



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104364388 B

(45)授权公告日 2017.12.19

(21)申请号 201380031394.0

(22)申请日 2013.04.16

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104364388 A

(43)申请公布日 2015.02.18

(30)优先权数据

61/624643 2012.04.16 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.12.15

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/036816 2013.04.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/158666 EN 2013.10.24

(73)专利权人 快速微型生物系统公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 D.J.布朗 S.卡拉科兹安 陈晓伟

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 石克虎

(51)Int.Cl.

C12Q 1/04(2006.01)

C12M 1/14(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

(56)对比文件

US 20070105185 A1,2007.05.10,全文.

CN 101528912 A,2009.09.09,说明书第4页第1段和第3段、第5页第2段、第7页第8段及图4A和图7.

CN 85106361 A,1986.04.10,全文.

CN 1249778 A,2000.04.05,全文.

审查员 孙谦

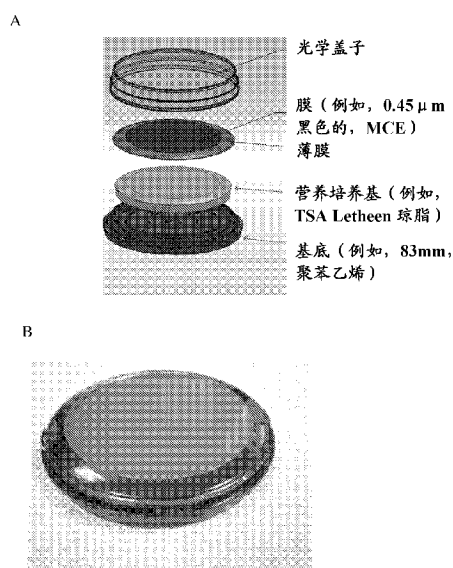
权利要求书4页 说明书9页 附图16页

(54)发明名称

细胞培养装置

(57)摘要

本发明特征在于用于捕获和培养微生物(例如,细菌、真菌或原生生物)的装置和试剂盒以及使用该装置和试剂盒以检测在环境样品和其他样品中的微生物的方法。该装置包括具有其上可以生长微生物的平面生长区域的营养培养基。通过将装置与任意环境样品接触,例如,将装置在工作表面上滚动或将装置暴露于空气中,或通过 将样品通过膜过滤,来收集样品。沉积在膜上的微生物从下面的培养基中获得营养物并生长成随后可用本领域已知的方法检测的菌落。可以对检测到的菌落数字式成像或使用胶卷成像。



1. 一种细胞培养装置,其包括:
 - (a) 包含微生物营养培养基的基底;
 - (b) 覆盖营养培养基的多孔膜,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长;和
 - (c) 与基底配合以遮盖膜和营养培养基的盖子。
2. 如权利要求1所述的装置,其中该生长区域在采集样品前具有100-450微米的平整度或在采集样品后具有300-600微米的平整度。
3. 如权利要求1所述的装置,其中该膜在周向区域中是无孔的。
4. 如权利要求1所述的装置,其中该膜通过封接至基底的薄膜附接于基底。
5. 如权利要求1所述的装置,其进一步包括应用于基底和周向区域的薄膜,其中该薄膜将膜粘附于基底。
6. 如权利要求1所述的装置,其中该基底包括周向凹槽,横跨所述周向凹槽封接所述膜。
7. 一种细胞培养装置,其包括:
 - (a) 包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域,其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长,
 - (b) 覆盖营养培养基的薄膜,其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分,和
 - (c) 与基底配合以遮盖营养培养基的盖子。
8. 如权利要求7所述的装置,其进一步包括与该暴露出的生长区域接触的多孔膜。
9. 一种用于细胞培养的试剂盒,其包括:
 - (a) 细胞培养装置,其包括:
 - (i) 包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域,其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长,和
 - (ii) 覆盖营养培养基的薄膜,其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分,
 - (b) 配置用于放置在平面生长区域的暴露部分上的多孔膜;和
 - (c) 与基底配合以遮盖膜和营养培养基的盖子。
10. 如权利要求7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该生长区域具有100-450微米的平整度。
11. 如权利要求7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该薄膜是无孔的。
12. 如权利要求7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该薄膜具有用于将膜放置到生长区域上的基准标志。
13. 如权利要求8所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该膜具有暴露出荧光的营养培养基、塑料或印刷的材料的通孔。
14. 如权利要求1或8所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该膜包括混合的纤维素酯膜。
15. 如权利要求1或8所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该膜是基本上无发

射光的和基本上无反射的。

16. 如权利要求1或8所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该膜是黑色的。

17. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该基底包含聚苯乙烯。

18. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其进一步包括基准标志。

19. 如权利要求18所述的装置或试剂盒,其中该基准标志在生长区域之外。

20. 如权利要求19所述的装置或试剂盒,其中该基准标志包括发射光的塑料、印刷的荧光材料或压花的荧光材料。

21. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该盖子包括配置以允许对生长区域成像的光学透明材料。

22. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该盖子当附接于基底时防止由微生物进入引起的污染,并且其中该盖子通过空气间隙与膜分隔开。

23. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其进一步包括在基底上的独特的ID标签。

24. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该基底与盖子配合以防止基底相对于盖子大于50 μ m的旋转。

25. 如权利要求1或7所述的装置或如权利要求9所述的试剂盒,其中该基底具有底面和环绕底面周界延伸且从底面向上延伸的侧壁,其中该营养培养基在基底的侧壁之内,并且该盖子具有顶面和环绕顶面周界延伸且从顶面向下延伸的侧壁;其中该盖子可逆性地固定到基底。

26. 如权利要求25所述的装置或试剂盒,其中该盖子通过轴向压力固定于基底。

27. 如权利要求25所述的装置或试剂盒,其中该盖子通过盖子相对于基底的旋转固定于基底。

28. 如权利要求25所述的装置或试剂盒,其进一步包括从基底的侧壁或从盖子的侧壁侧向延伸的周向轮缘和从基底的侧壁或从盖子的侧壁侧向延伸的第一掣子,其中该周向轮缘具有远离盖子的顶部或基底的底部面向的近侧侧部,朝向盖子的顶部或基底的底部面向的远侧侧部,和连接近侧侧部和远侧侧部的侧向边缘,

其中该盖子具有周向轮缘且该基底具有至少一个第一掣子,或该盖子具有至少一个第一掣子且该基底具有周向轮缘,并且其中该盖子通过所述周向轮缘和所述至少一个第一掣子之间的相互接合固定到基底。

29. 如权利要求28所述的装置或试剂盒,其中该周向轮缘在基底的侧壁或盖子的侧壁周围是连续的。

30. 如权利要求28所述的装置或试剂盒,其中该侧向延伸的至少一个第一掣子限定第一掣子和基底的底面或盖子的顶面之间的间隙,其中将该间隙调整大小以容纳周向轮缘,并且该第一掣子接合周向轮缘的远侧侧部。

31. 如权利要求28所述的装置或试剂盒,其中该至少一个第一掣子接合周向轮缘的侧向边缘。

32. 如权利要求28所述的装置或试剂盒,其进一步包括至少一个从侧壁上侧向延伸的

第二掣子,其中该周向轮缘包括截口,并且第二掣子接合该截口。

33. 如权利要求28所述的装置或试剂盒,其中该周向轮缘沿基底或盖子的侧壁的周线为非连续的。

34. 如权利要求33所述的装置或试剂盒,其中将该轮缘的远侧侧部倾斜,并且该至少一个第一掣子通过盖子相对于基底的相对旋转接合轮缘的远侧侧部。

35. 如权利要求34所述的装置或试剂盒,其进一步包括多个周向轮缘和第一掣子,其中该盖子通过90度或更小的相对旋转固定到基底。

36. 如权利要求34所述的装置或试剂盒,其进一步包括在盖子或基底上的止挡,该止挡阻止周向轮缘在规定的量的旋转后的旋转。

37. 一种用于监控在环境中的微生物的存在情况的方法,该方法包括以下步骤:

- (a) 提供如权利要求1-6和权利要求14-36中任意一项所述的装置;
- (b) 将装置的生长区域与一定体积的空气或表面接触;
- (c) 孵育装置以允许微生物生长;和
- (d) 确定微生物的生长的程度。

38. 如权利要求37所述的方法,其中该表面为工作表面、墙面、地面或服装表面。

39. 如权利要求37所述的方法,其中步骤(b)包括滚动装置以便周向区域和生长区域接触表面或让所述体积的空气在生长区域上通过。

40. 如权利要求37所述的方法,其中步骤(d)包括对生长区域光学成像。

41. 如权利要求40所述的方法,其进一步包括分析图像以定量微生物的数量。

42. 如权利要求40所述的方法,其进一步包括重复步骤(c)和(d)以确定生长的微生物菌落。

43. 一种用于监控在样品中的微生物的存在情况的方法,该方法包括以下步骤:

- (a) 提供了如权利要求8-36中任意一项所述的装置或试剂盒;
- (b) 将样品通过膜过滤;
- (c) 将膜放置在生长区域上;
- (d) 孵育装置以允许微生物生长;和
- (e) 确定微生物的生长的程度。

44. 如权利要求43所述的方法,其中步骤(e)包括对生长区域光学成像。

45. 如权利要求44所述的方法,其进一步包括分析图像以定量微生物的数量。

46. 如权利要求44所述的方法,其进一步包括重复步骤(d)和(e)以确定生长的微生物的菌落。

47. 一种试剂盒,其包括:

- (a) 细胞培养装置,其包括:

- (i) 包含微生物营养培养基的基底,和

- (ii) 覆盖营养培养基的多孔膜,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物,

- (b) 附接于基底并防止由微生物进入引起的污染的保护盖,其中该保护盖通过空气间隙与膜分隔开,和

(c) 当取下保护盖时可附接于基底的光学盖子,该光学盖子包括配置以当附接于基底时允许对生长区域成像的光学透明材料。

48. 一种用于细胞培养的试剂盒,其包括:

(a) 细胞培养装置,其包括:

(i) 包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域,其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长,和

(ii) 覆盖营养培养基的薄膜,其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分,

(b) 配置用于放置在平面生长区域的暴露部分上的多孔膜;

(c) 附接于基底并防止由微生物进入引起的污染的保护盖,其中该保护盖通过空气间隙与生长区域分隔开;和

(d) 当保护盖取下时可附接于基底的光学盖子,该光学盖子包括配置以当附接于基底时允许对生长区域成像的光学透明材料。

细胞培养装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求提交于2012年4月16日的美国临时申请号61/624,643的权益,该临时申请通过引用并入此处。

[0003] 发明背景

[0004] 本发明涉及细胞培养和检测领域。

[0005] 在许多产业中,尤其在食品、饮料、医疗保健、电子和制药产业中,快速地分析样品被诸如细菌、酵母或霉菌等微生物污染的程度是必需的。

[0006] 一种微生物培养技术,被称为微生物计数或菌落计数,定量在样品中的微生物细胞的数量。基于原位微生物复制的微生物计数方法通常针对样品中的每个微生物细胞生成一个视觉上可测量的“菌落”。因此,计数可见的菌落允许微生物学家准确地确定在样品中的微生物细胞的数量。为进行微生物计数,可将细菌细胞散布于皮氏培养皿(“琼脂平板”)中的营养琼脂表面并在允许原位细菌复制的条件下孵育。微生物计数是简单的、极灵敏的、便宜的且定量的,但也可能是慢的。

[0007] 存在对用于快速微生物计数的另外的培养装置和方法的需求。

发明概要

[0008] 本发明提供了用于捕获和培养微生物(例如,存在于环境样品中的)的装置和试剂盒。在一个方面中,本发明提供了细胞培养装置,其包括:包含微生物营养培养基的基底;覆盖营养培养基的多孔膜;以及与基底配合以遮盖所述膜和营养培养基的盖子。营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长。在某些实施方案中,基底包含聚苯乙烯。基底也可包括周向凹槽,横跨所述周向凹槽封接所述膜。所述膜包括,例如,混合纤维素酯膜。膜可以是基本上无发射光和基本上无反射的和/或黑色的。

[0009] 在其它的实施方案中,生长区域在样品采集前具有100-450 μm 的平整度或在样品采集后具有300-500 μm 的平整度。营养培养基可以维持或不维持在周向区域中的微生物的生长。膜可以通过封接至基底的薄膜附接于基底。备选地,装置可进一步包括应用于基底和周向区域的薄膜,其中该薄膜将膜粘附于基底。

[0010] 在另一方面中,本发明提供了这样的细胞培养装置,其包括:包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域(例如,约100-450微米的平整度),其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长;覆盖营养培养基的薄膜,其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分;和与基底配合以遮盖营养培养基的盖子。在另一个实施方案中,该装置还包括与暴露的生长区域接触的多孔膜。

[0011] 在另一方面中,本发明提供了用于细胞培养的包括细胞培养装置的试剂盒,该装置包括包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域(例如,约100-450微米的平整度),其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的

生长;和覆盖营养培养基的薄膜(例如,无孔薄膜),其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分;配置用于放置在平面生长区域的暴露部分上的多孔膜;和与基底配合以遮盖膜和营养培养基的盖子。在另一个实施方案中,薄膜具有用于将膜放置到生长区域上的基准标志。在一个实施方案中,试剂盒也包括过滤装置,例如WO 2007/038478中的装置,WO 2007/038478通过引用并入此处。

[0012] 在本发明的任何装置或试剂盒的一个实施方案中,盖子可以包括配置以允许对生长区域成像的光学透明材料。盖子当附接于基底时,也可以防止由微生物进入引起的污染,其中该盖子通过空气间隙与膜分隔开。装置可以在基底上包括独特的ID标签。ID标签可以为条形码或2D条形码。ID标签可以用于追踪装置身份,与自动化检测仪器和方案的装置兼容性,装置失效期,杀菌记录和其它感兴趣的信息。装置也可以包括凹槽或突出(例如,在盖子和/或装置上)以允许被人使用者或仪器对准和夹紧。在某些实施方案中,装置在侧面方向是不可压缩的,例如,以保持生长区域的平整度。在这样的实施方案中,可以将一个或多个机械支持元件并入该装置以在侧面方向提供刚性。在其它的实施方案中,装置包含例如由发射光的塑料、印刷的荧光材料、压花的荧光材料制成的基准标志或暴露荧光介质、材料或塑料的通孔,其位于例如生长区域之外。对于具有可分离膜的装置,基准标志可以是位于样品过滤透过的区域之外的膜中的通孔。这样的通孔可以暴露出荧光的营养培养基、塑料或印刷的材料。基准标志可以应用于将膜与生长区域对准和/或应用于自动化对准从装置中采集的多个图像。

[0013] 在另一个实施方案中,基底与盖子配合以防止基底相对于盖子大于约50 μ m的旋转。

[0014] 在另一个实施方案中,本发明提供了装置或试剂盒,其中基底具有底面及环绕底面周界延伸并从底面向上延伸的侧壁,其中营养培养基在基底的侧壁之内,并且盖子具有顶面和环绕顶面周界延伸且从顶面向下延伸的侧壁;其中该盖子可逆性地固定到基底(例如,盖子通过轴向压力或盖子相对于基底的旋转固定到基底)。

[0015] 在另一个实施方案中,盖子或基底也包括从基底的侧壁或从盖子的侧壁侧向延伸的周向轮缘(例如,连续的或非连续的)和从基底的侧壁或从盖子的侧壁侧向延伸的第一掣子,其中该周向轮缘具有远离盖子的顶部或基底的底部面向的近侧侧部,朝向盖子的顶部或基底的底部面向的远侧侧部,和连接近侧侧部和远侧侧部的侧向边缘,其中该盖子具有周向轮缘且该基底具有至少一个第一掣子,或该盖子具有至少一个第一掣子且该基底具有周向轮缘,并且其中该盖子通过周向轮缘和至少一个第一掣子之间的相互接合固定到基底。在另一个实施方案中,该侧向延伸的至少一个第一掣子限定第一掣子和基底的底面或盖子的顶面之间的间隙,其中将该间隙调整大小以容纳周向轮缘,并且该第一掣子接合周向轮缘的远侧侧部。第一掣子可以备选地接合周向轮缘的侧向边缘。装置可以包括至少一个从侧壁上侧向延伸的第二掣子,其中周向轮缘包括截口,并且第二掣子接合该截口。本发明的另一个实施方案可以包括装置,其中轮缘的远侧侧部被倾斜,并且该至少一个第一掣子通过盖子相对于基底的相对旋转接合到轮缘的远侧侧部。装置可以包括多个周向轮缘和第一掣子,其中盖子通过90度或更少(例如,45度或更少)的相对旋转固定到基底。装置可以包括在盖子或基底上的止挡,该止挡阻止周向轮缘在规定量的旋转后的旋转。

[0016] 在另一方面中,本发明提供了包括细胞培养装置的试剂盒,该装置包括包含微生物营养培养基的基底;和覆盖营养培养基的多孔膜,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且其中营养培养基能够维持在生长区域中的微生物;附接于基底并防止由微生物进入引起的污染的保护盖,其中该保护盖通过空气间隙与膜分隔开;和当将保护盖取下时可附接于基底的光学盖子,该光学盖子包括配置以当附接于基底时允许对生长区域成像的光学透明材料。

[0017] 在进一步的方面中,本发明提供了包括细胞培养装置的试剂盒,该装置包括包含微生物营养培养基的基底,其中该营养培养基具有在基底上凸起的平面生长区域,其中该营养培养基能够维持在生长区域中的微生物的生长;覆盖营养培养基的薄膜,其中该薄膜和该营养培养基具有从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分;配置用于放置在平面生长区域的暴露部分上的多孔膜;附接于基底并防止由微生物进入引起的污染的保护盖,其中该保护盖通过空气间隙与生长区域分隔开;和当将保护盖取下时可附接于基底的光学盖子,该光学盖子包括配置以当附接于基底时允许对生长区域成像的光学透明材料。试剂盒也可以包括如本文所述的过滤装置。

[0018] 本发明特征还在于通过如下步骤监控微生物的存在情况的方法:提供本发明的装置或试剂盒;将装置的生长区域与一定体积的空气或表面接触;孵育装置以允许微生物的生长;并确定微生物的生长程度。代表性的表面包括工业和实验室表面和服装。在某些实施方案中,通过滚动装置以便让周向区域和生长区域接触表面或通过让所述体积的空气在生长区域上通过来收集样品。生长的程度可通过对生长区域光学成像进行确定。可对图像进行分析以定量微生物的数量。可重复孵育和确定步骤以确定随时间生长的微生物菌落。

[0019] 在另一方面中,本发明提供了通过如下步骤监控在样品中的微生物的存在情况的方法:提供本发明的装置或试剂盒,将样品通过膜过滤,把膜放置于生长区域上,孵育装置以允许微生物的生长;并确定微生物生长的程度。生长的程度可通过对生长区域光学成像进行确定。可对图像进行分析以定量微生物的数量。可重复孵育和确定步骤以确定随时间而生长的微生物菌落。

[0020] “基本上无发射光的”物体意指不发射光(例如,通过荧光、磷光或冷光)的物体。

[0021] “基本上无反射的”物体意指反射小于25%、10%、5%、1%或0.1%的用于成像该物体的光的物体。

[0022] “固定构件”意指连接或粘附两个实体的机械机构方面的组件或特征。代表性的固定构件为线、扣锁(catch)、掣子、轮缘、插销、钩、扣子、搭扣、卡口固定件、J-形钩、L-形钩、齿、突起、肋材、弹簧舌、突出物(tab)、凹槽、止挡、凹口(notch)、孔、截口、压配合、过盈配合、卡配合(jam fit)、凸轮和凸轮止挡。“固定”意指两个实体之间配合、连接或形成联合,其中两个实体相对于彼此的旋转是有限的。

[0023] “周向”是指环绕周界。对于本发明的目的,周向不局限于圆环形形状。

[0024] 其它特征和优点依据下面的说明书、附图和权利要求将会是显而易见的。

[0025] 附图简述

[0026] 图1A为本发明的装置的分解图。图1B为在取下盖子的情况下装置的照片。

[0027] 图2A-2B为本发明的装置的截面图。图2A为在使用装置之前带有安装好的保护盖

的装置的截面图。图2B为带有安装好的光学盖子的装置的截面图。

[0028] 图3A-3B为展示膜附接于基底的详图的截面图。图3A为展示膨胀槽的装置部件的截面图。图3B为展示薄膜或边缘涂层以及膨胀槽的位置的装置部件的示意性描绘图。

[0029] 图4为本发明的装置的基底的描绘图,该装置包括用于贴条形码的区域、机械支持元件(肋条)、双重周向侧壁、用于对准和夹紧的凹槽(V特征)以及用于光学对准的特征。

[0030] 图5A为本发明的装置的分解图,该装置包括保护盖,带有基准标志(虚线)的周向薄膜,带有营养培养基和生长区域的基底,以及条形码标签。图5B为本发明的装置的照片,该装置包括带有基准标志(虚线)的周向薄膜,带有营养培养基和生长区域的基底,以及覆盖生长区域并部分地覆盖周向薄膜的带有周向基准通孔的膜。

[0031] 图6为本发明的装置的示意性描绘图,该装置包括带有周向轮缘的光学盖子以及带有三个第一掣子(搭扣掣子,图6的详图A)和三个第二掣子(对中掣子,图6的详图B)的基底。

[0032] 图7为本发明的装置的示意性描绘图,该装置包括带有截口的周向轮缘的盖子(在图7中的详图D)和带有三个第一掣子(球掣子,在图7中的详图B)、三个第三掣子(对中掣子,在图7中的详图C)和九个第二掣子(在图7中的详图A)的基底,这些掣子配置以填充在截口中。

[0033] 图8为本发明的装置的示意性描绘图,该装置包括具有非连续的周向轮缘的盖子(见在图8中的详图A)和带有与盖子的非连续轮缘互补的两种掣子的基底。基底的掣子相对于周线以约40度分隔开。第一掣子(见图8的详图C)和第二掣子(见图8的详图B)接合非连续轮缘。盖子还具有可见的标记(轮缘特征)。

[0034] 图9为本发明的装置的示意性描绘图,该装置包括具有两个非连续的倾斜的周向轮缘的盖子以及具有三个第一掣子和两个止挡(凸轮止挡,在图9中的详图A)的基底。

[0035] 图10为本发明的装置的照片,该装置包括基底,覆盖营养培养基的膜,以及向基底倾斜的周向区域。另外,可以在周向区域中看到基准标志(点)。

[0036] 图11为生长在装置上和对人眼可见的微生物菌落的照片。

[0037] 图12A-12C为展示装置在监控不同类型的环境样品中的应用的一套图像:空气(图12A),表面例如工作区域(图12B),以及服装例如手套或袖套(图12C)。

[0038] 图13A为过滤装置的分解图,该过滤装置包括漏斗、带有基准标志的膜、网眼支撑垫和过滤基底。图13B为装配好的过滤装置的照片。

[0039] 图14A-14D为展示使用过滤装置和本发明的装置监控液体样品的一套图像。图14A为装配好的过滤装置、保护盖和本发明的装置的照片。图14B为通过在过滤装置中的膜过滤样品的照片。图14C为拆卸开的过滤装置的照片,该照片展示了漏斗、在过滤基底上的膜、保护盖和本发明的装置。图14D为展示将膜转移到本发明的装置的照片,其中该膜与在周向轮缘上的基准标志放置一致且膜中的基准标志(周向通孔)允许对准从膜采集的多个图像。

[0040] 发明详述

[0041] 本发明特征在于用于捕获和培养微生物(例如,细菌、真菌或原生生物)的装置和试剂盒,及使用该装置和试剂盒以检测在环境样品中的微生物的方法。该装置对快速的环境监控有用和可以用于收集微生物,例如,通过在表面上滚动该装置。随后孵育装置以使得采集得到的任何微生物生长成菌落,该菌落指示微生物的污染。

[0042] 装置

[0043] 本发明的细胞培养装置促进样品收集,样品生长,以及对在样品中的微生物的检测。本发明的装置允许对各种各样的应用进行有效地、成本有效地且稳健地微生物监控。

[0044] 装置,例如,如(图1A-1B)中所示,包括包含被多孔膜覆盖的营养培养基的基底。膜与营养培养基保形接触。膜和营养培养基形成被倾斜的周向区域环绕的平面生长区域。在优选的实施方案中,膜允许营养物透过并维持在生长区域中但不在周向区域中的微生物的生长。在本发明的一个方面中,装置可用于微生物的自动化检测,例如使用Growth Direct™ 系统用于快速菌落计数的微生物的自动化检测,例如,如在美国公开号2003/0082516中所描述,该公开通过引用并入此处。装置可以具有任意适当的大小,例如,RODAC™ 板那样。

[0045] 基底可以是基本上无发射光的且无反射的并可以由任意合适的材料制成,例如,聚苯乙烯或其他塑料。基底也可具有周向凹槽(也被称为膨胀槽),其可以用于膜的附接(例如,如图2和3中所示)。基底可以通过本领域中已知的方法例如注射模塑法制造。

[0046] 装置,例如,基底和/或盖子,可以包括在装置中用于夹紧或对准的凹槽(例如,如图4中所示)或突起。在某些实施方案中,装置在侧面方向是不可压缩的。例如,装置可以包含一个或多个机械支持元件(图4)以在操作中保持生长区域的平整度。

[0047] 装置包括多孔膜,例如,一种具有与自发荧光微生物的小菌落的检测相称的荧光性质的多孔膜。例如,膜是对于自发荧光微生物的小菌落的检测基本上无发射光和无反射。膜可以由以下材料制成,这些材料包括纤维素、醋酸纤维素、聚苯乙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚对苯二甲酸乙二酯(PET)、聚烯烃、乙烯-醋酸乙烯酯、聚丙烯、聚砜、聚四氟乙烯、尼龙和硅树脂共聚物。膜的选择在某种程度上取决于培养的细胞的种类(例如,附着于表面生长的微生物(锚着依赖的)、悬浮生长的微生物(锚着非依赖的)或附着于表面生长或悬浮生长的微生物)、渗透度及流体和气体的转运速率。代表性的膜是黑色混合纤维素酯膜(Sartorius AG)。

[0048] 将膜置于营养培养基之上以便膜和培养基保形接触。膜和营养培养基形成在基底上凸起的在边缘周围具有周向倾斜的区域的平面生长区域。这样的设计使得装置适合于接触测试,例如,通过在表面上滚动装置。膜和营养培养基形成生长区域,其在横跨例如10、15、20、25、30、35或50 cm²,优选至少25 cm²的面积为平面的。在营养培养基上的膜具有如制造好的约100-600 μm,例如200-350 μm,例如约300 μm,或收集样品后的300-500 μm,例如约450 μm的平整度。膜优选为工厂安装好的并且在产品的使用期限中保湿。膜具有孔以便沉积于膜上的微生物可以从下面的营养培养基中获得营养物。膜孔大小的实例为0.45 μm和0.22 μm。

[0049] 可将固体或半固体营养生长培养基应用于本装置。实例包括沙氏葡萄糖琼脂(SDA)、R2A琼脂、胰酪胨琼脂(TSA) letheen和平板计数琼脂(PCA)。可将培养基以熔化液体状态灌注到基底上并随后让它凝固为在基底上凸起的平面生长区域和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域。生长区域的平整度可以通过表面张力和通过垂直于重力方向填充进行控制。生长区域的平整度还可以用几种备选的方法获得。例如,一种获得平面生长区域的方法包括灌注熔化的营养培养基到预先附接的湿膜的下面。在这种备选方法中,将膜预先附接于在底部上具有开口的基底上。该开口用于填充熔化的营养培养基,例如,琼脂。填充之后,随后用覆盖物或薄膜将该开口封接。将膜周向封接以防止渗漏。在填充过程

中膜扩大或膨胀并可通过俘获在适当形状的巢或腔中而定形。另一种获得平整度的方法是将基底中间部分向下预先弯曲大约150–200 μm ,例如,使用真空。将营养培养基灌入,一旦培养基以凹入的表面的形式凝固,释放弯曲力,生长区域弹回到平面状态。备选地,营养培养基可以是装有多孔基质中的液体培养基,该多孔基质被定形为具有平面生长区域和倾斜的周向区域。

[0050] 在使用中,优选将膜固定以防止剥落。可通过热封将膜安装到基底,例如,通过桥接在周向凹槽上。凹槽(图3A)允许膜在不起皱的情况下扩大。凹槽还俘获在附接期间形成的任何水分。备选地,可以使用周向薄膜(例如,由PET、co-PET、醋酸酯或聚酰亚胺制成)将膜附接于装置,该周向薄膜可以用于限定生长区域的边缘。薄膜可制成黑色的。薄膜可以是基本上无发射光的和/或无反射的。薄膜可以包含几层(图3B)。这样的层允许在不损坏膜的情况下热熔合到膜上,低荧光和/或低反射。薄膜也可以遮盖周向区域以防止在平面生长区域之外的微生物的生长。例如对于成像或视觉检查而言,这种布置有益于将生长限制于装置的区域。

[0051] 在备选的设计中,装置不包括完整的膜。这种装置也包括在基底上凸起的营养培养基,平面生长区域,覆盖营养培养基的周向区域的薄膜(图5A和5B),和从平面生长区域的边缘向基底倾斜的周向区域。装置包括覆盖周向区域(完全地或部分地)的薄膜,并且该薄膜具有开口以暴露出平面生长区域的一部分。薄膜上的开口和营养培养基形成生长区域,其为横跨例如10、15、20、25、30、35或50 cm^2 ,优选至少25 cm^2 的面积。合适的薄膜包括任意无孔的或疏水的塑料或材料,例如,PET、co-PET、醋酸酯或聚酰亚胺。可以将薄膜制成黑色的。薄膜可以是基本上无发射光的和/或无反射的。生长区域提供了表面,其上可以覆盖多孔膜,例如,暴露于样品的多孔膜。营养培养基提供在覆盖的膜的顶面上的生物体的维持的生长,从而提供用于污染的检测和细胞培养的装置。

[0052] 装置还包括盖子。盖子例如不接触膜并防止装置在使用前被污染的保护盖(图2A)。盖子还可以是具有用于成像生长区域(例如,用可见光或紫外光)的光学透明的窗口的光学盖子(图2B)。盖子的代表性的材料为Zeonor® 1060R(聚环烯烃树脂,Zeon Chemicals LP)。也可以使用玻璃。也可将光学盖子在使用前用作保护盖。将盖子配合到基底以将膜和营养培养基同外界污染封隔。盖子可以通过本领域中已知的方法(例如,注射模塑法)制造。盖子的全部或部分可以是无发射光的和/或无反射的。

[0053] 使用既存在于盖子也存在于基底上的固定构件将盖子固定到基底。盖子和基底可以可逆性地固定或接合,其中可将该盖子和基底多次分开并重附接。将盖子固定到基底沿轴向方向(z-轴)相对于基底附接盖子,从而封接装置。固定构件可以提供盖子相对于沿侧向方向(x-轴和y-轴)固定的基底的对准。优选地,盖子保护基底并且还防止盖子相对于基底的旋转(例如,至低于50 μm)。

[0054] 盖子可以通过轴向压力固定到基底。例如,一旦施加轴向力到盖子上,盖子上的周向轮缘(图6)和基底上的掣子(搭扣掣子,图6,详图A)可用于固定盖子到基底。当周向轮缘越过掣子时,掣子偏转。周向轮缘停止于基底的底面和搭扣掣子之间的间隙中。搭扣掣子(图6的详图A)可具有尖突起以减少搭扣掣子的接触表面面积,从而增加施加到周向轮缘上的单位面积的力。除了搭扣掣子,也可用向周向轮缘的侧向侧边施加压力的对中掣子(图6的详图B),从而固定盖子的位置。相对于基底的光学盖子的位置的可再现性对于提高自动

化样品成像的一致性是很重要的。固定和防止光学盖子的移动提高了自动化成像分析的可再现性。

[0055] 在备选的实施方式中,基底可以包括环绕基底的周界的多个球掣子(图7的详图B),多个第二掣子(图7的详图A),和多个对中掣子(图7的详图C)。将盖子通过周向轮缘固定到基底第一掣子(图7)。第二掣子帮助将盖子相对于基底对准。因为第二掣子(图7的详图A)填充轮缘的截面,截面的周向轮缘(图7的详图D)防止盖子相对于基底的旋转。

[0056] 可通过小于或等于90度的旋转动作将盖子固定到基底。例如,盖子可具有一系列非连续的周向轮缘(图8,详图A)。非连续的周向轮缘可以均匀地或不均匀地分布在周界周围,各自相隔约40度(图8)。一系列掣子可位于基底(图8)。展示了掣子的两种变体(图8的详图C和详图B),但可应用单一的类型。第一掣子接合到与非连续的周向轮缘的垂直部分相对的部分中周向轮缘的顶部边缘(靠近盖子的顶面的远侧边)。第二掣子接合到周向轮缘的顶部边缘(靠近盖子的顶面的远侧边)。

[0057] 也可通过小于或等于90度的旋转动作将盖子固定到基底。例如,基底包括多个掣子(图9的详图A),其经调整大小和形状以可逆性地固定到非连续的倾斜的周向轮缘(图9)。第一掣子具有水平长度,带有防止将盖子安装到错误的位置上的顶面。第一掣子通过提供上边界促进卡配合,当盖子相对于基底扭转时,所述上边界愈加与可变高度的(倾斜的)非连续的周向轮缘相互作用。止挡(凸轮止挡,图9的详图A)提供了非连续的周向轮缘的旋转边界。当轮缘旋转约90度时,周向轮缘的渐增的高度接合第一掣子,从而引起卡配合。凸轮止挡防止过度旋转,提供了周向轮缘的前缘的止挡。

[0058] 另外的用于将盖子固定到基底的非限制性的代表性的固定构件和机构包括:线、夹具、垫圈、磁铁、皇冠盖(crown cap)和摩擦配合。例如,本发明的装置的盖子可与一系列线一起配置。本发明的基底可与一系列免费赠送的线一起配置用于将盖子固定到基底。

[0059] 可使用相同的或不同的机构将保护盖和光学盖子附接于相同的基底。固定构件可以在盖子上或基底上。例如,周向轮缘可以在盖子上,掣子在基底上。备选地,掣子可以在盖子上,周向轮缘在基底上。周向轮缘也可以在盖子或基底的侧壁的内部周界或外部周界上。

[0060] 装置可包括指示盖子成功固定到基底的特征。例如,盖子上的轮缘特征(图8)可以在基底上方且在将盖子固定到基底之前是可见的。一旦将盖子固定到基底,轮缘特征在基底上方不可见,从而指示盖子和基底的成功结合。装置可包括与自动化兼容的固定构件。例如,可将固定构件调整大小和形状使得自动传送臂可接合固定元件,从而促进装置的自动化应用。

[0061] 装置还可以包括基准标志,例如,印刷的荧光材料、压花的荧光材料、发射光的塑料或暴露出荧光介质、材料或塑料的通孔。其他基准标志为本领域中已知的。基准标志可以是在生长区域之外(图5B和图10)。基准标志可以帮助将膜和装置对准(图5B)。可将基准标志用于将从相同装置中获得的多幅图像(例如,不同时期采集的)对准,或可将基准标志用于在成像仪中对准装置。基准标志可以在装置上任何适合成像的位置,例如,基底、周向区域、生长区域或盖子。

[0062] 装置还可以具有印刷或贴附在装置上的独特的ID标签以助于自动化操作或样品追踪,例如,通过Gowth Direct™系统。ID标签可以是条形码或2D条形码。ID标签可以用于追踪装置身份,同仪器和方案的装置兼容性,装置失效期,杀菌记录,以及其它感兴趣的信

息。

[0063] 使用方法

[0064] 装置可以用于监控例如在环境中的微生物的存在情况。环境样品可包括但不限于空气、表面和服装。本发明的装置和试剂盒可以应用于微生物的污染需要快速检测的任意情况,例如,实验室、医院、制造区和用于纳米技术制造和应用的“净化室”。代表性的表面样品包括不锈钢的表面、玻璃或花岗岩工作表面、墙面、地面和设备表面。表面还可以包括诸如手指和前额等解剖学结构。代表性的服装样品包括短上衣袖套、手套、护胸和可穿戴的服装的任意其他部分。方法可以包括:将装置的生长区域与一定体积的空气或表面接触;孵育装置以允许微生物的生长(孵育可以发生在室温、高于室温或低于室温);并确定微生物的生长的程度,例如,通过菌落的手动计数或自动化计数(如图11所示)。任何可以培养的微生物,包括细菌、蓝细菌、原生生物和真菌都可以和本文所述装置结合应用。装置可以用于需氧的和厌氧的测试。

[0065] 可以通过滚动装置以便周向区域和生长区域接触表面收集样品。该表面可以是,例如,工作表面例如实验室表面或工业表面(图12B),服装(图12C),或手套(图12C)。在本发明的另一方面中,空气样品可以通过例如在空气监控仪中(图12A)让一定体积的空气在生长区域上通过或通过让装置不盖盖子一段时间进行测试。

[0066] 在收集样品后,装置通常使用光学盖子遮盖,并且为微生物生长进行孵育,例如,在培养箱中处于高于或低于室温的温度下进行孵育。在一个实施方案中,在收集样品之后,为了孵育和成像将装置放置于Growth Direct™系统中。可在预定的时间间隔对装置进行成像,并可通过合适的本领域中已知的方法(例如荧光(通过自发荧光或染色)、反射率或吸光度)对微生物进行检测。备选地,可以将活体染料引入到营养培养基中并在生长期间被吸收入微生物中。可以重复检测以将生长的菌落和不生长的微生物或碎片辨明。可对微生物的图像进行数字式或用胶卷记录。在储存期间,可将装置的光学盖子手动地或使用自动化操作移去并替换为保护盖。可将保护盖使用一个或多个固定构件可逆性地固定到基底。可以使用一个或多个固定构件将光学盖子可逆性地固定到基底。

[0067] 备选地,可通过将样品通过膜过滤并随后将该膜施用于本发明的装置进行样品收集。例如,可将膜和过滤装置(图13A和13B,和图14A)用于过滤液体样品,从而将任何污染微生物收集到膜上。如图13A-13B所示,代表性的过滤装置包括将膜夹于过滤基底的漏斗。在过滤期间,膜通过网眼支持垫支持以保持平整度。其他过滤装置为本领域中已知的,例如,如在W0 2007/038478中所描述。将感兴趣的样品通过膜以收集微生物(图14B)。将膜从过滤装置中取下并覆盖于配置以容纳膜的装置的营养培养基上(图14C-14D)。可将膜相对于薄膜上的基准标志(虚线)对准。膜可以包含基准标志,例如,过滤区域之外的区域上的通孔。这些通孔可以用于暴露出否则被膜所遮盖的荧光介质、塑料或印刷材料。膜可以具有比暴露出的生长区域更大的直径且与周向薄膜重叠。膜可以通过由营养物浸湿粘附于生长区域。随后按前面所描述将膜和装置遮盖,孵育,并成像。

[0068] 其它用于手动的或自动化的菌落计数的能与该装置一起使用的方法和仪器为本领域中已知的。

[0069] 用于环境监控和过滤的试剂盒

[0070] 本发明特征还在于试剂盒,其包括装置、保护盖和光学盖子。可将试剂盒在保护盖

安装在装置上的情况下进行运送。可将带有保护盖的装置和光学盖子分别或一起包装于无菌包装中。在使用中,将保护盖取下,完成取样,并随后将光学盖子安装上。

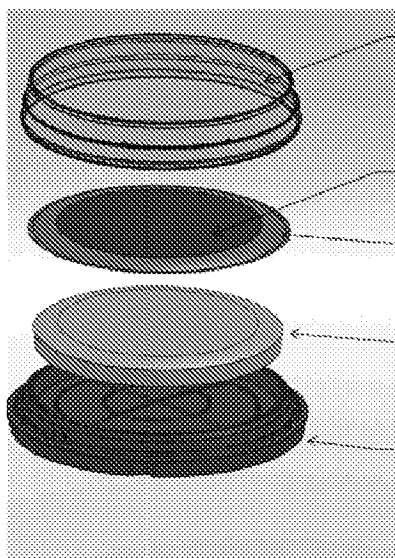
[0071] 备选地,本发明特征还在于试剂盒,其包括装置、保护盖、膜和光学盖子。可将试剂盒在保护盖安装在装置上的情况下运送。可将带有保护盖的装置、膜和光学盖子分别或一起包装于无菌包装中。在使用中,将保护盖取下,完成取样,并随后将光学盖子安装上。这种试剂盒还可以包括如本文所论述的过滤装置。

[0072] 其他实施方案

[0073] 在上面说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请通过引用并入此处。在不违背本发明的范围和精神的情况下,本发明所述的方法和系统的各种修改和变更对于那些本领域技术人员将会是显而易见的。尽管本发明已结合具体的实施方案进行描述,但是应理解所要求的本发明不应过度地局限于这些具体的实施方案。实际上,对于那些本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的所述方式的各种修改意图在本发明的范围中。

[0074] 其他实施方案在权利要求中。

A



光学盖子

膜（例如， $0.45\mu\text{m}$
黑色的，MCE）
薄膜

营养培养基（例如，
TSA Letheen 琼脂）

基底（例如，83mm，
聚苯乙烯）

B

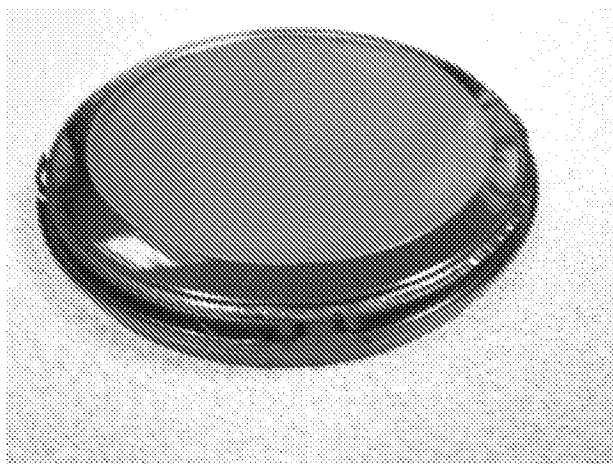
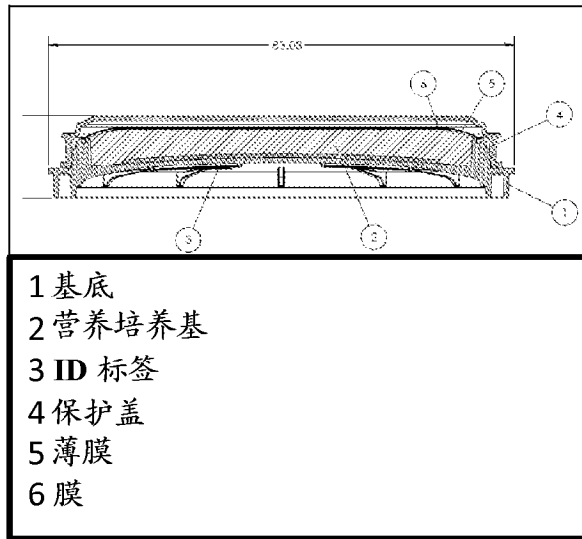


图 1

A

带有保护盖



B

带有光学盖子

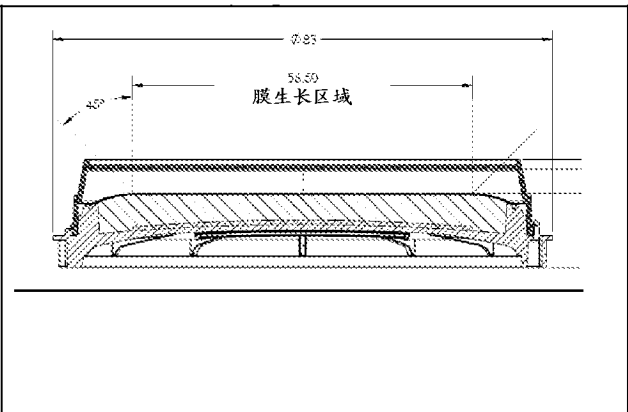
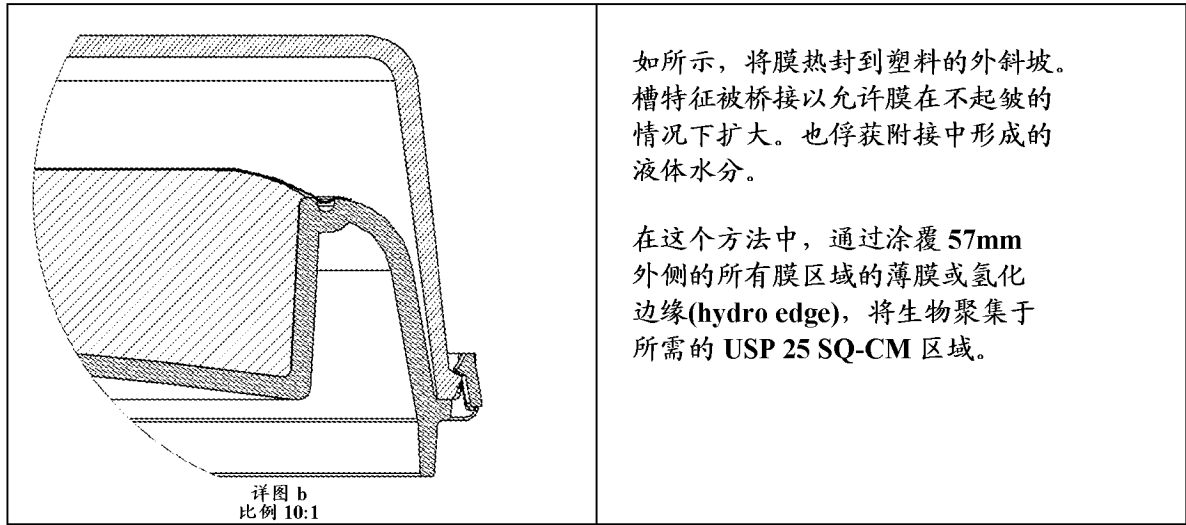


图 2

A

膜附接和聚集生物的详图



B

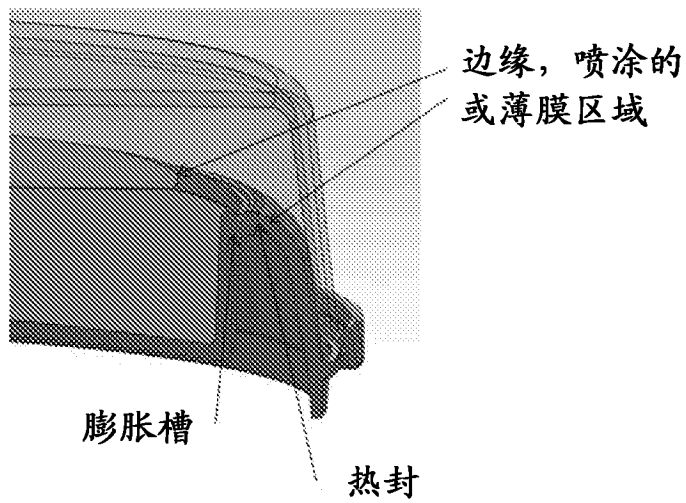


图 3

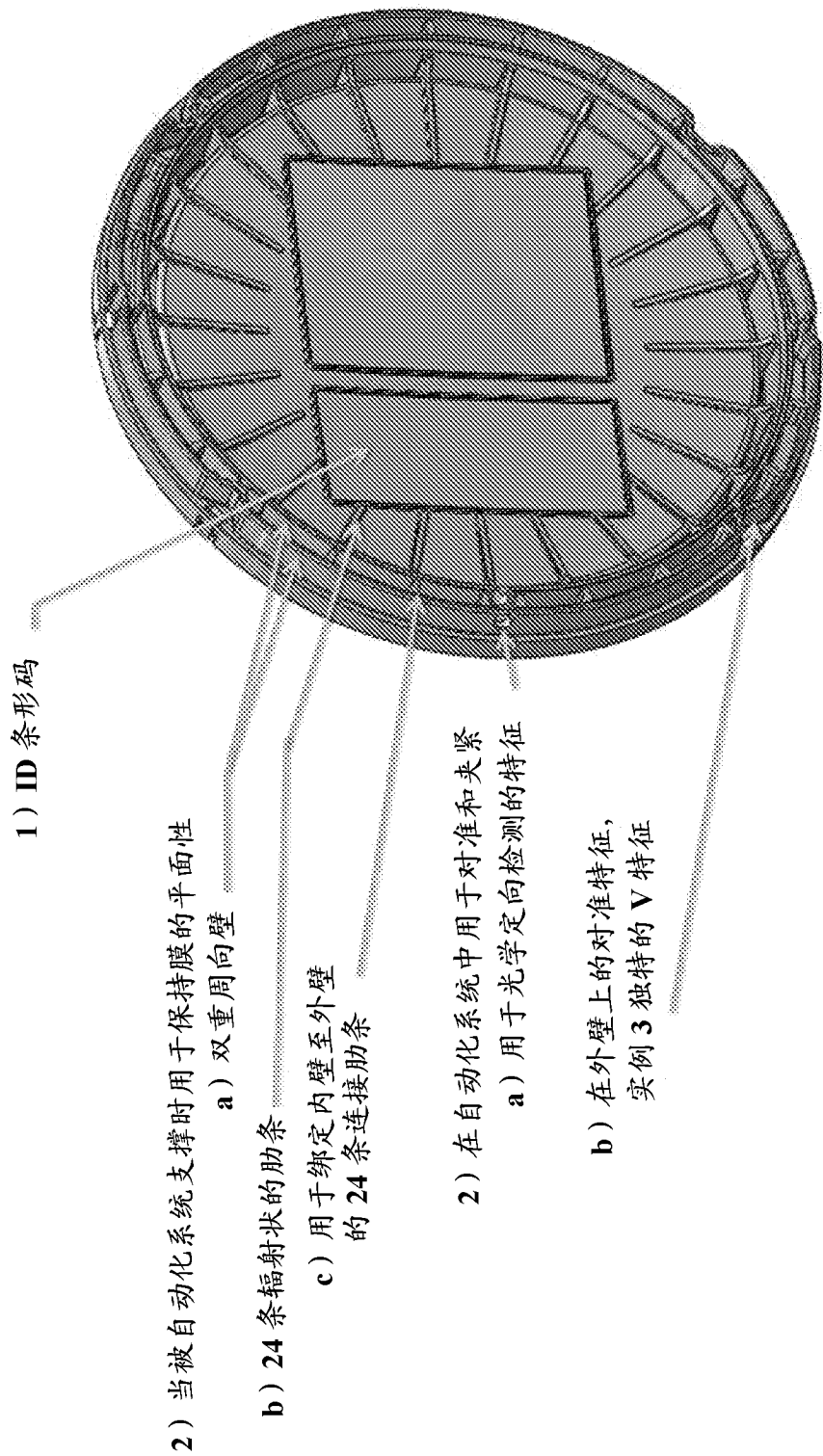
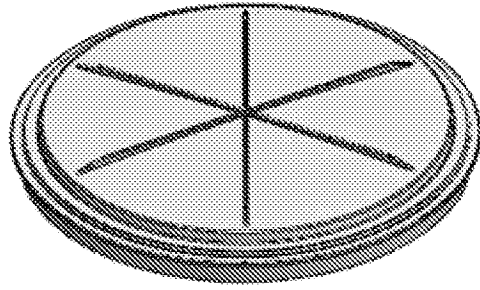
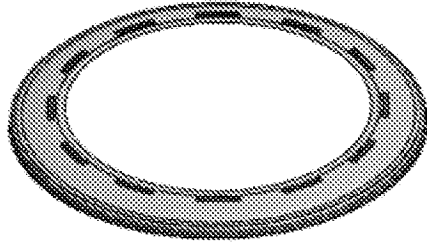
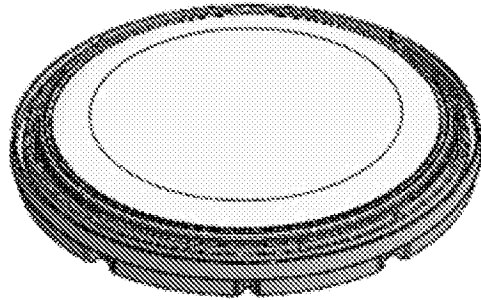


图 4

A



保护盖

薄膜（掩蔽物）w/
基准标志盒基底
(cassette base)

ID 标签

B

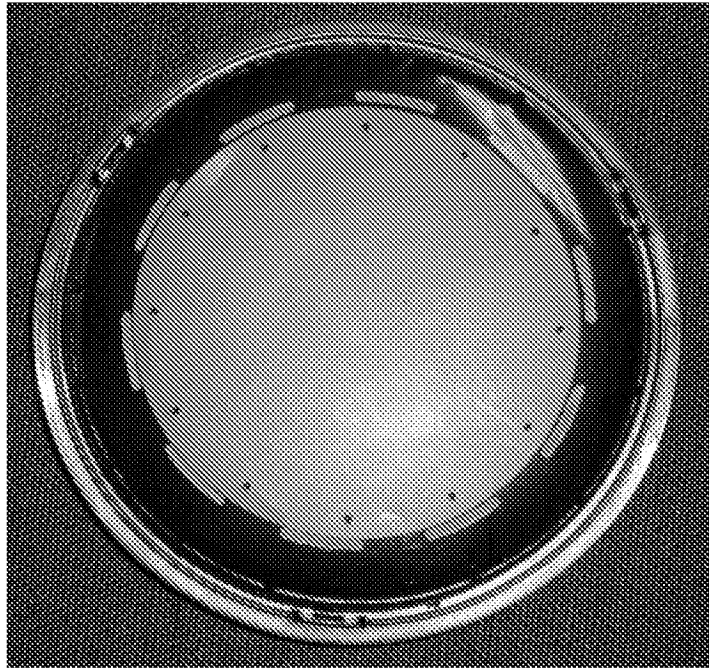


图 5

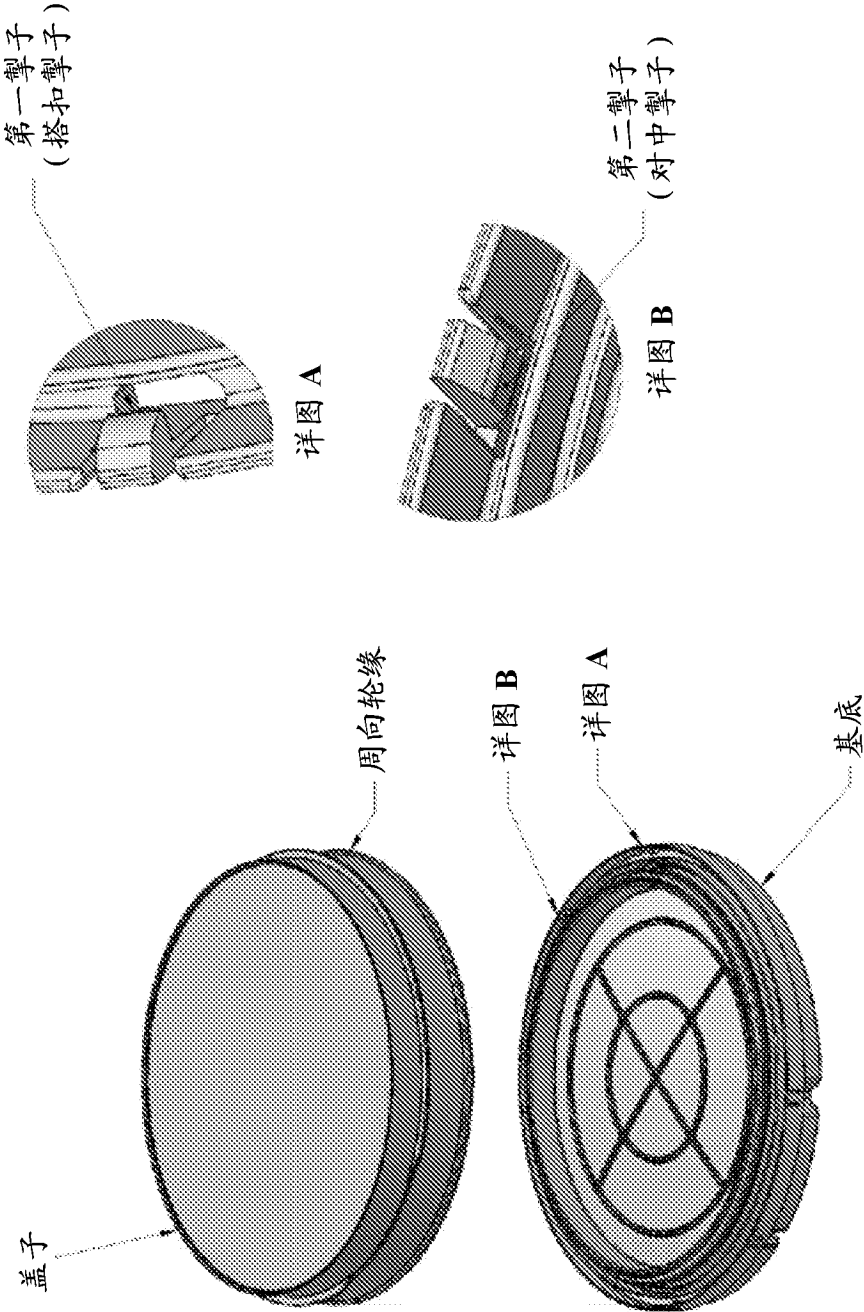


图 6

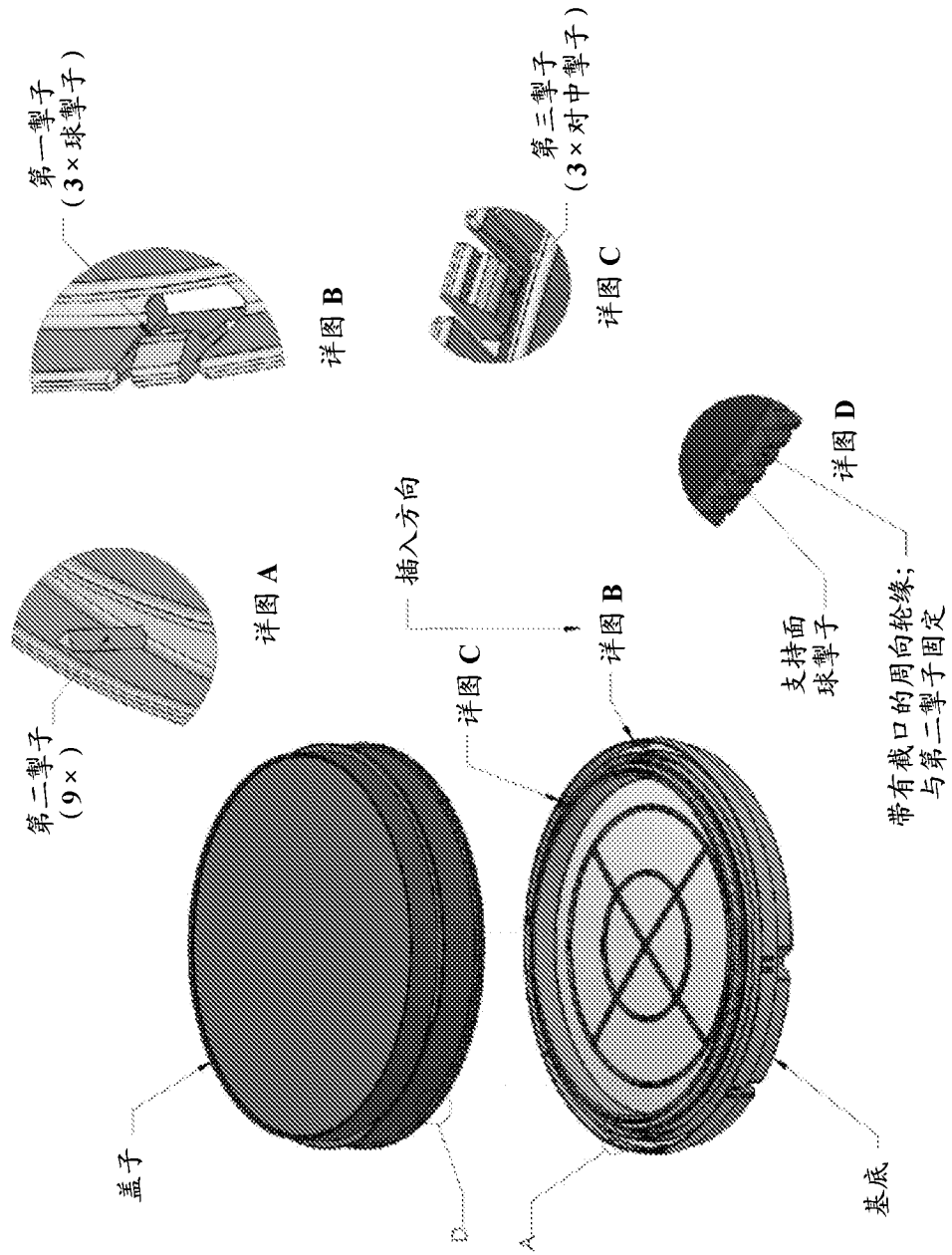


图 7

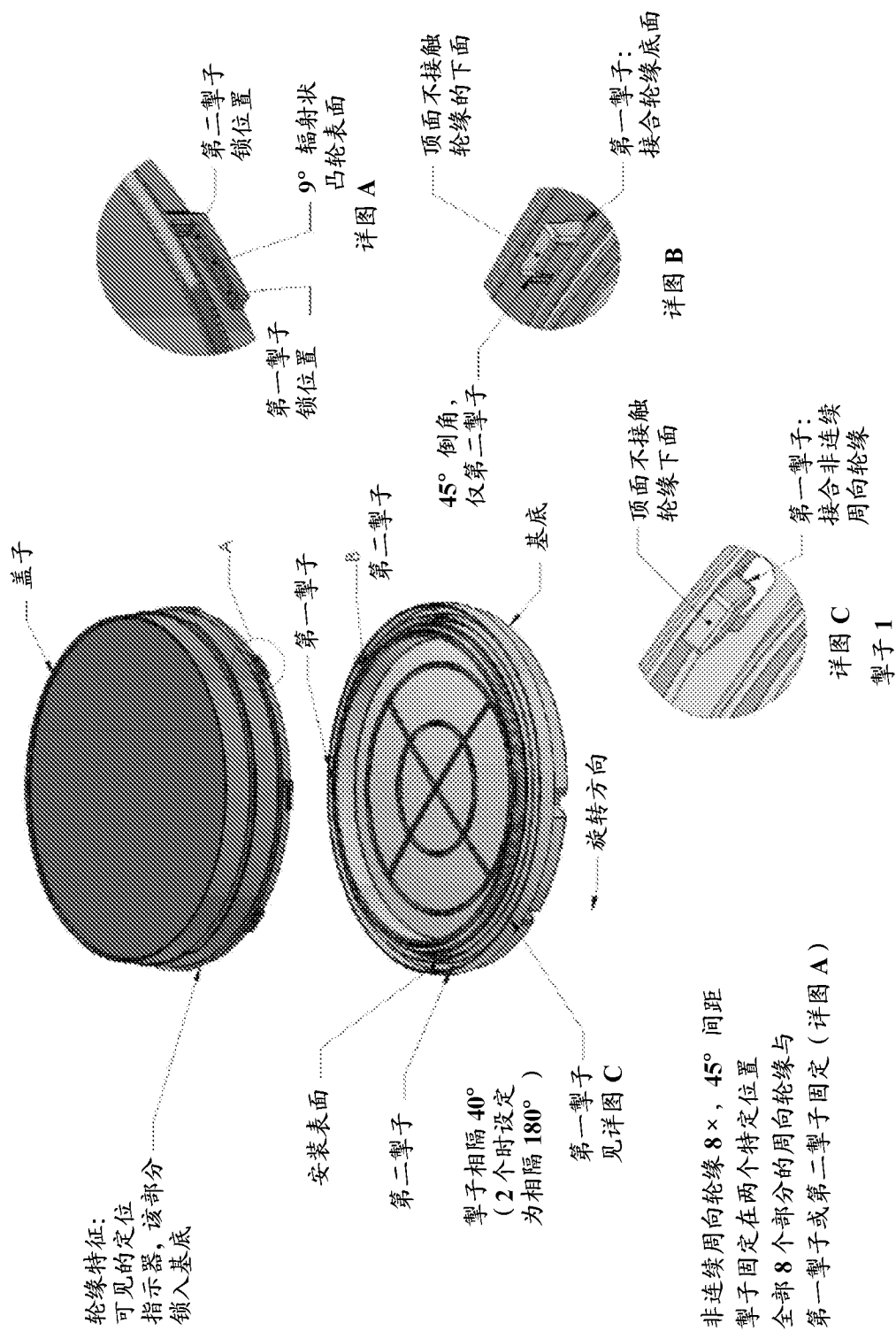


图 8

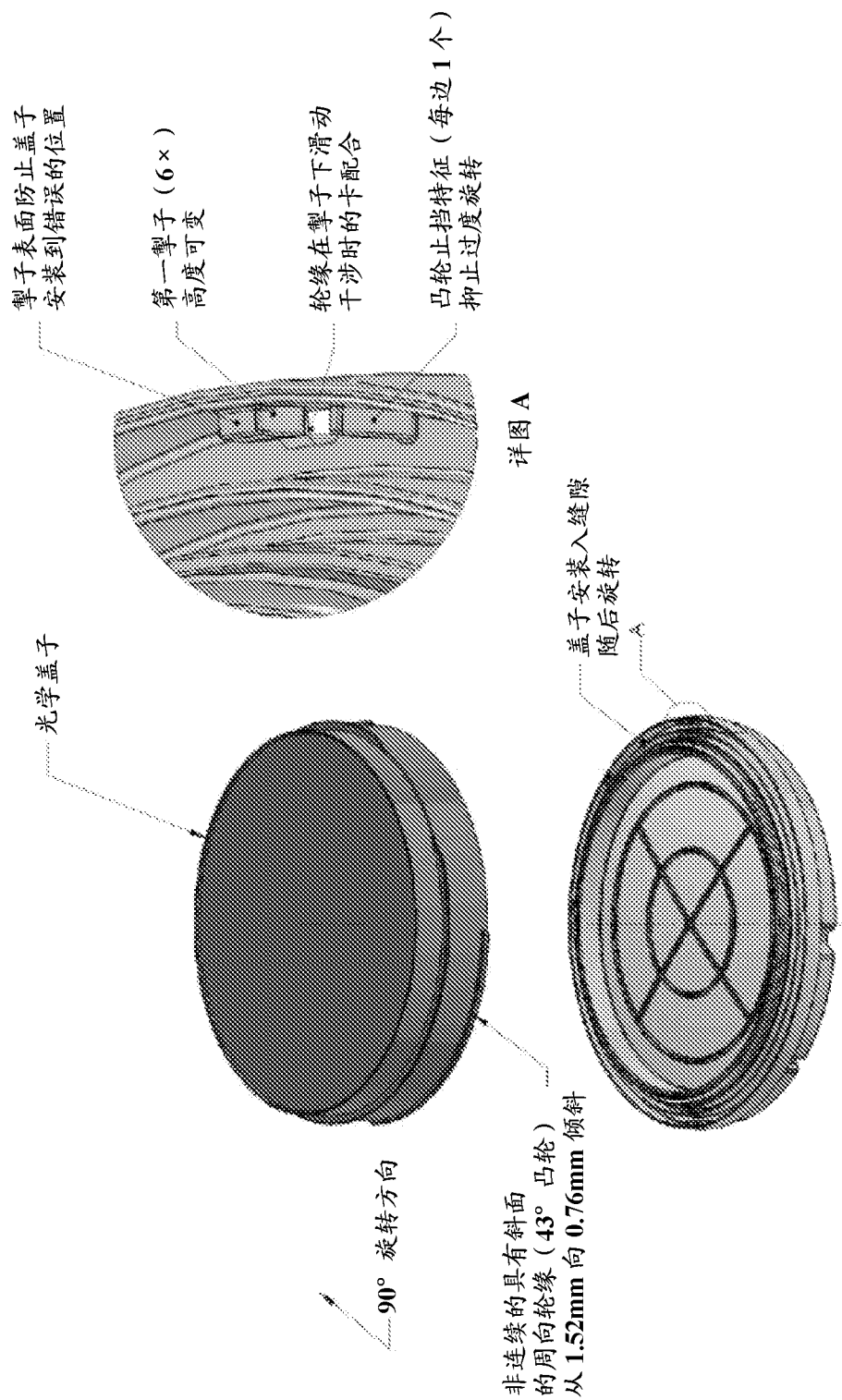


图 9



图 10

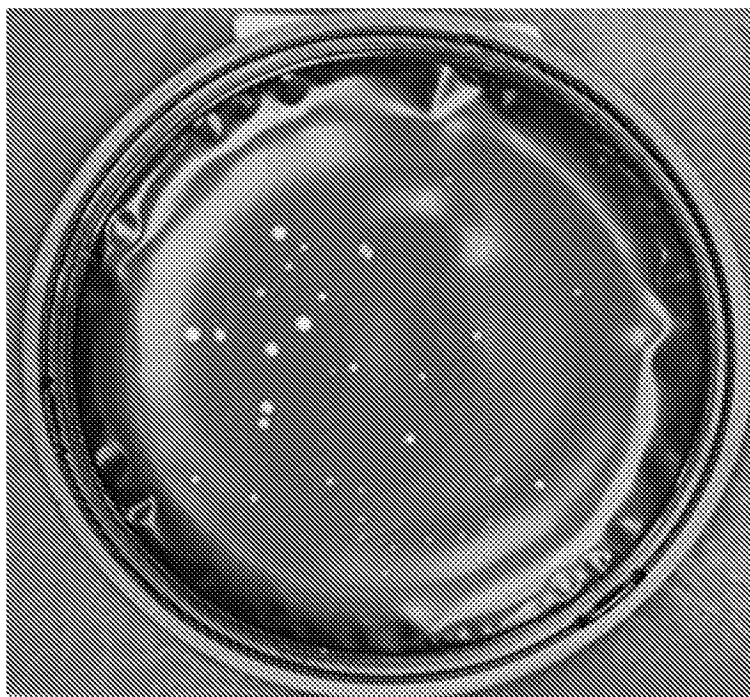
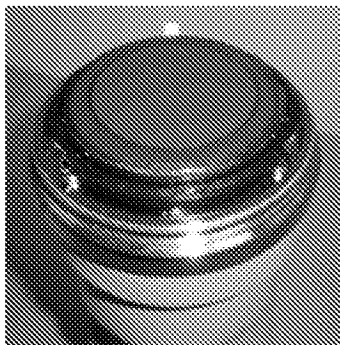
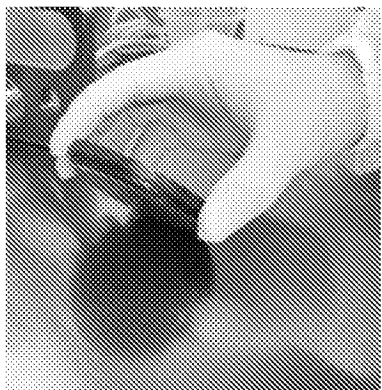


图 11

A



B



C

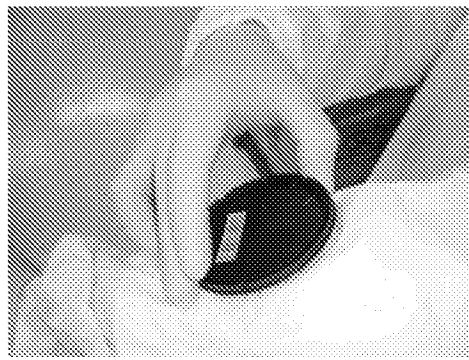
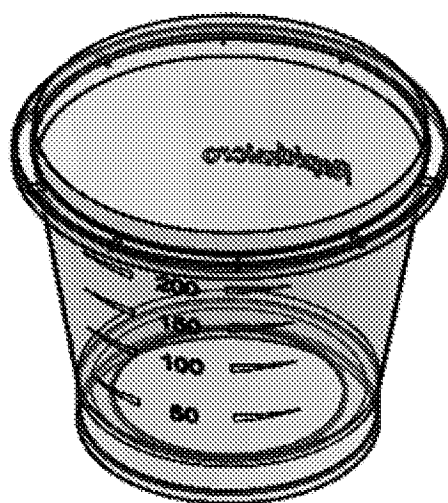
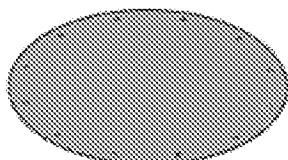


图 12

A



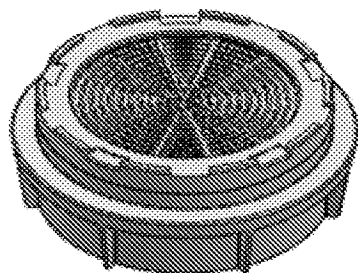
漏斗



带有基准标志的膜



网眼支撑垫



过滤基底

B

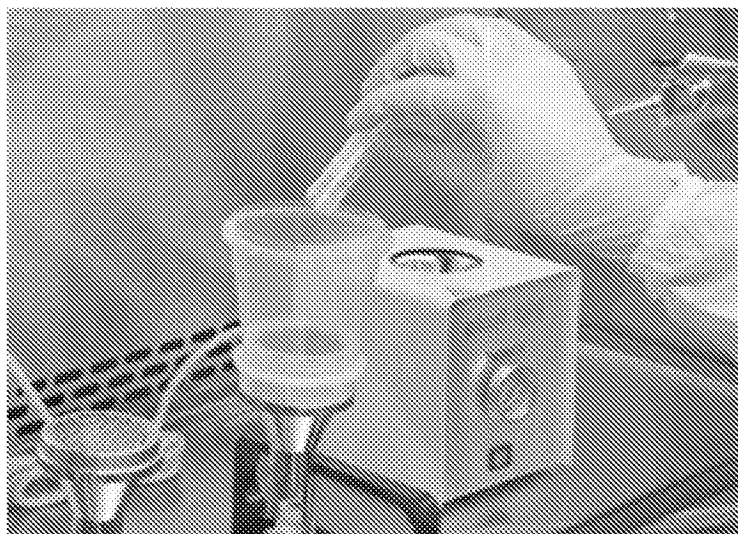


图 13

A



B



C



D

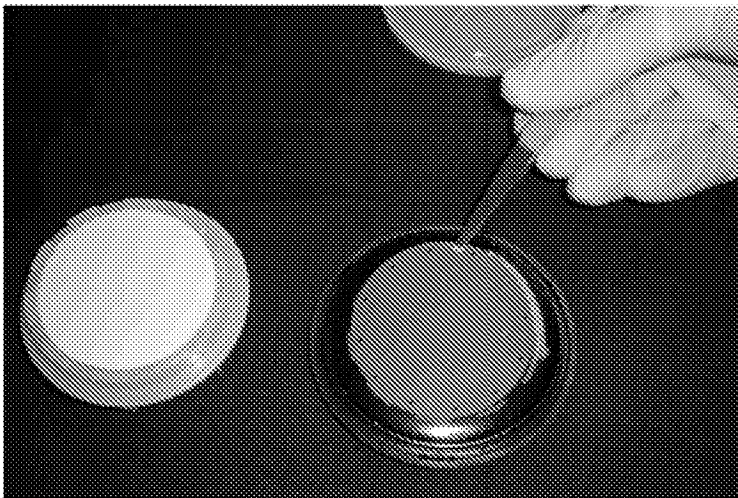


图 14