]** Die flüssigkeitszurückhaltenden Zonen in der Auswertevorrichtung sind vorzugsweise von einheitli-

cher Größe, und jede Zone hat eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 0,01 bis 25 Mikrolitern der flüssigen Probe. Vorzugsweise hat jede Zone eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 0,1 bis etwa 10 Mikrolitern, und insbesondere von etwa 1 bis etwa 2 Mikrolitern. Die Auswertevorrichtung umfasst vorzugsweise zwischen 1 und etwa 100 000 flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, insbesondere etwa 10 bis etwa 10 000 Zonen, insbesondere etwa 200 bis etwa 5000 Zonen, und insbesondere etwa 400 bis etwa 600 Zonen.

**[0043]** Die Verwendung einer Vorrichtung mit 400 bis etwa 600 hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen ist im Zusammenhang mit dem Testen einer Flüssigkeitsprobe auf Mikroorganismenkonzentration unter Verwendung der MPN-Analyse besonders nützlich. Bestimmte gesetzliche Anforderungen können es nötig machen, dass ein Testverfahren fähig sein muss, einen Mikroorganismus in einer Probe von ein bis fünf Millilitern zu erfassen. Diese Probengröße ist Standard für mikrobiologisches Testen in der nahrungsmittelverarbeitenden Industrie. So wäre zum Beispiel eine Auswerteoberfläche mit 500 hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, wobei jede Zone eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 2 Mikrolitern hat, sehr nützlich für das Testen einer 1-ml-Probe. Eine flüssigkeitszurückhaltende Zone mit einer Kapazität von 2 Mikrolitern erlaubt die rasche Entwicklung eines erfassbaren Signals gemäß der Erfindung, und die Verwendung von etwa 400 bis etwa 600 Zonen stellt eine genügend große Anzahl von Datenpunkten bereit, um das Vertrauensintervall für eine MPN-Berechnung wesentlich zu verbessern. Zusätzlich ist es machbar, eine manuelle Auszählung der flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, die ein positives Testergebnis für den Mikroorganismus aufweisen, durchzuführen. Die Verwendung von Vorrichtungen, die wesentlich mehr als 400 flüssigkeitszurückhaltende Zonen umfassen, kann aus praktischen Gründen das instrumentenunterstützte oder automatische Auszählen erfordern.

**[0044]** Die flüssige Testprobe kann jede interessierende Probe sein, aus jeder Quelle. Die Probe kann direkt auf die Vielzahl der flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt werden, oder die Probe kann vor der Verteilung auf die Zonen verdünnt werden. Die Entscheidung, ob eine Verdünnung der Probe nötig ist, wird von einer Vielzahl von Faktoren wie der Probenquelle und dem Alter abhängen, und eine solche Entscheidung ist eine Routinefrage für Fachleute.

**[0045]** Die flüssige Testprobe kann selektive Nährmedien für die untersuchten Mikroorganismen enthalten, und/oder eine Indikatorsubstanz, die in Gegenwart von wachsenden Mikroorganismen ein Signal erzeugt. Wahlweise kann das Nährmedium ein Geliermittel enthalten, das beim "Verkapseln" der wachsenden Mikroorganismen hilft. Solche Geliermittel sind Fachleuten bekannt und umfassen jedes wasserabsorbierende Material, das bei Zugabe einer wässrigen Flüssigkeit zu einem Gel wird.

**[0046]** Alternativ dazu können das selektive Nährmedium und/oder die Indikatorsubstanz als Beschichtung oder sonstige Ablagerung in einer flüssigkeitszurückhaltenden Zone anwesend sein, in genügender Menge, um die gewünschten Konzentrationen zu erhalten, wenn ein Mikrovolumen der flüssigen Testprobe in die Zone verteilt wird. So eine Beschichtung kann zum Beispiel erreicht werden, indem eine Lösung des Nährmediums (mit oder ohne Geliermittel) und/oder der Indikatorsubstanz in die flüssigkeitszurückhaltende Zone eingebracht oder verteilt wird, und die Lösung getrocknet wird, um eine Beschichtung oder Ablagerung des Nährmediums und/oder der Indikatorsubstanz in der Zone herzustellen.

**[0047]** Eine große Bandbreite von selektiven Nährmedien für eine große Bandbreite von interessierenden Mikroorganismen ist bekannt, wie auch eine große Bandbreite von Indikatorsubstanzen für eine große Bandbreite von Mikroorganismen, und jede(s) dieser Nährmedien oder Indikatorsubstanzen ist für die Verwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet. Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass lösliche Indikatoren verwendet werden können, da die Diffusion durch das Einschließen der wässrigen biologischen Probenflüssigkeit in den hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verhindert wird.

**[0048]** Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um eine flüssige Testprobe auf die flüssigkeitszurückhaltenden Zonen zu verteilen. Mehr als ein Verfahren kann für eine spezielle Vorrichtung anwendbar sein, obwohl das bevorzugte Verfahren in einem gewissen Umfang von der Konfiguration einer speziellen Auswertevorrichtung abhängig sein kann. Zum Beispiel kann bei Vorrichtungen aus Filmen, die hydrophile Mikrovolumen-Mulden enthalten, oder bei denen die Zonen hydrophiles Fasermaterial umfassen, das aus der Ebene der Auswerteoberfläche hervorsteht, die Probe über die Vorrichtung gegossen oder pipettiert werden, und die Probe auf die flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt werden, indem die Vorrichtung gekippt oder geschaukelt wird. Alternativ dazu kann die Auswerteoberfläche wie in Beispiel 4 beschrieben in die Probe eingetaucht werden. Beim Entfernen der Auswerteoberfläche aus der flüssigen Probe wird Flüssigkeit in den hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen zurückgehalten und ist desgleichen im wesentlichen von den hydrophoben trockenbleibenden Flächen ausgeschlossen.

**[0049]** Nachdem die Probe auf die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen der Auswertevorrichtung verteilt ist, können verschiedene Auswertungen durchgeführt werden, abhängig von der gewünschten Verwendung. Für die Erfassung oder das Auszählen von Mikroben kann die Auswertevorrichtung bebrütet werden, während einer genügend langen Zeit, um mindestens einen Zellteilungszyklus des Mikroorganismus zuzulassen. Für diese Zwecke wird die Vorrichtung im Allgemeinen bei etwa 25 °C bis etwa 45 °C bebrütet, vorzugsweise bei etwa 30 °C bis etwa 37 °C. Die Bebrütungszeit für die Bakterienerfassung variiert. Die Erfassungszeit für die meisten Bakterien variiert von etwa 20 Minuten bis etwa 24 Stunden, um ein messbares Wachstum zu erzeugen, das durch die Indikatorsubstanz in der bebrüteten flüssigen Testprobe angezeigt wird. Diese relativ kurze Bebrütungszeit bedeutet einen deutlichen Vorteil über die derzeit verwendeten Erfassungsverfahren, die üblicherweise Bebrütungszeiten von etwa 24 Stunden oder mehr erfordern.

**[0050]** Nach der Bebrütung der Auswertevorrichtung wird die Gegenwart oder Abwesenheit des Mikroorganismus in den flüssigkeitszurückhaltenden Zonen (und damit in der flüssigen Testprobe) erfasst. Die Art der Erfassung hängt von der Art der bei dem Verfahren verwendeten Indikatorsubstanz ab. Jede Indikatorsubstanz, die fähig ist, ein erfassbares Signal bereitzustellen, kann verwendet werden. Solche Indikatorsubstanzen umfassen, aber sind nicht beschränkt auf Farbindikatoren, fluoreszierende Indikatoren, lumineszierende Indikatoren und elektrochemische Indikatoren. Die Gegenwart oder Abwesenheit von Mikroorganismen in einer Zone kann visuell erfasst werden, mit dem bloßen Auge oder mikroskopisch, wenn ein Farbindikator oder ein lumineszierender Indikator verwendet wird. Wenn eine fluoreszierende Indikatorsubstanz verwendet wird, können Ausrüstung und Verfahren zur Erfassung von fluoreszierenden Signalen für die Erfassung verwendet werden. Es gibt zahlreiche Indikatorsubstanzen und Signalerfassungssysteme, inklusive Systemen zur Erfassung von elektrochemischen Veränderungen, die in Fachkreisen zur Erfassung von Mikroorganismen bekannt sind, und jede solche Substanz kann gemäss der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

**[0051]** Die Erfassung von Mikroorganismen in den flüssigen Proben kann des weiteren das Auszählen einer Mikroorganismenzahl in der flüssigen Testprobe umfassen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Auszählung unter Verwendung der MPN-Analyse durchgeführt. Wenn die Anzahl der flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, die den Mikroorganismus enthalten, bestimmt wurde, kann eine MPN-Berechnung unter Verwendung der bekannten MPN-Techniken durchgeführt werden. Wenn gewünscht, kann die Anzahl der Mikroorganismen in einer individuellen Zone dann unter Verwendung bekannter Techniken bestimmt werden, zum Beispiel, die Signalintensität im Vergleich zu einem bekannten Standard, oder durch Plattenbestimmung des Inhalts der Zone. Vorteilhafterweise erlaubt die große Anzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen in dem Verfahren der Erfindung engere Intervalle der 95%-Vertrauengrenzen bei einer MPN-Analyse einer flüssigen Testprobe.

**[0052]** Aufgrund der großen Anzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, die in einer einzigen Vorrichtung hergestellt werden können, ist es möglich, eine einzige Vorrichtung für die Erfassung und Auszählung verschiedener interessierender Mikroorganismen zu verwenden, wobei die Vorteile der Erfindung beibehalten werden. Zum Beispiel kann eine einzige flüssige Testprobe auf die Gegenwart oder Konzentration von *E. coli* und *S. aureus* getestet werden. Ein Teil der Auswertevorrichtung kann hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen für die Erfassung und Auszählung eines dieser Mikroorganismen enthalten, während ein zweiter Satz von Zonen auf die Erfassung und Auswertung eines anderen interessierenden Mikroorganismus ausgerichtet sein kann. Dies wird erreicht, indem zum Beispiel für die Mikroorganismen spezifische Nährmedien und/oder Indikatorsubstanzen in den jeweiligen Sätzen von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen eingeschlossen werden. Alternativ dazu können alle flüssigkeitszurückhaltenden Zonen Auswertereagenzien enthalten, die für die gleichzeitige Erfassung mehrerer Mikroorganismen gedacht sind. Zum Beispiel kann *E. coli* mit einer fluoreszierenden Indikatorsubstanz erfasst werden, während gleichzeitig andere Coliforme mit einer Farbindikatorsubstanz erfasst werden.

**[0053]** In einer anderen Ausführungsform kann der Verteilungsschritt die Verteilung von Teilmengen der flüssigen Testprobe auf eine Vielzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen einer Auswertevorrichtung umfassen, wobei die Auswertevorrichtung eine Vielzahl von Sätzen von Zonen umfasst. Jeder Satz hat Zonen einheitlicher Größe, und die Vorrichtung hat mindestens zwei Sätze von Zonen. Zum Beispiel kann die Auswertevorrichtung eine Vielzahl von Reihen umfassen, wobei die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen in einer gegebenen Reihe die gleichen Flüssigkeitsrückhalteigenschaften haben. Diese Eigenschaft erlaubt die Verteilung der flüssigen Testprobe in verschiedene Testprobengrößen innerhalb einer einzigen Auswertevorrichtung. Bei der MPN-Analyse gibt diese Eigenschaft einen wesentlichen Vorteil dadurch, dass bei einer hoch konzentrierten Probe eine Größe mit entsprechendem Volumen ausgewählt werden kann, und eine MPN-Analyse in einem einzigen Verteilungsschritt in einer einzigen Vorrichtung durchgeführt werden, ohne die Notwendigkeit, Verdünnungsreihen zu erstellen.

**[0054]** Wie oben erwähnt, kann das Verfahren dieser Erfindung durchgeführt werden unter Verwendung jeder Auswertevorrichtung, die hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen und hydrophobe trockenbleibende Zonen umfasst, in Abhängigkeit von der durchgeführten besonderen Ausführungsform. Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben mehrere neuartige Vorrichtungen entwickelt, die für die Verwendung mit den Verfahren dieser Erfindung geeignet sind. Es folgen nicht einschränkende Beispiele solcher Vorrichtungen.

**[0055]** Bezogen auf [Fig. 1](#) umfasst eine Vorrichtung **10** ein Substrat **12**, das eine Vielzahl von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen in Form von hydrophilen Mikrovolumenmulden **14** aufweist. Das Substrat **12** kann aus jedem Material gefertigt sein, in dem Mikrovolumenmulden geformt werden können, und in dem die Mikrovolumenmulden ihre jeweiligen Formen während der nützlichen Lebensdauer der Vorrichtung **10** beibehalten. Das Substrat **12** kann zum Beispiel aus Polymerfilmen oder anderen geeigneten Materialien hergestellt werden. Geeignete Polymere umfassen ohne Einschränkung Polyethylen, Polypropylen, Polyimide, Fluoropolymere, Polycarbonate, Polyurethane und Polystyrene. Falls ein gegebenes Polymer nicht genügend hydrophil sein sollte, kann es behandelt werden, um ihm Hydrophilie zu verleihen. Zum Beispiel kann dem Film eine oberflächenaktive Substanz beigelegt werden, um Hydrophilie zu verleihen. Fachleute werden andere Mittel erkennen, um Oberflächenhydrophilie zu verleihen. Mikrovolumenmulden **14** können mit jedem für das Substratmaterial **12** geeigneten Verfahren geformt werden. Solche Verfahren umfassen ohne Einschränkung thermisches Prägen, Gussprägen, Laserbohren, Ätzen mit reaktiven Materialien, oder Laminieren einer Folie aus gemustertem Material, das eine Vielzahl kleiner Öffnungen umfasst, auf einen Trägerfilm. Polyethylen- oder Polypropylenfilme können zum Beispiel pressgeprägt oder extrusionsgeprägt werden, und können verschiedene Pigmente oder Netzmittel umfassen.

**[0056]** Wieder unter Bezug auf [Fig. 1](#) ist die Fläche **13** zwischen den Mikrovolumenmulden **14** ("trockenbleibende Fläche") hydrophob gefertigt. Das dient dazu, zu verhindern, dass wässrige Flüssigkeit eine Brücke zwischen den Mikrovolumenmulden **14** bildet, so dass die gegenseitige Kontamination verhindert wird. Die trockenbleibende Fläche **13** kann auf verschiedene Arten hydrophob gemacht werden. Zum Beispiel kann die trockenbleibende Fläche auf einem Extrusionsgeprägten Polyethylenfilm, der durch beimischen eines Netzmittels hydrophil gemacht wurde, durch übertragen einer dünnen Schicht von acryliertem Silikon oder anderem hydrophobem Material auf die trockenbleibende Fläche hydrophob gemacht werden.

**[0057]** Die Vorrichtung **10** kann jede gewünschte Anzahl von Mikrovolumenmulden umfassen. Zusätzlich kann die Vorrichtung **10** relativ große Reservoirs oder andere Unterteilungen umfassen, die geeignet sind, größere Flüssigkeitsvolumen aufzunehmen, um eine geeignete Feuchtigkeit in der Vorrichtung aufrechtzuerhalten. Obwohl die Anzahl der Mikrovolumenmulden für bestimmte Anwendungen, wie Voruntersuchungen, relativ klein sein kann (z.B. 2–50), erlauben die kleinen Größen der Mikrovolumenmulden die Herstellung einer relativ großen Anzahl von Mulden auf einer einzigen Vorrichtung **10**. Vorzugsweise hat die Vorrichtung etwa 10 bis etwa 10 000 flüssigkeitszurückhaltende Zonen, insbesondere etwa 200 bis etwa 5000 Zonen, und insbesondere etwa 400 bis etwa 600 Zonen. Die Vorrichtung **10** kann eine Population von Mikrovolumenmulden **14** einheitlicher Größe aufweisen, obwohl die Mulden nicht eine einheitliche Größe haben müssen. Zum Beispiel kann die Vorrichtung **16**, wie sie in [Fig. 2](#) dargestellt ist, Sätze (z.B. Reihen) von Mikrovolumenmulden aufweisen, bei denen die Volumen innerhalb eines Satzes konstant sind, aber zwischen den Sätzen variieren. Wie in [Fig. 2](#) dargestellt, können die Volumen inkrementell über eine Anordnung von Sätzen von Mulden variieren, wobei die kleineren Mulden **18** Volumen von weniger als einem Mikroliter aufnehmen, und die größeren Mulden **20** Volumen im Mikroliterbereich aufnehmen. Es ist sogar möglich, dass die größten Mulden in einer Vorrichtung, wie sie in [Fig. 2](#) abgebildet ist, Mulden **22** umfassen, die nicht als "Mikrovolumen"-Mulden einzuordnen wären. Solche Mulden können eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von zum Beispiel wesentlich mehr als 25 Mikrolitern aufweisen.

**[0058]** In einer alternativen Ausführungsform kann das Substrat **12** mit einem hydrophoben nanostrukturierten Film beschichtet sein. So können zum Beispiel Polyimid- oder Fluoropolymerbahnen mit organischen Pigmenten, Blei, Gold und anderen Materialien dampfbeschichtet werden, um spezifische nanostrukturierte Filme zu erzeugen, dann durch Beschichten mit einer organisierten Molekülzusammensetzung, wie Oktadecylmercaptan oder einem Fluorkohlenstoffthiol, wie in der Patentanmeldung WO 96/34697 beschrieben hydrophob gemacht werden. Relativ hydrophile Mikrovolumenmulden und andere flüssigkeitszurückhaltende Zonen können geformt werden, indem die hydrophoben nanostrukturierten Elemente von ausgewählten Bereichen des Substrats **12** entfernt werden. Dies kann auf verschiedene Arten erreicht werden, einschließlich, aber ohne Einschränkung auf Verkapselung/Delaminierung und Laserabtragung wie unten in Beispiel 3 beschrieben.

**[0059]** Eine repräsentative Vorrichtung **24** mit einem nanostrukturierten Film ist schematisch in [Abb. 3](#) dargestellt. Solche Vorrichtungen können durch einfaches Eintauchen in eine wässrige Probelösung mit Probe be-

laden werden. Zu diesem Zweck kann die Vorrichtung **24** einen Griff **26** aufweisen. Der Griff **26** erlaubt es dem Personal, die Vorrichtung **24** auf jede gewünschte Tiefe bis inklusive dem völligen Untertauchen der Vorrichtung **24** in die Flüssigkeitsprobe einzutauchen wobei ein Kontakt der Finger des Personals mit der Probe vermieden wird. Nach dem Entfernen von Vorrichtung **24** aus der Probe verbleibt flüssige Probe nur auf den Stellen der hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Zonen **28** auf der Vorrichtung.

**[0060]** Die Bebrütung und Erfassung werden dann wie oben beschreiben durchgeführt.

**[0061]** Auswertevorrichtungen können auch mit hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Zonen hergestellt werden, die aus hydrophilen absorbierenden Materialien konstruiert sind, die auf einer hydrophoben Oberfläche angeordnet sind. Zum Beispiel können die Zonen aus absorbierenden Papieren mit runden, ovalen, vier-eckigen, mehreckigen oder sonstigen geeigneten Formen konstruiert sein. Wie in [Fig. 4](#) illustriert, können zum Beispiel Scheiben aus ungeleimtem Baumwolllinter-Papier **30** auf einen silikonbeschichteten Film **32** auflaminert werden, um die hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Bereiche zu bilden, die aus der Ebene der umgebenden hydrophoben Oberfläche **36** hervorstehen. Alternativ dazu können die hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Zonen aus ungewebtem Faserschlaufenmaterial konstruiert werden, das gleichermaßen aus der Ebene der umgebenden trockenbleibenden Fläche hervorsteht (herausragt). Zum Beispiel kann die Auswertevorrichtung **38** wie in den [Fig. 5a](#) und [Fig. 5b](#) illustriert, ein Blatt von hydrophobem Polypropylenfilm **40** umfassen, der Anordnungen von Vorsprüngen **42** umfasst, die aus netzmittelhaltigem ungewebtem Faserschlaufenmaterial hergestellt sind.

**[0062]** Auswertungsreagenzien können auf die flüssigkeitsrückhaltenden Zonen der Auswertevorrichtungen beschichtet oder auf andere Art darin abgelagert werden. Solche Auswertungsreagenzien können ohne Einschränkung Nährstoffe für das Wachstum der Mikroorganismen, Geliermittel, Indikatorsubstanzen wie Farbindikatoren, lumineszierende Indikatoren und elektrochemische Indikatoren umfassen.

**[0063]** Die Auswertungsreagenzien können in den flüssigkeitsrückhaltenden Zonen durch eins von zahlreichen den Fachleuten bekannten Verfahren zur Immobilisierung von Auswertungsreagenzien immobilisiert werden. Solche Verfahren umfassen zum Beispiel das Eintrocknen von Flüssigkeiten, die Auswertereagens enthalten in den Zonen, sowie andere Verfahren, um Biomoleküle und andere Auswertereagentien nicht kovalent mit dem festen Substrat zu verbinden. Alternativ dazu können verschiedene Verfahren verwendet werden, um Auswertereagentien mit Fachleuten wohlbekannten Techniken kovalent an das Substratmaterial **12** in den flüssigkeitsrückhaltenden Zonen **14** zu binden.

**[0064]** Wie oben besprochen erlaubt die Gegenwart von hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Zonen mit Flüssigkeitsrückhaltekapazität für Mikrovolumen die Auftrennung einer flüssigen Testprobe in eine relativ große Anzahl von Testvolumen. Die Fähigkeit, eine flüssige Probe in Mikrovolumenanteile aufzutrennen, und MPN oder andere Auswertungen ohne gegenseitige Kontamination zwischen den Teilvolumen durchzuführen, ist ein Vorteil dieses Verfahrens und dieser Vorrichtungen.

**[0065]** Besondere Ausführungsformen dieser Erfindung werden im Detail besprochen werden, und die im Rahmen der vorliegenden Erfindung möglichen Variationen ist erwähnt worden. Es gibt eine Vielzahl alternativer Techniken und Verfahren, die Fachleuten zugänglich sind, die es gleichermaßen erlauben würden, die beabsichtigte Erfindung durchzuführen

## BEISPIELE

**[0066]** Die folgenden Beispiele werden angeboten, um beim Verstehen der vorliegenden Erfindung zu helfen, und sollen nicht als Begrenzung des Anwendungsgebietes der Erfindung missverstanden werden. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich alle Teile und Prozente auf das Gewicht

### Beispiel 1

#### Kulturvorrangungen aus geprägtem Film

**[0067]** Kulturvorrangungen aus geprägtem Film, die eine Vielzahl von Mikroabteilungen aufweisen, und für die Erfassung von Mikroorganismen in einer flüssigen Testprobe verwendet werden können, wurden wie in diesem Beispiel beschrieben hergestellt.

**[0068]** Die hydrophilen flüssigkeitsrückhaltenden Zonen können in einem Substrat mit einer Anzahl von

verfahren geformt werden, Beispiele dafür sind thermisches Prägen, Gussprägen, Laserbohren und Ätzen der Oberfläche mit reaktiven Materialien. Detaillierte Beschreibungen, wie Aussparungen oder Mikrovolumenmulden in Polymerfilmen hergestellt werden können sind in den US-Patentschriften 5,192,548, 5,219,462, 5,344,681 und 5,437,754 zu finden. Die folgenden Beschreibungen sind repräsentativ für die besonderen Kulturvorrangungen aus geprägtem Film, die in den nachfolgenden Beispielen verwendet wurden.

#### A. Gepresste geprägte Filme, die eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden aufweisen

**[0069]** Polyethylen (Harz #18BOA von Eastman Chemical Company), das 10 Gewichtsprozent TiO<sub>2</sub> TiO (50%/50% Polyethylen Pigmentkonzentrat) enthält und 0,5 Gew.% Netzmittel Triton X-35 (Sigma Chemical Company) oder Polypropylen wurde zu einem Film gegossen (4 mil Dicke). Der Film wurde in Blätter geschnitten und auf ein photolithographisch geätztes Werkzeug aus Magnesiumlegierung gestapelt (etwa 20 Blätter), das in der US-Patentschrift 5,219,462 beschrieben ist, und dazu gedacht ist, eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden zu formen. Das geätzte Magnesiumwerkzeug wies Vorsprünge auf, die in den in den folgenden Beispielen beschriebenen Mustern angeordnet waren. Die gestapelten Polyethylenblätter wurden auf einer geheizten hydraulischen Presse (132 °C, 1,4 N/m<sup>2</sup>, 120 Sekunden Haltezeit) geprägt, wie in der US-Patentschrift 5,219,462 beschrieben. Die Proben wurden abkühlen gelassen, und dann das Werkzeug entfernt, um einen einlagigen Film zu erhalten, der das Negativbild des Werkzeugs aufwies.

#### B. Extrusionsgeprägte Filme, die eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden aufweisen

**[0070]** Photolithographisch geätztes Ausgangswerkzeug wurde mittels Transfer-Haftklebstoff an einer Stahlwalze befestigt. Die in Beispiel 1A beschriebene Zusammensetzung aus Polyethylen, Pigment und Netzmittel wurde gemischt und durch Extrusion auf die Walze gegossen, wie in US-Patentschrift 5,192,548 beschrieben. Auf die gleiche Art wurden auch geprägte Filme ohne das Netzmittel Triton X-35 hergestellt.

#### C. Extrusionsgeprägte Filme mit hydrophober trockenbleibender Fläche

**[0071]** Extrusionsgeprägte Polyethylenfilme, die das Netzmittel Triton X-35 enthielten wurden gemäß Beispiel 1B hergestellt. Die Fläche zwischen den Mikrovolumenmulden (trockenbleibende Fläche) wurde hydrophob gemacht, indem eine dünne Schicht acrylierten Silikons (Goldschmidt FC 711), die 4,8% eines Vernetzungsmittels (Darocur 1173) enthielt, mit einem Walzenauftrags- Beschichtungsapparat (Straub Design Co.) auf sie übertragen wurde. Die hydrophobe Beschichtung wurde gehärtet, indem der Film unter Stickstoffatmosphäre ultravioletter Strahlung ausgesetzt wurde, dabei wurde eine UV-Lampe von Fusion Systems mit einer Hg-Lampe verwendet, die eine Dosis von 85 millijoule/cm<sup>2</sup> lieferte.

### Beispiel 2

#### Beimpfungsverfahren (Verfahren, das eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden verwendet)

##### A. Beimpfung mit Indikatorlösung

**[0072]** Eine wässrige Lösung, die (als Kontrastmittel) Phenolrot-Indikator enthielt, wurde mit einer Pipette auf silikonbehandelte und nicht silikonbehandelte geprägte Polyethylenfilme (Beispiele 1C bzw. 1B) aufgetragen, die eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden aufwiesen (etwa 1,3 µl/Mulde). Die Mikrovolumenmulden waren hexagonal angeordnet (etwa 19 Mulden/cm<sup>2</sup>) und jede Mulde hatte die Form eines umgekehrten Kegelstumpfes, der einen Durchmesser von etwa 1,9 mm an der Oberfläche und 1,0 mm an der tiefsten Stelle hatte, die etwa 1,1 mm tief lag. Die Mikrovolumenmulden wurden wie in US-Patentschrift 5,219,462 beschrieben gefüllt, indem die verdünnte Probelösung mit der Kante einer Rasierklinge den Film entlanggezogen wurde. Die Proben, die mit der hydrophoben Silikonbeschichtung behandelt waren, wiesen eine Verteilung der Flüssigkeit in die einzelnen Mikrovolumenmulden ohne Brückenbildung zwischen den Mulden auf, während bei den unbehandelten Filmen Brückenbildung beobachtet wurde.

##### B. Beimpfung mit mikroorganismenhaltigen Proben

**[0073]** Das Verfahren zur Beimpfung von Kulturvorrangungen aus geprägten Filmen, die eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden aufweisen, mit bakterienhaltigem Medium wurde in diesem Beispiel demonstriert. Die beimpften Vorrichtungen wurden verwendet, um E.-coli-Bakterien zu erfassen und auszuzählen.

**[0074]** Eine Übernacht-Bouillonkultur von E. coli ATCC 51813 (etwa 10<sup>9</sup> KBE/ml im Medium Tryptic Soy Broth

(Trypton-Soja Bouillon) wurde seriell in das Medium Violet Red Bile (Kristallviolett-Galle, 7,0 g/l Bactopepton, 3,0 g/l Hefeextrakt und 1,5 g/l Gallsalze) verdünnt, das 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronid (0,5 mg/ml) enthielt (MUG, Biosynth International, Naperville, IL). Die Verdünnung wurde auf die ungefähre Bakterienkonzentration von 100 KBE/ml hergestellt. Die verdünnte Probe (0,5 ml) wurde mit einer Pipette auf silikonbehandelte und nicht silikonbehandelte geprägte Filme (406 Mikrovolumenmulden) aufgebracht wie in Beispiel 2A beschrieben. Die beimpften geprägten Filme **43** wurden in Petrischalen gelegt und während 12 Stunden bei 37 °C bebrütet. Achtundzwanzig Mikrovolumenmulden **44** zeigten scharfe, diskrete Fluoreszenzflecken auf dem silikonbehandelten Film **46** ([Fig. 6b](#)). Dagegen wurde auf dem unbehandelten Film ([Fig. 6a](#)) signifikante gegenseitige Verunreinigung von einer Mulde zur anderen beobachtet. Für den silikonbehandelten Film entsprachen 28 positive Mulden einem MPN-Wert (wahrscheinlichste Anzahl) von 58 KBE/ml, berechnet mit der Formel  $MPN = N \ln(N/N-X)$ , wobei N die Gesamtzahl der gefüllten Mulden ist, und X die Gesamtzahl der Mulden, die eine positive Reaktion zeigen.

**[0075]** Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen, dass Mikroorganismen leicht unter Verwendung einer Kulturvorrang aus geprägtem Film, der eine Vielzahl von Mikrovolumenmulden aufweist, erfasst und ausgezählt werden können, und dass die gegenseitige Verunreinigung von einer Mulde zur anderen vermieden werden kann, indem die erhöhte Fläche zwischen den Mulden mit einer hydrophoben Substanz beschichtet wird.

### Beispiel 3

#### Kulturvorrang aus nanostrukturiertem Film

**[0076]** Kulturvorrang aus nanostrukturiertem Film, die eine Vielzahl von hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Mikrovolumenzonen aufwiesen, die auf einem Substrat angeordnet waren, das mit einem hydrophoben nanostrukturierten Film beschichtet war, wurden wie in diesem Beispiel beschrieben hergestellt.

##### A. Nanostrukturiertes Film

**[0077]** Verfahren zur Erzeugung nanostrukturiertes Oberflächen sind in den US-Patentschriften 4,812,352 und 5,039,561 offenbart. Kurzgefasst wurde das organische Pigment C.I. Pigment Red 149 (American Hoechst-Celanese, Somerset, NJ) in einer Dicke von 250 nm auf ein 0,0125 nm dikes, 30 × 30 cm großes Blatt einer Polyimidfolie aufgedampft, das zuvor mit etwa 700 Å Platin metallbedampft worden war. Die Probe wurde in einem Vakuumofen bei 264 °C mehr als 30 Minuten lang geheißt, was ausreichend war, um das Pigment PR 149 zu einer dichten Verteilung von diskreten kristallinen "Whiskern" (Nadeln) umzuformen, die senkrecht zu der Folienfläche ausgerichtet waren. Die Whisker wurden mit einer Massenäquivalentdicke von 2500 Å Gold beschichtet, was zu einer gleichartig geformten Beschichtung von Goldpartikeln führte, etwa 2 µm hoch und etwa 0,15 µm im Durchmesser, mit einer Flächendichte (Anzahl) von 5 pro µm<sup>2</sup>, bestimmt mit dem Raster-elektronenmikroskop.

**[0078]** Alternativ wurde das Polyimid durch durchsichtiges Fluoren-Polyester (FPE, 3M Co.) ersetzt, und mit 50 Å Gold beschichtet, was die Oberflächenaufladung beim Abscheiden des PR 149 verhinderte, wobei es aber im wesentlichen transparent blieb.

##### B. Hydrophober nanostrukturiertes Film

**[0079]** Der nanostrukturierte Film wurde dann hydrophob gemacht, indem er 4 Stunden lang in eine 0,1 mM Lösung von C<sub>8</sub>F<sub>17</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>SH in Äthanol eingetaucht und danach mit reinem Äthanol abgespült und luftgetrocknet wurde. Für die resultierende stark hydrophobe Oberfläche wurden identische Fortschreite- und Rückzugskontaktwinkel von 178 ° für Wasser gemessen. Dieses Verfahren ist in der Patentanmeldung WO 96/34697 beschrieben.

##### C. Kulturvorrang aus nanostrukturiertem Film

**[0080]** Kulturvorrang aus nanostrukturiertem Film wurden hergestellt unter Verwendung eines Verkapselungs-Delaminierungs-Verfahrens, wie in US-Patentschrift 5,336,558 beschrieben. Kurzgefasst, wurden Stücke des nanostrukturierten hydrophoben Filmes in 1,5 × 2 cm breite Streifen geschnitten. Ein 0,25 mm dikes perforiertes Metallblech, das eine quadratische Anordnung von Löchern mit 1,5 mm Durchmesser und etwa 4 mm gegenseitigem Abstand aufwies, wurde über die nanostrukturierte Seite des Streifens gelegt. Ein schnellhärzendes Vinyl-polysiloxan-Verkapselungsmaterial (3M EXPRESS Zahndrucksmaterial, 3M Co.) wurde großzügig über das Stahlblech aufgetragen, so dass das Material durch die Löcher drang und die na-

nostrukturierten Whisker verkapselte. Nach einigen Minuten war das Abdruckmaterial gehärtet, und das Stahlblech wurde entfernt, wodurch die nanostrukturierten Elemente nur an den Stellen der Lochanordnung sauber von der Polyimidfolie abgezogen wurden. Das freigelegte metallbeschichtete Polyimidsubstrat in den Bereichen unter den Löchern war relativ hydrophil im Vergleich mit dem Rest der Oberfläche. Dies wurde demonstriert, indem die Streifen in eine wässrige Lösung getaucht wurden, und beobachtet wurde, dass kleine Tröpfchen nur an der Anordnung von freigelegten Stellen oder Zonen hängen blieben.

**[0081]** Alternativ und bevorzugt wurde Laserabtragung verwendet, um die nanostrukturierten Elemente von der Polyimidfolie zu entfernen, um die gewünschte Anordnung von relativ hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen bereitzustellen. Die Streifen von nanostrukturiertem hydrophobem Film wurden mit einem Nd-YAG-Laser abgetragen, der einen Kollimatorstrahl von 1 mm Durchmesser hatte und in Güteschaltung mit Pulsen von etwa 2 mJoule und 60 Nanosekunden betrieben wurde. Einzelne Pulse wurden verwendet, um Reihen von Zonen mit 1 mm Durchmesser bei 4 und 5 mm Mittelpunktsabstand abzutragen.

**[0082]** Größere Zonen, Quadrate von etwa  $1,6 \times 1,6$  mm, wurden hergestellt, indem neun Zonen mit 1 mm Durchmesser in einer  $3 \times 3$ -Matrix überlagert wurden. Die erzeugte Kulturvorrichtung aus nanostrukturiertem Film mit 40 ( $4 \times 10$ ) Zonen wurde am Anfang 1 Minute lang in Wasser eingetaucht, um die abgetragenen Zonen hydrophil zu machen. Nach dem Herausziehen der Platte hatte jede der 40 Zonen einen halbkugelförmigen Tropfen mit 1 mm Durchmesser an ihr hängen.

#### Beispiel 4

##### Beimpfungsverfahren

(Verfahren unter Verwendung von Kulturvorrichtungen aus nanostrukturiertem Film)

###### A. Beimpfung mit wässriger flüssiger Probe

**[0083]** Um eine Kulturvorrichtung aus nanostrukturiertem Film (Beispiel 3C) zu beimpfen, und die Menge der damit selektiv entnommenen Flüssigkeit zu messen, wurde eine Platte mit 12 hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen, deren Größe von 1 bis 2,5 mm Durchmesser variierte (Durchschnitt 2 mm) in reines Wasser eingetaucht, und die Menge des auf die Zonen entnommenen Wassers wurde gravimetrisch bestimmt. Die Platte wurde zuerst mit einer kleinen Entnahmgeschwindigkeit von etwa 3 Sekunden/cm eingetaucht. Nach dem Herausnehmen wurde die Rückseite der Platte mit einem Papiervlies berührt, um Wassertropfen, die an der Rückseite der Polyimidplatte hängen könnten zu entfernen, und die Platte wurde dann auf eine Massenwaage gelegt (0,1 mg Mindestempfindlichkeit) und die Masse 15 Sekunden später aufgezeichnet. Dies wurde 15 mal wiederholt. Der Mittelwert und die Standardabweichung der Masse der 12 Wasserzonen war  $3,7 \pm 0,2$  mg, was ein mittleres Zonenvolumen von  $0,310 \mu\text{l} \pm 5\%$  ergab. Das Verfahren wurde dann mit einer schnellen Entnahmgeschwindigkeit wiederholt, bei der die Platte in einer Zeit auf etwa 0,1 Sekunden geschätzten Zeit aus dem Wasser gezogen wurde. Bei dieser Geschwindigkeit war die Flüssigkeitsmenge, die an den hydrophilen Zonen verblieb größer, weil die Flüssigkeit keine Zeit hatte, sich zu "strecken" und dynamisch auszugleichen. Der Mittelwert und die Standardabweichung der 15 Versuche war  $6,0 \pm 0,5$  mg, was ein durchschnittliches Zonenvolumen von  $0,5 \mu\text{l} \pm 12\%$  ergab.

###### B. Beimpfung mit *S. aureus*-haltigen Proben

**[0084]** Das Verfahren zur Beimpfung von Kulturvorrichtungen aus nanostrukturierten Filmen, die eine Vielzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen für Mikrovolumen aufweisen, mit bakterienhaltigem Medium wurde in diesem Beispiel demonstriert. Die beimpften Vorrichtungen wurden verwendet, um die Bakterien *S. aureus* (Beispiel 4B) und *E. coli* (Beispiel 4C) zu erfassen und auszuzählen.

**[0085]** Eine Mischung (5  $\mu\text{l}$ ) von geschmolzenem (etwa 60 °C) bakteriologischem Wachstumsmedium BHI (Brain Heart Infusion, Hirn-Herz-Bouillon, Becton Dickinson and Co.) und Agar (1,2% Gewicht/Volumen) wurde auf die hydrophilen Zonen der wie in Beispiel 3C hergestellten Kulturvorrichtungen aus nanostrukturiertem Film verteilt. Die Agar-"Flecken" wurden bei Raumtemperatur abkühlen und fest werden gelassen. Eine Platte wurde kurz in eine wachsende Kultur von *Staphylococcus aureus* (etwa  $10^8$  Zellen/ml) in BHI-Bouillon-Medium getaucht. Andere Platten wurden in gleicher Weise in 1:10- und 1:1000-Verdünnungen der *S.-aureus*-Kultur getaucht, die  $10^7$  bzw.  $10^5$  Zellen/ml darstellten. Die Platten wurden in Plastik-Petrischalen gelegt, die wasserge-sättigtes Filterpapier enthielten, um die Feuchtigkeit aufrechtzuerhalten, und 4 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Die Platten wurden dann in eine Lösung getaucht, die 900  $\mu\text{l}$  HEPES-Puffer (Sigma Chemical Co., pH 8,0),

120  $\mu$ l fluoreszierende Indikatorlösung (1,0 mg/ml Boc-Val-Pro-Arg-AMC HCl (NovaBiochem, San Diego, CA) in 72 mM Triethanolamin, 144 mM NaCl, pH 8,4) und 30  $\mu$ l Human-Prothrombin (Sigma Chemical Co., 50 mg/ml in 5 mM Tris-Puffer, 50 mM NaCl, pH 8, 0) enthielt. Die Platten wurden eine weitere Stunde unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben bebrütet, und dann unter UV-Licht untersucht (etwa 366 nm, Mineralite, UVP, Inc., San Gabriel, CA). Die Zonen, die Agar-Medium, Bakteriensuspension und Indikatorlösung enthielten, zeigten alle sichtbare, intensiv blaue Fluoreszenz, im Vergleich zu keiner sichtbaren Fluoreszenz in den Kontrollproben, die ohne Bakterienzusatz hergestellt wurden. Es wurde keine gegenseitige Verunreinigung zwischen den Zonen beobachtet.

#### C. Beimpfung mit Proben, die E. Coli enthielten

**[0086]** Agar-Medium wurde hergestellt, indem die folgenden Zutaten gemischt wurden: Gelatine pankreatisch verdaut (10 g, Peptone G, Acumedia Manufactureres, Inc., Baltimore, MD), Bacto Bile Salts Number 3 (Gallensalze, 2,5 g, Difco Labs, Detroit, MI), Agar (6 g, Difco Labs) und vollentsalztes Wasser (500 ml). Die Mischung wurde gerührt und auf 100 °C erhitzt, bis der Agar geschmolzen war, zum Sterilisieren 15 Minuten bei 121 °C autoclaviert, und dann zum Festwerden auf Raumtemperatur abkühlen gelassen. Eine IPTG-Stammlösung wurde hergestellt aus filtersterilisiertem (0,2 mm) Isopropyl- $\beta$ -D-Galactosid (IPTG, CalBiochem Corp, La Jolla, CA) in vollentsalztem Wasser (200 mg/ml) und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Eine MU-Gal-Stammlösung wurde hergestellt aus 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosid (MU-Gal) in N,N-Dimethylformamid (10 mg/ml) und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Unmittelbar vor der Verwendung wurde das Agar-Medium bei 100 °C geschmolzen, und 25 ml wurden in ein steriles 50-ml-Reagenzglas transferiert. Die IPTG-Stammlösung (12,5 ml) und die MU-Gal-Stammlösung (150 ml) wurden dann in die abgekühlte (etwa 60 °C) Agar-Suspension eingemischt. Die Mischung wurde sofort (in 4- $\mu$ l-Teilmengen) auf die Kulturvorrangungen aus nanostrukturiertem Film übertragen, wie in Beispiel 4B beschrieben. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Platten in eine Kultur von E. Coli ATCC 51813 getaucht, die sich mitten in der exponentiellen Wachstumsphase befand (etwa 10<sup>8</sup> Zellen/ml in LB-Medium 3), und in individuell befeuchteten Petrischalen bei 37 °C bebrütet. Nach 4 Stunden Brutzeit wurden die Platten mit einer Mineralite-UV-Lampe auf Fluoreszenz geprüft. Die beimpften Zonen zeigten etwas mehr Fluoreszenz als in den nicht beimpften Zonen beobachtet wurde. Die Platten wurden dann während weiterer 16 Stunden bebrütet und wieder geprüft. Die beimpften Zonen zeigten signifikant mehr blaue Fluoreszenz als die nicht beimpften Zonen. Die mit durchsichtigem Filsubstrat (Beispiel 3A unter Verwendung von FPE) hergestellte Platte war besonders bequem zu messen, weil sie von einer Seite beleuchtet und von der anderen Seite angeschaut oder photographiert werden konnte. Es wurde keine gegenseitige Verunreinigung zwischen den Zonen beobachtet.

#### Beispiel 5

##### Kulturvorrangungen mit absorbierenden Scheiben

**[0087]** Kulturvorrangungen mit absorbierenden Scheiben, die eine Vielzahl von absorbierenden Scheiben aufweisen, die auf einer hydrophoben Oberfläche angeordnet sind, und für die Erfassung und Auszählung von Mikroorganismen in einer flüssigen Testprobe verwendet werden können, wurden wie in diesem Beispiel beschrieben hergestellt.

**[0088]** Ein Blatt absorbierenden Materials (Scheicher & Schüll Papier Güte 903, absorbiert etwa 4,5 g Wasser/100 cm<sup>2</sup>) wurde an einen silikonbeschichteten Rexam-Film (Grade #15819 D 2MIL CL PET MM34P/000 mit einem durchsichtigen 2 mil dicken Polyester-Film als Substrat, Rexam Release, Oak Brook, IL) laminiert, unter Verwendung eines Acryl-Haftklebers (Pressure sensitive adhesive, PSA), der den Farbindikator 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid (TTC) (Amresco, Solon, OH) enthielt. Das Material wurde mit TSB-Nährmedium gesättigt, das 0,5% der fluoreszierenden Indikatoren 4-Methyl-umbelliferylphosphat (100  $\mu$ g/ml, Sigma, St. Louis, MO) und 4-Methyl-umbelliferyl- $\alpha$ -D-Glucosid (50  $\mu$ g/ml, Sigma) enthielt, mit einem drahtumwickelten Stab abgewischt und 10 Minuten lang bei 110 °C getrocknet. Kreisförmige Scheiben von etwa 0,635 cm Durchmesser wurden aus dem Laminat ausgestanzt und die silikonbeschichtete Trägerschicht entfernt. Die Scheiben mit PSA wurden dann auf ein anderes Blatt Rexam silikonbeschichtetem Film aufgeklebt, so dass die Scheiben in parallelen Reihen mit gleichmäßigen Abständen angeordnet waren. Die Filme mit den aufgeklebten Scheiben wurden mit Gammastrahlung der Dosis 8,9 kGy bestrahlt, auf die gewünschte Größe geschnitten, und dann mit Klebeband in eine Petrischale geklebt, so dass jede Schale ein Stück Film mit 20 Scheiben enthielt. Basierend auf gravimetrischen Messungen hatte jede Scheibe in den so hergestellten Kulturvorrangungen eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 40  $\mu$ l.

## Beispiel 6

## Beimpfungsverfahren

(Verfahren, das Kulturvorrichtungen mit absorbierenden Scheiben verwendet)

**[0089]** Das Verfahren zur Beimpfung von Kulturvorrichtungen mit absorbierenden Scheiben, die eine Vielzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen (absorbierenden Scheiben) aufweisen, mit bakterienhaltigem Medium wurde in diesem Beispiel demonstriert. Die beimpften Vorrichtungen wurden verwendet, um E.-coli-Bakterien zu erfassen und auszuzählen.

**[0090]** Eine Kultur von E. coli ATCC 51813 wurde verdünnt, um Suspensionen herzustellen, die etwa 10 KBE/ml und 1 KBE/ml enthielten. Proben (1 bis 2 ml) der Suspensionen wurden mit einer Pipette auf die in Beispiel 5 beschriebenen Kulturvorrichtungen aufgebracht. Überschüssige flüssige Probe wurde abgegossen, wodurch etwa 0,8 ml auf der Vorrichtung zurückgehalten wurden (20 Scheiben, etwa 40 µl Flüssigkeit pro Scheibe). Die beimpften Vorrichtungen wurden 23 Stunden lang bei 35 °C bebrütet und unter Uv-Licht untersucht. Die Anzahl von Scheiben, die Fluoreszenz aufwiesen, wurde für jede Vorrichtung gezählt, und die wahrscheinlichsten Anzahlen (MPN-Werte) unter Verwendung der in Beispiel 2B beschriebenen Formel berechnet. Die MPN-Werte pro Milliliter wurden berechnet, indem der erhaltene Wert durch das Gesamtvolumen der Probe (0,8 ml) geteilt wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6a dargestellt, und mit Auszählungen, die aus Standardtests mit PETRIFILM™-Coliformenzählplatten (3M Co.) erhalten wurden verglichen. Die fluoreszierenden Scheiben zeigten oft die rote TTC-Farbe, meistens als separate Flecken innerhalb der Scheiben. Es wurde keine gegenseitige Verunreinigung zwischen den absorbierenden Scheiben beobachtet.

Tabelle 6a

## Auszählung von Mikroorganismen (E. Coli)

Bakterien-suspension (KBE/ml)	Positive Scheiben (von 20)	MPN (KBE/ml)	Coliformen-zählung PETRIFILM™
10	17	47	22
10	19	74	24
1	2	2.6	5
1	3	4.1	4

**[0091]** Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen, dass Kulturvorrichtungen mit absorbierenden Scheiben, die eine Vielzahl von absorbierenden Scheiben auf einem hydrophoben Film angeordnet haben, leicht beimpft werden können, und für die Erfassung und Auszählung von E. Coli verwendet werden können, wobei die erhaltenen Werte vergleichbar sind mit den mit handelsüblichen Coliformenzählplatten PETRIFILM™ erhaltenen Werten.

## Beispiel 7

## Beimpfungsverfahren

(Verfahren, das Kulturvorrichtungen mit hydrophilen Fasern verwendet)

**[0092]** Das Verfahren zur Herstellung und Beimpfung von Kulturvorrichtungen mit hydrophilen Fasern, die eine Vielzahl von flüssigkeitszurückhaltenden Zonen (ungewebe Faserschlaufen) aufweisen, mit Indikatorlösung und bakterienhaltigem Medium wurde in diesem Beispiel demonstriert. Die Beimpften Vorrichtungen wurden zum Erfassen und Auszählen von E.-coli-Bakterien verwendet.

## A. Herstellung der Vorrichtung

**[0093]** Ein Blatt hydrophoben Polypropylenfilms, der eine Anordnung von relativ hydrophilen Vorsprüngen

aus netzmittelhaltigen, ungewebten Polypropylen-Faserschlaufen aufwies, wurde hergestellt wie in US-Patentschrift 5,256,231 beschrieben. Das Blatt wurde auf die gewünschte Größe geschnitten und mit Klebeband in den Boden einer Petrischale eingeklebt, um eine Kulturvorrichtung zu bilden. Jede Vorrichtung enthielt Film mit etwa 200 Faserschlaufenvorsprüngen, in einem hexagonalen Muster in parallelen Reihen mit gleichmäßigem Abstand. Jeder halbkugelförmige Vorsprung war an der Basis sechseckig (Seitenlänge etwa 3 mm, Höhe etwa 2 mm) und hatte eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 15 µl Flüssigkeit.

#### B. Beimpfung mit Indikatorlösung

**[0094]** Eine Probe (1 ml) eines Phosphatpuffers ("Butterfield", Fisher Scientific), der (als Kontrastmittel) Phenolrotindikator enthielt, wurde mit einer Pipette auf die Mitte der Vorrichtung gegeben. Es wurde beobachtet, dass sich die Flüssigkeit durch Kapillarkräfte radial vom Beimpfungspunkt in die Faserschlaufenvorsprünge verteilte. Es wurde beobachtet, dass sich die Flüssigkeit schnell in die Schlaufenvorsprünge verteilte, während sie von den hydrophoben trockenbleibenden Polypropylenflächen "abtrocknete". Etwa 65 der 200 Vorsprünge wurden gefüllt. Es wurde keine Brückenbildung der farbigen Flüssigkeit über die trockenbleibenden Flächen zwischen den Schlaufenvorsprüngen beobachtet.

#### C. Beimpfung mit mikroorganismenhaltiger Probe

**[0095]** Eine Übernacht-Bouillonkultur von *E. coli* ATCC 51813 (etwa 10<sup>9</sup> KBE/ml im Medium Tryptic Soy Broth (Trypton-Soja-Bouillon) wurde seriell in das Medium Violet Red Bile (Kristallviolett-Galle, 7,0 g/l Bactopepton, 3,0 g/l Hefeextrakt und 1,5 g/l Gallsalze) verdünnt, das 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronid (0,5 mg/ml) enthielt. Es wurde eine Verdünnung von 10<sup>-8</sup> hergestellt, was einer Bakterienkonzentration von etwa 10 KBE/ml entspricht. Eine Probe (1 ml) wurde auf den Film in der Mitte einer Kulturvorrichtung mit hydrophilen Fasern (Beispiel 7A) pipettiert, wie in Beispiel 7B beschrieben. Nach der Beimpfung wurde die Petrischale zugedeckt und mit Isolierband versiegelt, um Verdampfung zu verhindern. Die Vorrichtung wurde dann umgedreht und 19 Stunden lang bei 37 °C bebrütet. Nach der Bebrütung wurde die Anzahl der Vorsprünge, die unter Bestrahlung mit 365 nm Fluoreszenz zeigten gezählt. Es wurden fünf separate, einzelne Vorsprünge beobachtet, die signifikante Fluoreszenz aufwiesen. Zwischen den Vorsprüngen wurde keine Fluoreszenz beobachtet, was anzeigt, dass keine gegenseitige Kontamination auftrat. Der MPN-Wert wurde unter Verwendung der in Beispiel 2B beschriebenen Formel zu 5 KBE/ml berechnet.

**[0096]** Die Ergebnisse dieses Beispiels zeigen, dass Kulturvorrichtungen mit hydrophilen Fasern, die eine Vielzahl von Zonen mit hydrophilen Fasern auf einem hydrophoben Film angeordnet haben, leicht mit bakterienhaltigen flüssigen Proben beimpft werden können, und für die Erfassung und Auszählung von *E. Coli* verwendet werden können.

**[0097]** Verschiedene Modifikationen und Abänderungen dieser Erfindung werden Fachleuten augenscheinlich sein, ohne vom Anwendungsgebiet dieser Erfindung abzuweichen, und es sollte verstanden werden, dass diese Erfindung nicht auf die hier beschriebenen illustrativen Ausführungsformen beschränkt ist.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen zur Bestimmung der wahrscheinlichsten Anzahl (most probable number), wobei eine wässrige flüssige Probe in einzelne Volumen aufgeteilt wird, aufweisend:
  - a) Bereitstellen einer Vorrichtung zum kultivieren der Mikroorganismen, wobei die Vorrichtung eine Auswertungssoberfläche hat, wobei die Auswertungssoberfläche hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen aufweist, und eine hydrophobe erhöhte Fläche zwischen den Zonen;
  - b) in Kontakt bringen der flüssigen Probe mit der Auswertungssoberfläche derart, dass die flüssige Probe sich in die hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen verteilt;
  - c) Inkubieren der Vorrichtung;
  - d) Erfassen eines Signals, das zeigt, dass in einer Zone Mikroorganismen wachsen; und
  - e) Durchführen einer Analyse der wahrscheinlichsten Anzahl (most probable number) basierend auf der Anzahl der Zonen, in denen ein Signal erfasst wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Zonen eine Beschichtung oder ein Depot von Auswertungsreagens aufweisen.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Auswertungsreagens ein Nährmedium aufweist.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Auswertungsreagens mindestens eine Indikatorsubstanz aufweist, und die Indikatorsubstanz gewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird von einem Farbindikator, einem fluoreszierenden Indikator, einem lumineszierenden Indikator und einem elektrochemischen Indikator.

5. Verfahren nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kultiviervorrichtung etwa 400 bis etwa 600 hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen aufweist.

6. Kultiviervorrichtung, die zur Durchführung des Verfahrens eines der vorhergehenden Ansprüche geeignet ist, wobei die Vorrichtung eine Auswertungsoberfläche aufweist, wobei die Auswertungsoberfläche hydrophile flüssigkeitszurückhaltende Zonen (**14; 18, 20, 22; 28; 34**) aufweist, und eine hydrophobe erhöhte Fläche (**13**) zwischen den Zonen, wobei mindestens einige der Zonen ein Auswertungsreagens aufweisen, wobei das Auswertungsreagens ein Nährmedium aufweist, und das Auswertungsreagens als Beschichtung in den hydrophilen flüssigkeitszurückhaltenden Zonen vorliegt.

7. Kultiviervorrichtung nach Anspruch 6, wobei die Vorrichtung von etwa 10 bis etwa 10 000 Zonen (**14; 18, 20, 22; 28; 34**) hat.

8. Kultiviervorrichtung nach Anspruch 5 oder 7, wobei jede Zone (**14; 18, 20, 22; 28; 34**) eine Flüssigkeitsrückhaltekapazität von etwa 0,01 bis etwa 25 Mikroliter hat.

9. Kultiviervorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei das Auswertungsreagens eine Indikatorsubstanz aufweist.

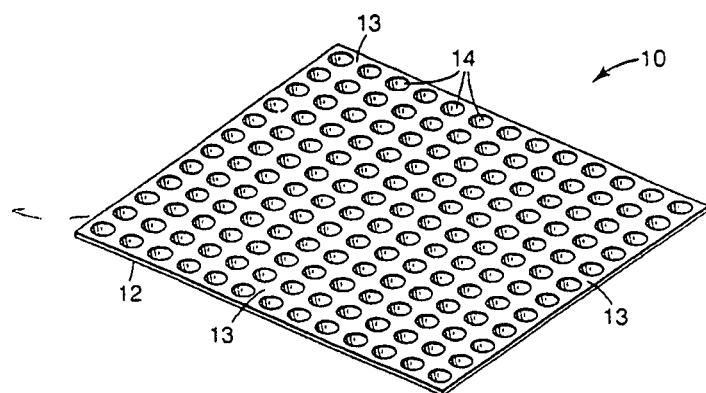
10. Kultiviervorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 9, wobei das Auswertungsreagens ein Nährmedium aufweist.

11. Kultiviervorrichtung nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Indikatorsubstanz gewählt ist aus der Gruppe, die gebildet wird von einem Farbindikator, einem fluoreszierenden Indikator, einem lumineszierenden Indikator und einem elektrochemischen Indikator.

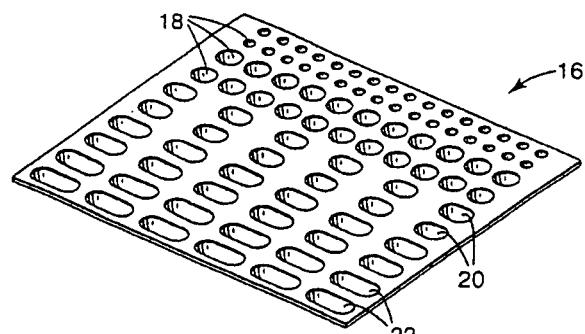
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 6 bis 11, wobei die flüssigkeitszurückhaltenden Zonen (**34**) absorbierende Scheiben aufweisen (**30**).

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

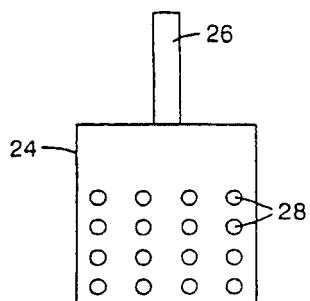
Anhängende Zeichnungen



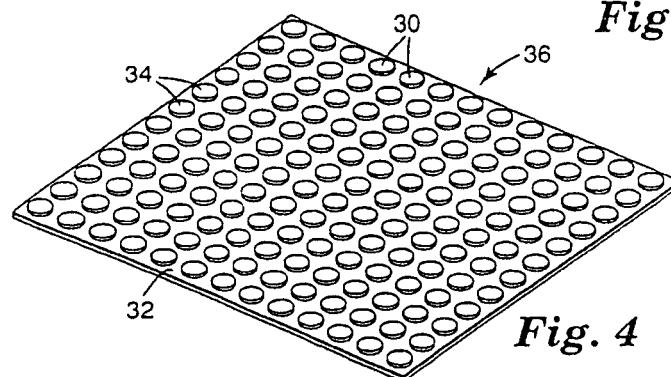
*Fig. 1*



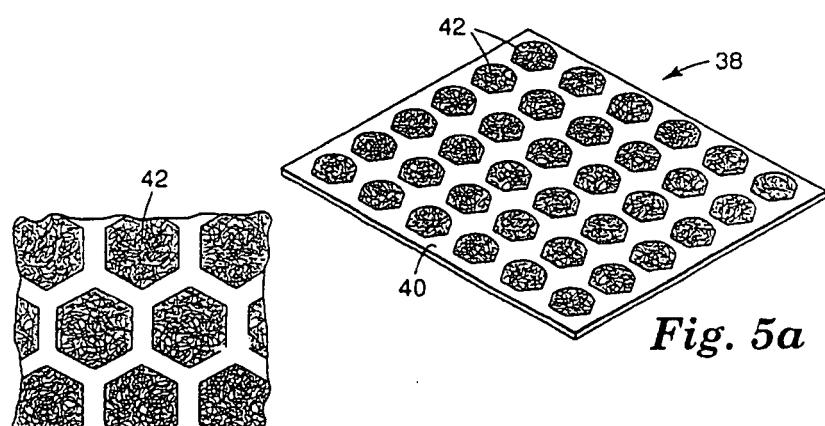
*Fig. 2*



*Fig. 3*



*Fig. 4*



*Fig. 5a*

*Fig. 5b*

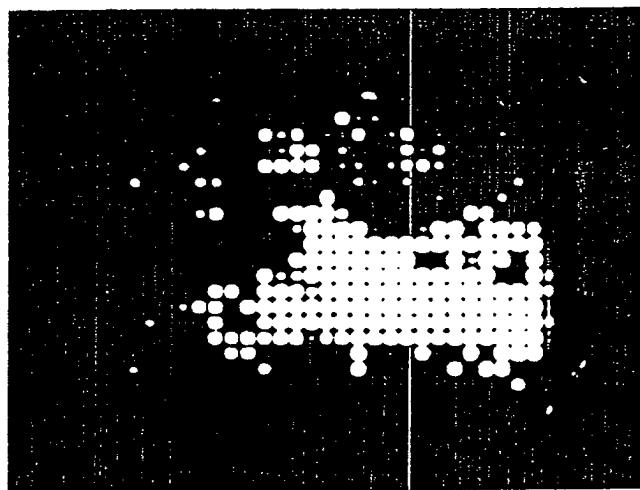


FIG.6A

DE 697 33 366 T2 2006.01.26

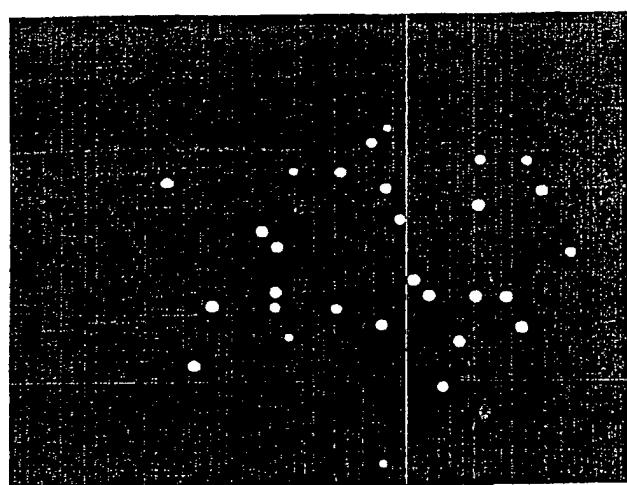


FIG.6B