

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12M 1/12 (2006.01)

B01D 63/02 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01812039.3

[45] 授权公告日 2007 年 3 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 1303201C

[22] 申请日 2001.6.8 [21] 申请号 01812039.3

[30] 优先权

[32] 2000. 6. 9 [33] FR [31] 00/07459

[86] 国际申请 PCT/FR2001/001786 2001. 6. 8

[87] 国际公布 WO2001/094527 法 2001. 12. 13

[85] 进入国家阶段日期 2002. 12. 30

[73] 专利权人 比奥·麦利尤股份有限公司

地址 法国马西埃图瓦勒

[72] 发明人 E·吉约 L·杜兰德-布鲁里勒

S·布尔特奥

[56] 参考文献

CN1155580A 1997. 7. 30

CN1041706A 1990. 5. 2

GB2339155A 2000. 1. 19

审查员 朱洪杰

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

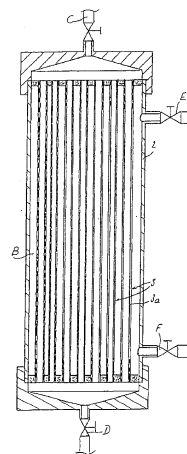
权利要求书 4 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称

从体积较大的样品中制备要分析的样品

[57] 摘要

本发明涉及过滤装置的使用，该过滤装置包括室(2)，在室(2)中有许多相互平行排列着的空心纤维(3)，这些纤维的多孔壁(3a)限定了孔(4)，这样所述装置包括内部通路(A)和对应于这些纤维和圆盘分离器之间的有效体积的外部通路(B)；该装置用于处理呈稀释状态的含有多种不同大小的微生物的大体积起始液体样品。本发明的特征是，在进行至少一个浓缩步骤期间，仅需要一个过滤装置，纤维的多孔壁(3a)的原子质量单位阈值是确定的，以留住起始样品中最小的微生物，所述装置以正向模式和间断地使用，从而提供出口液体样品，即浓缩物。



1. 一种过滤装置的用途，该过滤装置包括室(2)，在室(2)中有许多相互平行排列着的空心纤维(3)，这些纤维的多孔壁(3a)限定了孔(4)，这样所述装置包括由所述各个空心纤维的许多平行的孔(4)组成的内部通路(A)和对应于这些纤维和该室之间的有效体积的外部通路(B)；该装置用于处理呈稀释状态的、含有多种不同大小的微生物的大体积起始液体样品，以获得呈浓缩状态的、含有相同的相应组分的微生物的小体积最终液体样品；在使用这种装置时，要进行至少一个浓缩步骤，其中：

a. 采用单过滤装置；

b. 以正向模式使用所述过滤装置；

c. 确定纤维的多孔壁(3a)的截留阈值，以留住起始样品中尺寸最小的微生物；并间断地进行以下步骤：

d. 在过滤阶段，通过过滤装置的内部通路(A)导入所有的起始液体样品，从该过滤装置的外部通路(B)移出滤液，浓缩物在导入液体样品的所述通路中积聚；

e. 在收集阶段，在使所有的样品通过后，起始液体样品在所述过滤装置(1)中从内部通路到外部通路的流通停止，获得出口液体样品，即浓缩物；

f. 在反洗阶段，将没有微生物的液体从外部通路环流通过内部通路。

2. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，在过滤阶段(d)和收集阶段(e)之间，外部通路是空的。

3. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，在过滤阶段(d)和收集阶段(e)之间，外部通路是空的，并且用空气增压。

4. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，在浓缩物的自流作用下进行收集阶段(e)，和/或通过使增压空气进入内部通路而进行收集阶段(e)。

5. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，在进行过滤阶段(d)期间，通过将起始液体样品传送到内部通路的入口和/或在所述外部通路的出口处抽吸，使该样品环流通过该内部通路。

6. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，进行所述过滤阶段(d)时没有预过滤所述起始液体样品。

7. 如权利要求1所述的用途，其特征在于，所述过滤装置是超滤装置。

8. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的纤维由有机膜组成, 或者由无机膜组成。

9. 如权利要求 8 所述的用途, 其特征在于, 所述有机膜由乙酸钠纤维素、乙基纤维素、聚醚砜或聚丙烯腈制成。

10. 如权利要求 8 所示的用途, 其特征在于, 所述有机膜由陶瓷制成。

11. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的空心纤维的两端埋植于树脂中, 以防止污染物在内部通路(A)和外部通路(B)之间以及该过滤装置和外部之间的任何通过。

12. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的大小确定, 过滤阶段的时间长度确定, 这样起始样品与最终样品之间的体积比值至少等于 50。

13. 如权利要求 12 所述的用途, 其特征在于, 所述起始样品与最终样品之间的体积比值在 150-500 之间。

14. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 进行至少两步连续的浓缩步骤, 这两个步骤使用权利要求 1 所述的浓缩装置进行, 在第一次浓缩步骤结束时获得的浓缩物构成第二次浓缩步骤的起始液体样品。

15. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, 对一份液体样品进行至少两次连续的处理, 至少一个这样的处理是权利要求 1-3 中任一项所述的浓缩步骤, 第一次处理结束时获得的浓缩物构成第二次处理的起始液体样品。

16. 如前述任一项权利要求所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置被加工成所需尺寸, 所述处理进行的时间长度是确定的, 这样, 起始样品与最终样品的体积比值至少等于 5000。

17. 如权利要求 16 所述的用途, 其特征在于, 所述起始样品与最终样品的体积比值在 15000-100000 之间。

18. 一种过滤装置的用途, 该过滤装置包括室(2), 在室(2)中有许多相互平行排列着的空心纤维(3), 这些纤维的多孔壁(3a)限定了孔(4), 这样所述装置包括由所述各个空心纤维的许多平行的孔(4)组成的内部通路(A)和对应于这些纤维和该室之间的有效体积的外部通路(B); 该装置用于处理呈稀释状态的、含有多种不同大小的微生物的大体积起始液体样品, 以获得呈浓缩状态的、含有相同的相应组分的微生物的小体积最终液体样品; 在使用这种装置时, 要进行至少一个浓缩步骤, 其中:

- a. 采用单过滤装置;
- b. 以正向模式使用所述过滤装置;
- c. 确定纤维的多孔壁(3a)的截留阈值, 以留住起始样品中尺寸最小的微生物; 并间断地进行以下步骤:
 - d. 在过滤阶段, 通过过滤装置的外部通路(B)导入所有的起始液体样品, 从该过滤装置的内部通路(A)移出滤液, 浓缩物在导入液体样品的所述通路中积聚;
 - e. 在收集阶段, 在使所有的样品通过后, 起始液体样品在所述过滤装置(1)中从外部通路到内部通路的流通停止, 获得出口液体样品, 即浓缩物。
- 19. 如权利要求 18 所述的用途, 其特征在于, 在过滤阶段(d)和收集阶段(e)之间, 外部通路被部分或完全排空。
- 20. 如权利要求 18 所述的用途, 其特征在于, 在反洗阶段, 将没有微生物的液体从内部通路环流通过外部通路。
- 21. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 在过滤阶段(d)和收集阶段(e)之间, 外部通路被部分或完全排空。
- 22. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 通过洗脱外部通路中的浓缩物而获得最终液体样品。
- 23. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 进行所述过滤阶段(d)时没有预过滤所述起始液体样品。
- 24. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置是超滤装置。
- 25. 如权利要求 18-20 所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的纤维由有机膜组成, 或者由无机膜如陶瓷组成。
- 26. 如权利要求 25 所示的用途, 其特征在于, 所述有机膜是陶瓷。
- 27. 如权利要求 25 所述的用途, 其特征在于, 所述有机膜由乙酸钠纤维素、乙基纤维素、聚醚砜或聚丙烯腈制成。
- 28. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的空心纤维的两端埋植于树脂中, 以防止污染物在内部通路(A)和外部通路(B)之间以及该过滤装置和外部之间的任何通过。
- 29. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途, 其特征在于, 所述过滤装置的大小确定, 过滤阶段的时间长度确定, 这样起始样品与最终样品之间的体积比值至少

等于 50。

30. 如权利要求 29 所述的用途，其特征在于，所述起始样品与最终样品之间的体积比值在 150-500 之间。

31. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途，其特征在于，进行至少两步连续的浓缩步骤，这两个步骤使用权利要求 18 所述的浓缩装置进行，在第一次浓缩步骤结束时获得的浓缩物构成第二次浓缩步骤的起始液体样品。

32. 如权利要求 18-20 中任一项所述的用途，其特征在于，对一份液体样品进行至少两次连续的处理，至少一个这样的处理是权利要求 18-19 中任一项所述的浓缩步骤，第一次处理结束时获得的浓缩物构成第二次处理的起始液体样品。

33. 如权利要求 32 所述的用途，其特征在于，所述过滤装置被加工成所需尺寸，所述处理进行的时间长度是确定的，这样，起始样品与最终样品的体积比值至少等于 5000。

34. 如权利要求 33 所述的用途，其特征在于，所述起始样品与最终样品之间的体积比值在 15000-100000 之间。

从体积较大的样品中制备要分析的样品

本发明涉及分析存在于液体介质中的污染物的领域，该分析要求对处于稀释状态的、含有大量不同大小的微生物(病毒、细菌、寄生虫)以及各种有机或无机大分子的大体积样品进行处理，以获得呈浓缩状态的、含有实际上相同的相应组分的污染物的小体积最终液体样品。

采用生化或生物分析技术，尤其是免疫检测和分子生物学技术(例如多样品检测)，使得这种污染物(具体是微生物)的富集和小体积分析的要求成为必要。

已知采用例如吸附的方法分离和浓缩微生物，尤其是病毒。除了这些方法不能保证这些微生物的存活力以外，它们还不可能获得与上述分析技术相匹配的体积的样品。

用于收集液体介质中的微生物的其它方法需要过滤方法，并需要对仅仅一种类型的微生物进行分析，但不总会提供要获得的定量结果。

例如，对于细菌和寄生虫的例子，可按照标准化方法的建议，根据种类使用孔径为 0.2-1 μ m 的平面薄膜。

FR-B-2693474 中描述了一种以切线超滤为基础的技术，该技术以常规的方式使用一种或多种膜，使各种大小的微生物得以分离，而同时确保了这些微生物的存活力。

但是，对于最终液体样品的体积的要求使得该技术不可能用于制备采用生化或生物学分析技术进行分析的样品。

对于微过滤膜的性能，还可从 Otaki 等〔《水科学技术》(Wat. Sci. Tech.), 37, 10, 107-116, 1998〕的方法得到证实，该方法是以连续和切线模式在空心纤维上使用超滤装置，通过从供应源(分别为滤液和浓缩物)抽取样品，周期性地对抽取物进行分析。

切线式过滤和超滤方法的采用要求存在一种线路，该线路使全部或一些浓缩物再环流，以便在膜上维持一种切向速度，使悬浮液中的颗粒被过滤，而同时避免所使用的膜发生快速的堵塞〔《微过滤和超滤——原理和应用》(Microfiltration and

Ultrafiltration—Principles and Applications), Leos J. Zwman, Andrew L. Zydny, Marcel Dekker, Inc., 纽约—巴塞尔—香港, 1996]。

过滤液体的再循环使过滤时间延长, 而且还会产生额外的体积, 该体积中的一些浓缩物和微生物又不能以不影响最终体积的方式收集。

由于管道系统的体积以及洗脱液的体积而产生的大体积浓缩物需要抽提可能仍留在壁上的微生物, 过滤时间的延长也使得这些技术不适合于要求进行小体积分析以及迅速获得结果的分析方法, 例如, 答复有关饮用水或人用的其它任何液体的污染的询问。

本发明的目的是使用一种过滤装置, 使其可能在有限长的时间内从大且预定的体积的起始液体样品中获得用于分析的样品, 该用于分析的样品的体积小至足以采用生化的或生物学的分析技术进行分析(例如多样品检测), 尤其是免疫检测和分子生物学技术, 而同时又能确保这些微生物的存活力。

本发明的过滤装置的基础是以正向模式在空心纤维上进行的超滤技术。

与切向模式相对, 正向模式是指使用上述过滤装置使起始液体样品以单通路的方式通过, 而没有至少一些相同的样品循环回到上述过滤装置的入口。

采用这种正向模式超滤方法使获得小体积浓缩物成为可能, 可以在 1 小时的时间范围内以单通路的方式浓缩样品, 而同时确保微生物的存活力、多次收集以及 100% 级别的得率。

“多次收集”指从最终样品中收集实际上存在于起始样品中的所有不同类型或种类的微生物的可能性。

由于在如其它装置上存在辅助管道系统(如循环管道系统)和沿着空心纤维总长度的孔隙度的可靠性而不存在称为死体积的体积的缘故, 故获得了这些高得率。

在阅读结合附图进行描述的说明书之后, 将会理解所采用的过滤装置的特征, 其中, 图 1 以纵剖面示意性地描述本发明的过滤装置, 图 2 描述了相同过滤装置横截面的放大图。纤维的尺寸被故意放大, 以利于理解本发明。

该过滤装置包括室(2), 在室(2)中有许多相互平行排列着的空心纤维(3), 这些纤维的多孔壁(3a)限定了孔(4), 这样所述装置包括由所述各个空心纤维的许多平行的孔(4)组成的内部通路(A)和对应于这些纤维和该室之间的有效体积的外部通路(B)。

根据本发明, 这个装置用于处理呈稀释状态的、含有多种不同大小的微生物

的大体积起始液体样品，以获得呈浓缩状态的、含有相同组成的微生物的小体积最终液体样品。

在使用这种装置时，要进行至少一个浓缩步骤，其中：

- a) 采用单过滤装置；
- b) 以正向模式使用所述过滤装置；
- c) 确定纤维的多孔壁(3a)的截留阈值，以留住起始样品中尺寸最小的微生物；并间断地进行以下步骤：

d) 在过滤阶段，通过过滤装置的通路(A, B)导入所有的起始液体样品，通过该过滤装置的其它通路(B, A)移出滤液，浓缩物在导入液体样品的通路中积聚；

e) 在收集阶段，在使所有的样品通过后，起始液体样品在所述过滤装置(1)中从所述通路到所述其它通路的流通停止，从浓缩物获得出口液体样品。

采用重力作用的简单方法或者使用压缩气体或通过物理搅拌所述过滤装置，可收集由浓缩物形成的出口液体样品，但也可使用任何适当的物质进行洗脱，从而进行收集，如使用 PBS 盐水溶液(如，120mmol NaCl, 2.7mmol KCl, 10mmol NaH_2PO_4)的微生物例子中，该溶液中可能含有去污剂 TWEEN 20 和或表面活性剂 BSA(牛血清白蛋白)。

根据另一实施例，对由浓缩物形成的出口液体样品进行第二个浓缩步骤，在此第二浓缩阶段中，该出口液体样品为起始液体样品。

空心纤维的壁(3a)可由能制造确定的孔隙度的空心纤维的任何材料制成，如有机膜，如乙酸纤维素、乙基纤维素、聚醚砜或聚丙烯腈，或者是无机膜，如陶瓷。

确定这些纤维的多孔壁(3a)的截留阈值，以留住起始样品中尺寸最小的微生物。因此，所使用的纤维，对于超滤而言，其孔隙度为 10-100nm，这样浓缩物中将包含尺寸超过病毒的所有微生物，其中也包括病毒。但是，如果对所寻找的颗粒的尺寸有特殊要求，尤其是在颗粒小于 10nm 的情况中，则可使用用于纳米级过滤的孔隙度为 1-10nm 的纤维。

根据一个实施例，导入起始样品的通路是内部通路(A)，抽提出口样品的通路是外部通路(B)，这样微生物在纤维内积聚，形成浓缩物，而滤液沿着纤维和室(B)之间的有效体积中的纤维外部流过。

由阀门(C)将由体积为如 10-100 升的收回样品的水溶液组成的要处理的样品

导入组件的空心纤维中，由蠕动式泵或者其它任何装置〔如由滤液一侧阀门(E)产生的低压〕的吸入作用而带走，而阀门(D)和阀门(F)仍保持关闭。

当所有要处理的体积通过该组件时，停止泵的运转，关闭阀门(C)，使其与样品源分离。

然后如通过阀门(F)给该组件施加大气压〔如打开阀门(E)〕，然后增加压力，例如增加到 0.5bar 的压缩空气，然后再次关闭阀门(E)，从而排空该室，移出滤液。

然后打开阀门(C)，在重力作用下从阀门(D)收集浓缩物，以关闭阀门(C)和将压缩空气注入纤维中来终止收集。

根据另一实施例，导入起始样品的通路是外部通路(B)，抽提出口样品的通路是内部通路(A)，这样微生物在纤维和室之间的有效体积中的纤维外部积聚，形成浓缩物，滤液则沿着纤维的内部流过而被去除。

通过阀门(E)将由体积为如 10-100 升的收回样品的水溶液组成的要处理的样品导入室中，通过施加例如由蠕动式泵或其它任何装置进行的吸入作用产生的低压而带走，这种低压是由如阀门(D)施加在空心纤维内的滤液一侧上，而阀门(C)仍保持关闭。

当所有要处理的体积通过该组件时，保持该泵运转，使阀门(E)与样品源断开，以减少该组件的室中含有的浓缩物的体积，这种减少可以是完全的或者是部分的减少。

当达到所需浓缩物的浓度水平时，使泵停止运转，将阀门(D)和其它所有的阀门一起关闭。

可将洗脱液导入室中，然后搅拌该组件，之后通过阀门(F)收集浓缩物或洗脱物，也可以从阀门(E)注入压缩空气而终止收集。

为了限制吸附现象，可预先用如 TWEEN 型去污剂和/或 BSA(牛血清白蛋白)型表面活性剂处理纤维。

根据一实施例，如果有可能分析液体的悬浮物含量的话，那么进行过滤阶段(C)，起始液体样品无需预过滤。

在通过内部通路(A)导入的方法中，所获得的浓缩物的体积与过滤装置的尺寸直接相关；对于通过外部通路(B)导入的方法，所述浓缩物的体积并不依赖于过滤装置的尺寸，而依赖于室中剩下的体积和/或导入该室中的洗脱液的体积。

限定过滤装置的大小，以使起始样品的体积和所获得的浓缩物的体积之比至

少等于 50, 较佳在 150-500 之间, 过滤时间在 20 分钟到一小时之间。

如果可以如此应用, 则该组件可在反洗或用去污染剂处理后再次使用, 例如使用 50ppm 的氯溶液以及可能的酶处理。

根据导入样品的通路是内部通路(A)还是外部通路(B), 可采用两种反洗方法, 以与用于分析的样品导入的流向相对的方向导入洗涤水。

当样品是通过阀门(C)由内部通路(A)导入时, 可使用传送装置〔如放置于水源和所述阀门之间的蠕动式泵〕由阀门(F)导入自来水, 进行反洗, 关闭阀门(D), 而阀门(E)暂时保持开启。

当室被充满时, 关闭阀门(E), 压迫水沿着纤维的内侧流过, 然后从阀门(C)或(D)流出。

当导入样品的通路是外部通路(B)时, 则通过阀门(D)导入自来水进行反洗, 而关闭阀门(E)和(F)。

当纤维中充满水时, 即不再看到起泡从阀门(C)中逸出时, 关闭此阀门, 强迫水通过室中的纤维的外周, 以通过阀门(E)或阀门(F)流出。

也可单次使用该组件, 可进行如 γ 射线灭菌处理对其进行初始的灭菌。

在另一实施例中, 可使用无密封的组件, 因为这可以避免外部污染的任何风险(组件外部的流体, 如周围的空气); 这也可避免从浓缩物穿过污染物的密封到达滤液的任何通道。如图 1 所示, 将空心纤维的两端埋植在树脂中可以实现密封, 从而可防止污染物的任何泄漏, 有些并不是具有密封的系统中发生的情况。

在另一实施例中, 为了获得与所采用的分析方法向适应的浓缩物的体积, 可对所获得的浓缩物进行第二次浓缩步骤。

在这个第二次浓缩步骤中, 所使用的过滤装置可以与第一次步骤所使用的装置相同, 但其体积较小, 这个体积是根据起始体积和所需的浓缩物体积之间的比值计算得到的。

由于所处理的体积是一百毫升级别的, 所以可使用已知的装置, 如采用离心分离技术的过滤装置, 如 Millipore 销售的名为 Centricon-Plus 80 的装置。

这些过滤装置是被加工成所需尺寸, 并且处理进行的时间长度是确定的, 这样起始样品的体积和最终样品的体积之间的比值至少等于 5000, 较佳在 15000 到 100000 之间。

因此, 使用本发明的过滤装置具有以下优点: 可进行多次收集, 每次收集

存在于用于分析的大体积液体中的微生物的得率接近 100%，并确保由此收集得到的微生物的存活力，所进行的多次收集的时间至多为 1 小时，这适合于如连续的健康监测的需求，并且获得的用于分析的浓缩物的体积可用于生化或生物学分析技术，尤其是免疫检测和分子生物学技术。

下面的实施例非限制性地阐述了本发明过滤装置的使用。

实施例 1

装置和方法：

使用的过滤装置包括 1m² 的过滤面积，该面积由空心的乙酸纤维素纤维构成；

通过内部通路导入由掺入 MS2 噬菌体的 50 升的自来水组成的样品；

在重力和压力作用下收集浓缩物；

采用溶菌斑技术，定量(在连结十倍稀释样品后)或定性(在由 MS-2 敏感的细菌培养物的感染进行生物学扩增后)测量噬菌体的存活力和感染性，从而分析该浓缩物。

步骤：

先对接种物进行超声波处理，然后将其加入从水箱中取出的自来水中，以解集病毒颗粒。

加入 20mg/l 的硫代硫酸钠〔STS(Merck 106516)，即在 50 升中含有 1g 的量〕之后，在样品中加入 MS2。

进行第一次过滤循环，然后排空该室，并将其密封，放置在空气压下(0.5b)。接着，在重力作用下收集浓缩物。然后还将压缩空气(0.5b)注入纤维中，以收集保留在纤维中的最后毫升级的浓缩物。

先对浓缩物进行超声波处理，然后采用溶菌斑技术使用大肠杆菌(*E.coli*) Hfr 敏感株进行计数。

接种物的制备:

MS2 稀释度	MS2 稀释体积	SPW	最终滴度(PFU/ml)
原液	-	-	2.10^8
I10 ⁷	500 μ l 原液	9.5 ml	10^7
I10 ⁶	I10 ⁷ 的 1 ml	9 ml	10^6
I10 ⁵	I10 ⁶ 的 1 ml	9 ml	10^5
I10 ⁴	I10 ⁵ 的 1 ml	9 ml	10^4
I10 ³	I10 ⁴ 的 1 ml	9 ml	10^3
I100	I10 ³ 的 1 ml	9 ml	100
I10	I100 的 1 ml	9 ml	10
I1	I10 的 1 ml	9 ml	1

SPW = 盐水蛋白胨水; PFU = 噬斑形成单位(感染病毒单位); I10^x = 含有 10^xPFU/ml 的接种物。

过滤:

过滤 50 升的 STS 中和的自来水, 排空该室后, 收集到浓缩物, 该浓缩物构成空白对照(即空白对照 1, B1)。

在反洗以洗净膜后, 过滤 50 升 STS 中和的自来水, 然后, 在排空该室后, 收集浓缩物, 该浓缩物为空白对照 2(B2)。

在反洗以洗净膜后, 用 STS 中和 50 升自来水。

等待 15 分钟后, 取出 1 升水稀释接种物供水箱用。

使用 1 升的水稀释 1ml 的 I10(10PFU)。

在一个过滤循环后, 收集浓缩物(C10)。

进行反洗。

在这个实施例中, 用至少 20 升的水进行反洗。

然后重复相同的步骤, 加入 1ml 的 I10⁴(10⁴PFU)。

取出过滤期间的滤液样品, 得到样品(F)。过滤结束时, 收集浓缩物(C10⁴)。

将 1ml 的 I10⁴(10⁴PFU)加到 100ml 的 B1 组分中, 得到掺入的空白对照样品(BD10⁴)。

分析:

——I100、I10、I1、C10⁴、BD10⁴的定量分析

将各份纯样品和接种物的等分试样加到试管中,进行超声波处理,然后稀释。

采用溶菌斑技术给感染颗粒计数,步骤如下:

将 2ml 熔融(44℃)的软顶层琼脂(0.95%)与 1ml 的病毒悬浮液和 0.3ml 的指数生长期的大肠杆菌 Hfr 培养物混合。快速和轻微搅拌该混合物,然后将其倒入培养皿中的硬营养琼脂的整个表面上。37℃培育后,在第二天读取溶菌斑。

所得结果:

稀释度	计数				平均值	标准偏差	总平均值	备注
I 100	61	78	74	75	72.0	6.5	74.5	
I 10	9	7	17	8	10.3	4.0		
I 1	1	1	0	0	0.5	0.5		
C10 ⁴ 纯	14	13	15	*6	14.0	0.8	13.9	*6 不考虑: 读数可疑
C10 ⁴ 10 ⁻¹	1	3	1	0	1.3	1.1		
BD10 ⁴ 10 ⁻¹	61	81	60	78	70.0	9.6	78.2	
BD10 ⁴ 10 ⁻²	13	19	14	18	16.0	2.5		

例如, C10⁴ 10⁻¹ 表示从掺入 10⁴PFU 的样品中获得的浓缩物的 1/10 稀释度。

	体积 (ml)	期望滴度 (PFU/ml)	实际滴度 (PFU/ml)	期望数量 (PFU)	实际数量 (PFU)	实际值/ 期望值
I 10 ⁴	-	1.E+04	7.45E+ 03	-	-	74.5%
C 10 ⁴	325	31	14	1.E+04	4506	45.1%
BD 10 ⁴	100	1.E+02	78	1.E+04	7818	78.2%

C=	45.1%
C/BD=	57.6%
C/I=	60.4%

定性测定:

检测 I10⁷(阳性对照 = T+)、F(1 份 50ml 的样品)、B2(6 × 50ml + 剩余物, 以涵

盖整个样品)、C10(6×50ml+剩余物,以涵盖整个样品)上噬菌体的存在或缺乏。

将1体积的样品与1体积两倍浓缩的营养肉汤混合。37℃培育30分钟后,用指数生长期的大肠杆菌 Hfr 培养液接种。37℃过夜培育后(病毒繁殖期),在培养皿中的营养琼脂上平板培养大肠杆菌 Hfr 的指数生长期培养液,并使其干燥。沉积出病毒扩增肉汤,使其在37℃至少培育6小时。

在肉汤沉积点上铺满或多或少的溶菌斑的存在揭示了感染的颗粒的存在。

在感染颗粒不存在的例子中,大肠杆菌 Hfr 的生长在沉积的位置上产生厚厚一层的细胞。

	总体积	样品体积 (ml)	PFU 期望的/样品	定性测试						部分评估 (PFU/体积)	外推 (PFU/PFU)
B2	325	25	0	N						0	na
		50	0	N	N	N	N	N	N	0	na
F	50	50	0	N						0	na
C10	302	6	1	N						0/6 ml	4-6/10
		50	1.5	P	P	P	P	N	N	4-6/300 ml	
T+	na	na	na	P	P	P	P	P	P	Na	na

N: 阴性; P: 阳性; na: 不适用

结果的解释:

空白对照(B2)含有未感染的噬菌体,因此该组件之前并未受到 MS2 的污染,之后进行的 10PFU 的浓缩是有效的。

浓缩 10^4 PFU 期间采集的滤液样品(50ml)含有不可检测的 MS2,因此膜有效地保留了这种直径为 25nm 的病毒。

由于在 C10 中检测到 4 个感染单位,所以其检测阈值低于 10PFU。

因为测量涉及噬菌体的感染性,所以在没有任何具体的收集方法的情况下(没有搅拌和洗脱)加入 10^4 PFU 时实际的得率(即涉及接种物的测量滴度: C/I)为 60%,并且考虑到存活力。

C/BD 的比值非常接近该实际得率,这证明由于浓缩的缘故而没有干扰。

实施例 2:

装置和方法:

使用包括 0.6m² 的过滤面积的过滤装置，该面积由乙酸纤维素空心纤维制成。

样品由加了寄生虫小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)的卵母细胞的 50 升自来水组成。它由外部通路导入。

在重力作用和压力下搅拌和收集浓缩物。

采用 IMS-IFA(免疫磁性分离-免疫荧光检测技术，ImmunoMagnetic Separation-ImmunoFluorescence Assay 技术，参见美国环境保护机构的标准方法 1622——EPA-EPA-821-R-99-001)，使用 Dynal 抗隐孢子虫属 Dynabeads 试剂盒(参考号 730.01，与卵母细胞的完整性有关)进行分析。

步骤:

从水箱中取得自来水后，加入 20mg/l 的硫代硫酸钠(STS, Merck 106516)，即 1g/50 升；

在样品中加入小隐孢子虫(*C. parvum*)的卵母细胞；

采用外部通路方法进行过滤；

对室进行部分排空后，搅拌该组件，以依靠留在室中的液体收集纤维外表面上所有的卵母细胞，在重力作用下收集浓缩物，然后将压缩空气(0.5b)注入室中收集。

采用 IMS-IFA 给卵母细胞的原液和浓缩物的原液计数。

过滤:

方法:

过滤 50 升的 STS 中和的自来水，然后排空，收集浓缩物(空白对照，B)，此过滤结束后进行反洗，以清洁膜；

然后用 STS 中和 50 升的自来水，之后加入 I10 稀释度的卵母细胞原液(即约 10 个卵母细胞)。

过滤后进行排空，然后收集浓缩物(C10)；

此过滤结束后用至少 10 升水反洗。

然后重复相同的步骤，加入 I100(大约 100 个卵母细胞)，得到浓缩物 C100，然后加入 I1000(大约 1000 个卵母细胞)，得到浓缩物 C1000。

分析:

—采用 IMS/IFA 进行 I10、I100、I1000、B、C10、C100 和 C1000 计数。

结果:

接种物		浓缩物		得率
-	-	B	0	-
I10	4	C10	15	≈100%
I100	43	C100	57	≈100%
I1000	335	C1000	236	70%

不应对高于测量接种物所得的值的 C10 和 C100 的结果有多大的惊讶：在显微镜下计算卵母细胞数量的样品具有波动，与在计数为 1 以上、且相同的样品被倍增的情况下所看到的一样。这种现象在卵母细胞稀少时更显著。

因此，对于 C10 和 C100，在过滤恒定后必须考虑放大的倍数。

对于 C1000，也可以谈到得率。

结果的解释:

采用外部通路进行的过滤方法对 10 个或 10 个以下的卵母细胞具有敏感性。

对于 1000 个卵母细胞的接种，所得的得率是 70%，这个结果没有最佳化。

实施例 3:

除了过滤装置外，本实施例中的其它步骤和方法与实施例 1 中的相同。

使用由乙酸纤维素空心纤维制成的过滤面积为 0.6m² 的过滤装置过滤。

该样品由掺入 MS2 噬菌体的 50 升自来水组成；通过内部通路(A)导入。

在重力作用下和压力下收集浓缩物。

仅产生一个空白对照(B₁)，连续加入 1、10 和 100PFU。

如实施例 1，采用溶菌斑技术进行分析。

根据下面所述的步骤进行过滤从前述过滤步骤中得到的浓缩物的第二步。

将空白对照浓缩物(B₁)和各个噬菌体浓缩物(C₁1、C₁10、C₁100)(每份大约 230ml)等分成 3 份相同的试样(70-80ml)，以用于在 3 个市售的 Centricon-Plus 80 组件(Millipore, 参考号 UFC5LGC08)中进行第二次浓缩。

混合由此获得的各加入物的 3 份浓缩物 C_2 (<1ml), 然后采用溶菌斑技术定量分析滴度。对从浓缩物 B_1 得到的 3 份空白对照浓缩物(B_2)采用相同的步骤。

结果:

一接种物的滴度: $I100 = 144\text{PFU}$ (与实施例 1 一样, 是总的平均值);

一在第二次过滤后获得的浓缩物的滴度:

	滴度读数 (PFU)	接种物 (PFU)
B_2	0	0
C_21	2	1.44
C_210	8	14.4
C_2100	61	144

例如, C_21 表示加了 1PFU 的初始样品在进行第二步浓缩结束时所获得的 3 份浓缩物的混合物。

结果的解释:

通过这两个浓缩步骤, 将样品的体积从 50 升减少到 3ml 以下, 其敏感性接近 1PFU。

当然, 本发明并不限于所述和/或叙述的示范性例子, 而包括所有的属于附加的权利要求的范围之内的可交换的形式(尤其关于用于浓缩样品的膜的性质和特征方面)。

实施例 4:

装置和方法:

使用包括第一过滤阶段中使用的由乙酸纤维素空心纤维制成的过滤面积为 0.12m^2 的过滤装置, 和用于第二过滤阶段的 Vivacel170 消耗品(Sartorius Vivasciences, 参考号 VS6002)。

样品由同时掺入 300 个寄生虫小隐孢子虫的卵母细胞和 300 个 CFU 的大肠杆菌的 30 升自来水组成。

浓缩:

从水箱中取得水后, 加入 20mg/l 的硫代硫酸钠(Merck 106516), 即 0.6g/30l; 将小隐孢子虫的卵母细胞和大肠杆菌细胞加到样品中。

阶段 1: 从 30 升到 70ml

采用外部通路模式进行过滤。

在对室进行部分排空和搅拌该组件后, 通过将压缩空气(0.5b)注射到该室中, 收集含有上述微生物的滞留物, 大约有 35ml。

通过注射入密闭的内部腔室而将未加入微生物的中和化自来水(大约 35ml)由纤维再导入室中, 然后如先前进行搅拌和收集。

两份收集的样品的组合(即 70ml)构成滞留物 R1。

阶段 2: 从 70ml 到 300 微升

如供应商所示, 在 Vivacell170 消耗品中浓缩该滞留物 R1, 25℃时以 1000g 的离心力离心 10 分钟。为了促进收集, 在过滤室中的浓缩物中加入 1ml 的滤液, 然后使过滤元件以高速短暂地“涡旋”(vortexed)。在和先前相同的条件下进行进一步的离心操作, 获得最大体积为 300 微升的再浓缩物。这就是最终的滞留物 R2。

平行产生三份滞留物 R2, 以获得三个结果。

分析:**对小隐孢子虫的研究:**

先后采用 IMS(免疫磁性分离-Dynal 抗隐孢子虫属 Dynabeads 试剂盒, 参考号 730.01)和 IFA(免疫荧光检测)计算卵母细胞的原液和滞留物的馏分(参见方法 1622)。

根据下述步骤采用 IMS(同上)和 PCR 先后分析滞留物的馏分:

一从 IMS 中获取珠/卵母细胞复合物, 放到 10μl 的超纯无菌水+10μl 的 50% Chelex-100 的水溶液中;

一进行 5 组热冲击: 95℃2 分钟/-80℃2 分钟;

一离心沉淀浓缩物;

一加入 30μl 的扩增混合物(PCR 缓冲液, MgCl₂: 1.5mM, 牛血清白蛋白:

10pg/μl, dNTP: 200pmol/μl, Taq DNA 聚合酶: 0.5U, 引物 BB-3 和 BB-4: 各为 1pmol/μl, 加入超纯水, 使总体积达到 50μl)。

Balatbat A. B.等在《临床微生物杂志》(J. Clin. Microbiol.), 1996, 34, 1769-1772 中描述了引物 BB-3 和 BB-4。

一采用下述 PCR 程序: 94℃5 分钟, 共 40 轮循环, 其中包括: 94℃30 秒、60℃45 秒、72℃1 分钟; 然后为 72℃5 分钟。

一将 10μl PCR 反应产物移到含有 2% 琼脂糖且存在溴乙锭的电泳凝胶上进行电泳。

对大肠杆菌的研究:

根据 IDEXX 供应商的建议, 采用“Colilert 18h”技术计算大肠杆菌培养液和滞留物的馏分的数量。此方法是以大肠杆菌的β-葡糖醛酸酶活性的检测为基础。

对编码β-葡糖醛酸酶的 *uidA* 基因进行嵌套式 PCR, 从而分析滞留物的馏分, 其步骤如下:

一在膜(Millipore, 直径为 13mm, 孔隙度为 0.2μm, Durapore GVWP013 00)上过滤浓缩物馏分;

一将膜插入 0.2ml PCR 管中;

一热冲击式裂解细胞(85℃1 分钟/冰中 1 分钟, 共 6 轮);

一使用引物 U270 和 L1054 在裂解试管中进行第一次扩增

U270: 5'-ggT CAC TCA TTA Cgg CAA Ag-3'

L1054: 5'-TTA Aag CCg ACA gCA gCA gT-3'

将扩增混合物(150μl)放在含有膜的 PCR 管中: PCR 缓冲液, MgCl₂: 1.5mM, dNTP: 200pmol/μl, Taq DNA 聚合酶: 1.5U, 引物: 各为 1pmol/μl, 加入超纯水, 使总体积达到 150μl。

PCR 程序: 95℃10 分钟, 共 30 轮, 其中包括: 94℃1 分钟、60℃1 分钟; 然后维持在 4℃。

一在超纯水中稀释所得的扩增子 100 倍, 使用 1μl 此稀释液作为第二次扩增(即嵌套式 PCR)的底物, 引物为 Val 754 和 Val 900:

Val 754: 5'-AAA ACg gCA AgA AAA AgC Ag-3'

Val 900: 5'-Acg CgT ggT TAC AgT CTT gCg-3'

将扩增混合物(50 μ l)放到新的试管中: PCR 缓冲液, MgCl₂: 1.5mM, dNTP: 200pmol/ μ l, Taq DNA 聚合酶: 0.5U, 引物: 各为 1pmol/ μ l, 加入超纯水, 使总体积达到 50 μ l。

PCR 程序: 同上。

一取出 10 μ l PCR 反应产物, 将其加到含有 2% 琼脂糖且存在溴乙锭的电泳凝胶上进行电泳。

滞留物 R2 的处理:

将各滞留物分别分成 100 μ l 的 3 组馏分, 分别为 R2a、R2b 和 R2c。

再将馏分 R2a 分成两份: 采用 “Colilert 18h” 方法处理其中的 50 μ l(用于大肠杆菌计数), 另 50 μ l 由 IMS-IFA 处理(用于小隐孢子虫计数)。

采用 uidA 嵌套式 PCR 分析馏分 R2b(用于大肠杆菌的分子检测), 但在进行此分析前, 先将其等分成 2 份, 其中 50 μ l 直接用于分析, 而另 50 μ l 则加入大肠杆菌基因组 DNA(抑制试验)。

采用 IMS-PCR 分析馏分 R2c (用于小隐孢子虫的分子检测), 但在进行此分析前, 先将其等分成 2 份, 其中 50 μ l 直接用于分析, 而另 50 μ l 则加入小隐孢子虫基因组 DNA (抑制试验)。

各 PCR 有各自的阴性对照(无靶 DNA 和无滞留物)和阳性对照(具有靶 DNA 但没有滞留物)。

在溴乙锭存在的琼脂糖凝胶上进行电泳, 观察所有的扩增子。

结果:

每个点重复进行 3 次, 重复进行得到的结果在下表中用 “/” 分开。

	所分析的馏分的理论计数	结果(计数或凝胶上的条带)
大肠杆菌计数(Colilert)	50	0/1/2
<i>E.coli</i> uidA 嵌套式 PCR 检测	50	+ / + / +
uidA PCR 抑制试验	50	+ / + / +
uidA PCR 阳性对照	50	+
uidA PCR 阴性对照	50	-
小隐孢子虫计数(IMS-IFA)	50	1/11/9
小隐孢子虫 IMS-PCR 检测	50	+ / + / +

小隐孢子虫 IMS-PCR 抑制试验	50	+ / + / +
小隐孢子虫 IMS-PCR 阳性对照	50	+
小隐孢子虫 IMS-PCR 阴性对照	50	-

结果的解释:

采用 Colilert 检测到浓缩物中大肠杆菌细胞数量少乃至死亡率可解释为在浓缩过程中细菌所经受的应力所致, 因为这个试验是以酶活性的检测为基础。

uidA PCR 对于三次重复都是阳性的, 这表明该方法对于总的 50 个细菌/5 升(即每升 5 个细菌)具有可重复的敏感性。

从逻辑上说, 将细菌 DNA 加到馏分中作为抑制对照也获得阳性反应。在隐孢子虫属的例子中, 表型方法(IMS-IFA)获得比期望的理论值低得多的计数。同样, 这也可能是一些卵母细胞在浓缩过程中受到不利的影响的缘故, 而非这些卵母细胞保留在过滤装置中的缘故, 因为基于分子生物学的其它试验表明, 在 10 升中可重复收集 1 个卵母细胞(在本专利中未公开数据)。

顺便说一下, IMS-PCR 对于三次重复都是阳性的, 它获得 50 个卵母细胞/5 升的最小敏感性, 即 5 个卵母细胞/升。

结论:

本实施例阐明了采用分子生物学方法检测一份且相同的掺入水样品中的细菌和寄生虫的两步浓缩装置的有效性。

