



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101878294 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 10

(21) 申请号 200880118360. 4	C12Q 1/04 (2006. 01)
(22) 申请日 2008. 10. 02	C12Q 1/06 (2006. 01)
(30) 优先权数据	C12Q 1/14 (2006. 01)
60/977, 188 2007. 10. 03 US	C12Q 1/24 (2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	B01J 20/02 (2006. 01)
2010. 05. 28	B01J 20/06 (2006. 01)
(86) PCT国际申请的申请数据	B01J 20/14 (2006. 01)
PCT/US2008/078563 2008. 10. 02	(56) 对比文件
(87) PCT国际申请的公布数据	CN 1466549 A, 2004. 01. 07, 全文.
W02009/046183 EN 2009. 04. 09	CN 1466548 A, 2004. 01. 07, 全文.
(73) 专利权人 3M 创新有限公司	CN 1466547 A, 2004. 01. 07, 全文.
地址 美国明尼苏达州	Susannah Krack et al. Effect of Growth
(72) 发明人 曼基里·T·克希尔萨加尔	Phase and Metabolic Activity on the
图沙尔·A·克希尔萨加尔	Adhesion of Escherichia coli K-12 AB264 to
托马斯·E·伍德	Quartz and Lepidocrocite. 《Geomicrobiology
(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限	Journal》. 2007, 第 24 卷 179-187.
责任公司 11219	审查员 杨光
代理人 张爽 樊卫民	
(51) Int. Cl.	
C12N 1/02 (2006. 01)	
G01N 1/40 (2006. 01)	
C12N 11/14 (2006. 01)	

权利要求书1页 说明书13页

(54) 发明名称

微生物浓集方法

(57) 摘要

本发明描述了一种用于捕集或浓集微生物以便检测或测定的方法,所述方法包括:(a) 提供粒状浓集剂,所述浓集剂包含 γ -FeO(OH);(b) 提供包含至少一种微生物株系的流体样品;以及(c) 使所述浓集剂与所述样品接触,使得至少一部分所述浓集剂分散于所述样品中,并且至少一部分所述至少一种微生物株系被结合于所述浓集剂或被所述浓集剂捕集。

1. 一种用于非疾病诊断或治疗目的的方法,所述方法包括:(a) 提供粒状浓集剂,所述浓集剂由 γ -FeO(OH) 组成,所述 γ -FeO(OH) 由微粒的附聚物组成,所述附聚物包含最大尺寸小于 1 微米的针状微晶体,其中所述微粒的附聚物具有最大维度在 3 微米至 100 微米范围内的颗粒尺寸;(b) 提供包含至少一种微生物株系的流体样品;(c) 使所述浓集剂与所述样品接触,使得至少一部分所述浓集剂分散于所述样品中,并且至少一部分所述至少一种微生物株系被结合于所述浓集剂或被所述浓集剂捕集;其中所述微生物株系选自如下物质的株系:细菌、酵母菌、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合;以及(d) 其中所述方法还包括分离所形成的结合了微生物的浓集剂;其中所述分离通过选自重力沉降、离心、过滤以及它们的组合的方法来实现;其中所述分离至少部分通过重力沉降来实现。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括检测至少一种结合的微生物株系的存在。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述微生物株系选自革兰氏阴性细菌的株系以及它们的组合。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述接触是通过将所述浓集剂与所述样品混合来进行的。

5. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述检测是通过选自以下的方法进行的:基于培养的方法、显微镜法和其他成像方法、基因检测方法、免疫检测方法、基于生物发光的检测方法以及它们的组合。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括将所述形成的分离的浓集剂与所述样品分开。

微生物浓集方法

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求 2007 年 10 月 3 日提交的美国临时申请号 60/977, 188 的优先权, 藉此将该申请的内容以引用方式并入申请。

技术领域

[0003] 本发明涉及用于捕集或浓集微生物使得它们保持活力以便检测或测定的方法。在其他方面, 本发明还涉及用于实施所述浓集方法的诊断试剂盒。

[0004] 发明背景

[0005] 由微生物污染导致的食源性疾病和医院内获得性感染为世界各地许多地方所关注。因此, 测定多种诊断样品、食品样品、环境样品或其他样品中细菌或其他微生物的存在以确定所存在的微生物的身份和 / 或量常常是合乎需要的或是必要的。

[0006] 例如, 可测定细菌 DNA 或细菌 RNA, 以甚至在存在其他细菌种类的情况下评估特定细菌种类的存在与否。然而, 检测特定细菌的存在的能力至少部分取决于所分析的样品中细菌的浓度。可对细菌样品进行铺板或培养, 以增加样品中细菌的数量, 来确保足够的检测水平, 但培养步骤通常需要大量的时间且因此会显著耽搁评估结果。

[0007] 使样品中的细菌浓集可缩短培养时间或甚至消除对于培养步骤的需要。因此, 已经开发了通过使用特定细菌株系的特异性抗体 (例如, 为抗体包被的磁性颗粒或非磁性颗粒的形式) 来分离 (并由此浓集) 该株系的方法。然而, 这些方法往往昂贵, 而且对于至少一些诊断应用来说速度仍比期望的稍慢。

[0008] 也已经使用了非株系特异性的浓集方法 (例如, 以获得对样品中所存在的微生物的较为一般性的评估)。在浓集了微生物混合群体之后, 如果需要, 通过使用株系特异性探针来测定特定株系的存在。

[0009] 已经通过基于碳水化合物和凝集素蛋白相互作用的方法实现了微生物的非特异性浓集或捕集。涂覆壳聚糖的支持物已经用作非特异性捕集装置, 并且用作微生物营养素的物质 (例如, 碳水化合物、维生素、铁螯合的化合物以及铁载体) 也已经被描述为可用作配体以进行微生物的非特异性捕集。

[0010] 多种无机材料 (例如, 羟基磷灰石和金属氢氧化物) 已经用于非特异性结合和浓集细菌。物理浓集方法 (例如, 过滤、色谱、离心和重力沉降) 也已经用于非特异性捕集, 其使用和 / 或不使用无机结合剂。这些非特异性浓集方法在速度、成本 (至少一些需要昂贵的设备、材料和 / 或受过训练的技术人员)、样品要求 (例如, 样品性质和 / 或体积限制)、空间要求、使用的方便性 (至少一些需要复杂的多步骤方法)、现场使用的适合性和 / 或效果方面不同。

发明内容

[0011] 因此, 我们认为迫切需要用于快速检测病原微生物的方法。所述方法将优选不仅快速而且成本低、简单 (不涉及复杂的设备或程序) 和 / 或在多种条件下 (例如, 不同类型

样品基质、不同细菌负荷以及不同样品体积)有效。

[0012] 简而言之,在一个方面,本发明提供了一种用于非特异性浓集样品中存在的微生物株系(例如,细菌、真菌、酵母菌、原生动物、病毒(包括无包膜病毒和有包膜病毒)和细菌内生孢子的株系)使得微生物保留活力以便检测或测定一种或多种株系的方法。所述方法包括:(a)提供粒状浓集剂,所述浓集剂包含 γ -FeO(OH)(也称为纤铁矿);(b)提供包含至少一种微生物株系的流体样品;以及(c)使所述浓集剂与所述样品接触(优选通过混合接触),使得至少一部分所述浓集剂分散于所述样品中,并且至少一部分所述至少一种微生物株系被结合于所述浓集剂或被所述浓集剂捕集。优选地,所述方法还包括检测所述至少一种结合的微生物株系的存在(例如,通过基于培养的检测方法、显微镜法/成像检测方法、基因检测方法、基于生物发光的检测方法或免疫检测方法)和/或分离(优选地,通过重力沉降)所形成的结合微生物的浓集剂。所述方法还可任选包括将所形成的分离的浓集剂与所述样品分开。

[0013] 本发明的方法不靶向特定的微生物株系。相反,已经发现,某些较便宜的无机材料可令人惊讶地有效捕集多种微生物。这类材料可以以非株系特异性方式浓集存在于样品(例如,食品样品)中的微生物株系,使得可较容易且快速地测定一种或多种微生物株系(优选地,一种或多种细菌株系)。

[0014] 本发明的方法相对简单且成本低(不需要复杂的设备或昂贵的株系特异性材料),并且相对快速(相对于无浓集剂的对照样品,优选的实施例在少于约30分钟捕集存在于样品中的至少约70%(更优选地,至少约80%;最优选地,至少约90%)的微生物)。另外,所述方法可对于多种微生物(包括诸如革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌之类的病原体)和多种样品(不同的样品基质,并且与至少一些现有技术的方法不同,即使具有低微生物含量和/或大体积的样品)有效。因此,本发明的方法的至少一些实施例可满足上述对于在多种条件下快速检测病原微生物的低成本、简单方法的迫切需要。

[0015] 在另一方面,本发明还提供了一种用于实施本发明方法的诊断试剂盒,所述试剂盒包括:(a)粒状浓集剂,所述浓集剂包含 γ -FeO(OH);(b)检测容器(优选地,无菌检测容器);和(c)关于使用所述浓集剂实施本发明方法的说明书。优选地,所述诊断试剂盒还包括一种或多种选自以下的组分:微生物培养基、裂解试剂、缓冲剂、基因和生物发光检测分析组分。

[0016] 在又一方面,本发明提供了一种方法,所述方法包括:(a)提供粒状浓集剂,所述浓集剂包含氧化铁或羟基氧化铁中的至少一种,所述浓集剂包括微粒附聚物,所述附聚物包含最大尺寸小于1微米的针状微晶体;(b)提供包含至少一种微生物株系的流体样品;以及(c)使所述浓集剂与所述样品接触(优选通过混合接触),使得至少一部分所述浓集剂分散于所述样品中,并且至少一部分所述至少一种微生物株系被结合于所述浓集剂或被所述浓集剂捕集。

[0017] 在又一方面,本发明还提供了一种试剂盒,所述试剂盒包括:(a)粒状浓集剂,所述浓集剂包含氧化铁或羟基氧化铁中的至少一种,所述浓集剂包括微粒附聚物,所述附聚物包含最大尺寸小于1微米的针状微晶体;(b)检测容器;和(c)关于使用所述浓集剂实施权利要求1所述的方法的说明书。

具体实施方式

[0018] 定义

[0019] 如本专利申请中所使用的：

[0020] “样品”是指所采集的（例如，待分析的）的物质或材料。

[0021] “样品基质”是指除了微生物以外的样品组分。

[0022] “检测”是指鉴定微生物的至少一种组分，由此确定微生物的存在。

[0023] “基因检测”是指对衍生自靶微生物的遗传物质组分如 DNA 或 RNA 的鉴定。

[0024] “免疫检测”是指对衍生自靶微生物的抗原物质如蛋白质或蛋白多糖的鉴定。

[0025] “微生物”是指具有适于分析或检测的遗传物质的任何细胞，包括，例如细菌、酵母、病毒和细菌内生孢子。

[0026] “微生物株系”是指可通过检测方法区分的特定类型的微生物，例如，不同属的微生物，属内不同种的微生物或种内不同分离物的微生物）。

[0027] “靶微生物”是指需要检测的任何微生物。

[0028] 浓集剂

[0029] 适用于实施本发明方法的浓集剂包括包含 γ -FeO(OH)（也称为纤铁矿）的那些粒状浓集剂。已经发现所述浓集剂令人惊讶地比其他含铁浓集剂更有效地捕集革兰氏阴性细菌，它们是在食源性和水源性疾病以及人类细菌感染方面受到最大关注的微生物。所述浓集剂还包括（除了 γ -FeO(OH)）其他组分（例如，勃姆石（ α -AlO(OH)）、粘土、氧化铁以及二氧化硅），但优选地，当实施本发明方法时，这些其他组分不会显著干扰样品和所述浓集剂的紧密接触。因此，所述浓集剂优选基本由 γ -FeO(OH) 组成。

[0030] 使用上述浓集剂进行的浓集或捕集通常不特异性针对任何特定株系、种或类型的微生物，因此提供了对样品中微生物全体群落的浓集。然后，可使用任何已知的检测方法用特异性探针从捕集的微生物群落中检测特定的微生物株系。因此，所述浓集剂可用于检测临床样品、食品样品、环境样品或其他样品中的微生物污染物或病原体（特别是食源性病原体，例如细菌）。

[0031] γ -FeO(OH) 是已知的，可通过已知方法化学合成（例如，通过在中性或弱酸性 pH 下对氢氧化亚铁进行氧化，如在美国专利号 4,729,846 (Matsui 等人) 中为磁带生产目的所描述的，将其说明内容以引用方式并入本文中）。 γ -FeO(OH) 还可商购获得（例如，自 Alfa Aesar, A JohnsonMatthey Company, Ward Hill, MA, 和自 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO）。

[0032] 在实施本发明方法中，所述浓集剂是以颗粒形式使用，更优选包括微粒 [优选地，颗粒尺寸（最大维度）范围为约 3 微米（更优选地，约 5 微米；最优选地，约 10 微米）至约 100 微米（更优选地，约 80 微米；甚至更优选地，约 50 微米；最优选地，约 35 微米）；其中，范围的任何下限可与任何上限配对）的微粒]。优选地，所述颗粒是较小颗粒的附聚物。所述颗粒优选包括尺寸小于约 1 微米（优选，尺寸小于约 0.5 微米）的微晶体。所述微晶体可作为针状微晶体存在，作为包含针状微晶体的筏状结构存在，或作为针状微晶体和筏状结构的组合存在。如通过 BET (Brunauer-Emmett-Teller) 方法（通过氮气分子的物理吸附来计算固体的表面积）所测量的，所述浓集剂优选其表面积大于每克约 25 平方米 (m^2/g)，更优选大于约 50 m^2/g ，以及最优选大于约 75 m^2/g 。

[0033] 所述颗粒的优选附聚形式可提供微细颗粒系统的吸附能力,而又没有通常与微细颗粒相关的操作危害和其他危害。另外,所述附聚物颗粒可容易在流体中沉降,并因此可提供微生物与流体相的快速分离(如果用于过滤应用中的话还容许低反压)。

[0034] 可在带有铁的氧化物或羟基氧化物颗粒中通过几种涉及制备小微晶体组分的方法诱导所述附聚物结构。通常,可通过对氢氧化亚铁或碳酸亚铁进行空气氧化来产生针铁矿和纤铁矿形式的微细羟基氧化铁。纤铁矿是更优选的形式,可通过在维持较低的 pH(例如,约 pH 3 至约 pH 5)的同时对氢氧化亚铁或碳酸亚铁进行空气氧化而产生。较高的 pH 值可导致产生针铁矿形式。如果氧化过程中的搅拌速率低(例如,磁力搅拌),所形成的小微晶体可自发地附聚成所需的附聚形式。如果在合成之后仍有不为附聚形式的小微晶体,则可将颗粒分散体喷雾干燥以形成附聚物,所述附聚物在干燥(例如,在约 90 至 150℃)之后可保持附聚形式

[0035] 样品

[0036] 本发明的方法可用于多种不同类型的样品,包括但不限于医学样品、环境样品、食品样品、饲料样品、临床样品和实验室样品以及它们的组合。医学或兽医样品可包括(例如)来自生物来源(例如,人或动物)的待测定以便进行临床诊断的细胞、组织或流体。环境样品可为(例如)来自医学或兽医设施、工业设施、土壤、水源、食品制备区(食品接触和非接触区)、实验室或已潜在遭受生物恐怖的区域。优选的是食品加工、处理以及制备区样品,这是因为这些在细菌病原体导致的食物供应污染方面常常受到特别的关注。

[0037] 所述样品以流体形式(例如,液体、气体,或者固体或液体于液体或气体中的分散体或悬浮体)用于本发明方法。以液体形式或以固体于液体中的分散液或悬浮液形式获得的样品可直接使用,或可进行浓缩(例如,通过离心)或稀释(例如,通过添加缓冲液(控制 pH 的溶液))。固体或半固体形式的样品可通过例如用流体介质(例如,缓冲液)洗涤或漂洗或者悬浮或分散于流体介质中的方法来萃取,以形成用于所述方法的流体样品。可从表面(例如,通过擦洗和/或漂洗)获取样品。

[0038] 可(直接或者在经处理以提供流体样品后)用于实施本发明方法的样品的例子包括食品(例如,新鲜农产品或即食型午餐食品或“deli”肉)、饮料(例如,果汁或碳酸盐饮料)、饮用水和生物流体(例如,全血或其组分,例如血浆,富含血小板的血液级分、血小板浓缩物或浓缩红细胞;细胞制剂(例如,分散的组织、骨髓抽吸物或椎体骨髓);细胞悬浮液;尿液、唾液以及其他体液;骨髓;肺流体;脑流体;伤口渗出物;伤口活检样品;眼睛流体;脊髓液等),以及可使用已知程序例如使用裂解缓冲液形成的裂解制剂,例如细胞裂解物等。优选的样品包括食品、饮料、饮用水、生物流体以及它们的组合(更优选为食品、饮料、饮用水以及它们的组合)。

[0039] 样品体积可根据具体应用而不同。例如,当本发明方法用于诊断或研究应用时,所述样品的体积通常为微升范围(例如,10 微升或更大)。当所述方法用于食品病原体检测分析或用于饮用水安全性检测时,样品的体积可通常为毫升至升的范围(例如,100 毫升至 3 升)。在工业应用中,例如生物工艺或制药配方中,所述体积可为成千上万升。

[0040] 本发明方法可从浓集状态的样品分离微生物,并且还使得能从可对待使用的检测程序造成限制的样品基质组分分离微生物。在所有这些情况中,本发明的方法可伴随或替代微生物浓集的其他方法而使用。因此,任选地,如果需要另外的浓集,可在实施本发明

方法之前或之后从样品培养培养物。因此,任选地,如果需要另外的浓集,可在实施本发明方法之前或之后从样品培育培养物。

[0041] 接触

[0042] 可通过多种已知的或将来开发的提供两种材料之间接触以形成分散体的方法中的任何方法来实施本发明方法。例如,可将粒状浓集剂添加至样品,或者可将样品添加至粒状浓集剂。可将带有粒状浓集剂的压片或浸渍片或其他物品浸于样品溶液中,可将样品溶液倾至带有粒状浓集剂的薄膜上,或者,可将样品溶液倾至含有粒状浓集剂的管或微孔中,等等。在所有情况中,至少一部分粒状浓集剂变得分散于样品中。

[0043] 然而,优选地,在多种容器中的任何容器(任选地但也优选地,带盖的容器、闭合或密封容器,更优选地,带盖的试管、瓶子或罐)中合并(使用任何添加次序)粒状浓集剂和样品。用于实施本发明方法的合适的容器将由具体样品决定,可在尺寸和性质上大不相同。例如,所述容器可为小容器,例如 10 微升容器(例如,试管)或较大的容器,例如 100 毫升或 3 升容器(例如,三角烧瓶或聚丙烯大口瓶)。容器、浓集剂以及直接接触样品的任何其他装置或添加剂可在使用前进行灭菌(例如,通过受控热、环氧乙烷气或辐射来进行),以减少或防止任何可导致检测误差的对样品的污染。足以捕集或浓集特定样品的微生物以便成功检测的浓集剂的量是可变动的(取决于例如,浓集剂的性质和形式以及样品体积),可由本领域技术人员容易地确定。例如,对于一些应用而言,每毫升样品 10 毫克浓集剂是实用的。

[0044] 如果需要,可通过将粒状浓集剂至少通过样品一次来实现接触(例如,通过依赖重力沉降例如约 10 分钟的一段时间)。可通过混合(例如,通过搅拌、摇动或使用振动台)使得浓集剂颗粒反复经过或沉降穿过样品的大部分,来增强接触。对于微升级的小体积(通常,小于 0.5 毫升)来说,诸如通过涡旋或“章动”,混合可以是快速的,例如,如美国专利号 5,238,812(Coulter 等人)所述,将其说明内容以引用方式并入本文中。对于大于或等于 0.5 毫升(通常 0.5 毫升至 3 升)的较大体积来说,可通过以“翻跟头”的方式轻轻翻转粒状浓集剂和样品来实现混合,例如,如美国专利号 5,576,185(Coulter 等人)所述,将其说明内容以引用方式并入本文中。可借助于例如被设置成固定试管或其他类型反应容器并以“翻跟头”方式缓慢旋转试管或容器的装置来实现所述翻转。可进行接触达所需的时间(例如,对于等于或小于约 100 毫升体积的样品,最多约 60 分钟的接触是有用的;优选,约 15 秒至约 10 分钟或更长时间;更优选,约 15 秒至 5 分钟)。

[0045] 因此,在实施本发明方法中,混合(例如,搅动、振荡或搅拌)和/或孵育(例如,在室温下)是任选的但也是优选的,以便增加微生物与浓集剂的接触。优选的接触方法包括将含微生物的流体样品与粒状浓集剂一起混合[例如,约 15 秒至约 5 分钟]和孵育(例如,约 3 分钟至约 30 分钟)。如果需要,在浓集剂和样品的组合中,可包括一种或多种添加剂(例如,裂解试剂、生物发光检测试剂、核酸捕集试剂(例如,磁珠)、微生物培养基、缓冲剂(例如,用以分散或萃取固体样品)、微生物染色试剂、洗涤缓冲液(例如,用以洗除未结合材料)、洗脱剂(例如,血清白蛋白)、表面活性剂(例如,可从 Union Carbide Chemicals and Plastics(Houston, TX)获得的 Triton™ X-100 非离子型表面活性剂)、机械磨蚀剂/洗脱剂(例如,玻璃珠)等)。

[0046] 分离和/或分离

[0047] 任选地但也优选地,本发明的方法还包括分离所形成的结合微生物的浓集剂。优选可通过至少部分依赖于重力沉降(重力沉淀,例如,经约5分钟至约30分钟的时间)实现这样的分离。然而,在一些情况下,可取的是加快分离(例如,通过离心或过滤),或者采用任何所述分离方法的组合。

[0048] 本发明的方法还可任选包括将所形成的结合微生物的浓集剂与样品分开。这可涉及去除或分离分离时产生的上清液。可通过本领域熟知的多种方法(例如,通过倾析或虹吸,以使得结合微生物的浓集剂留在用于实施本发明方法的容器或器皿的底部)实现上清液的分离。

[0049] 本发明的方法可人工实施(例如,以分批方式实施)或者可为自动化的(例如,以使得能够连续或半连续处理)。

[0050] 检测

[0051] 可通过使用本发明方法来浓集并任选但也优选地检测多种微生物,包括例如细菌、真菌、酵母菌、原生动物、病毒(包括无包膜病毒和有包膜病毒)、细菌内生孢子等以及它们的组合。所述方法可用于检测病原体,这对于食品安全或对于医学、环境或反恐原因来说是重要的。所述方法尤其可用于检测病原性细菌(例如,革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌),以及多种酵母、霉菌和支原体(以及这些中的任何的组合)。

[0052] 待检测的靶微生物属包括但不限于李斯特菌属(*Listeria*)、埃希氏杆菌属(*Escherichia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、链球菌属(*Streptococcus*)、弧菌属(*Vibrio*)、耶尔森氏菌属(*Yersinia*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、包柔氏螺旋体属(*Borrelia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、酵母菌属(*Saccharomyces*)、念珠菌属(*Candida*)等以及它们的组合。样品可含有多种微生物株系,并且任何一种株系可独立于任何其他株系而被检测到。可作为检测靶的具体微生物株系包括大肠埃希氏杆菌(*Escherichia coli*)、小肠结肠炎耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、假结核耶尔森氏菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、葡萄球菌肠毒素亚种(*Staphylococcal enterotoxin ssp*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*)、肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等以及它们的组合[优选地,金黄色葡萄球菌、肠道沙门氏菌、白色念珠菌、萎缩芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希氏杆菌、人类感染性无包膜肠道病毒(大肠埃希氏杆菌噬菌体为替代物)以及它们的组合]。

[0053] 由浓集剂捕集或结合（例如，通过吸附）的微生物可通过基本上任何目前已知或将来开发的所需方法来检测。该方法包括（例如）基于培养的方法（当时间允许时可作为优选）、显微镜法（例如，使用可用于观察标记荧光染料的微生物的透射光显微镜或落射荧光显微镜）以及其他成像方法、免疫检测方法和基因检测方法。微生物捕集之后的检测过程可任选包括洗涤，以去除样品基质组分。

[0054] 免疫检测是对衍生自靶生物体的抗原物质的检测，该抗原物质通常是充当细菌或病毒颗粒的表面的标志的生物分子（例如，蛋白质或蛋白多糖）。抗原物质的检测通常可通过抗体、选自诸如噬菌体展示之类的过程的多肽或来自筛选过程的适体来进行。

[0055] 免疫检测方法是熟知的，并且包括（例如）免疫沉淀和酶联免疫吸附测定（ELISA）。可以多种方式（例如，通过用荧光染料、用量子点或用可产生化学发光的酶或有色底物来标记第一抗体或第二抗体，和使用读板机或侧流装置）来检测抗体结合。

[0056] 还可通过基因检测（例如，通过核酸杂交或引物指导的扩增）来进行检测，基因检测常常是优选的方法。可将捕集或结合的微生物裂解，以使它们的遗传物质可供检测。裂解方法是熟知的，包括例如下述处理：声裂法、渗透压休克、高温处理（例如，约 50°C 至约 100°C）以及与酶一起孵育，该酶例如为溶菌酶、葡萄糖酶、酵母裂解酶（zymolase）、溶细胞酶、蛋白酶 K、蛋白酶 E 和病毒内溶素。

[0057] 许多常用的基因检测分析可检测特定微生物的核酸，包括 DNA 和 / 或 RNA。基因检测方法中使用的条件的严格性与所检测的核酸序列的变异水平相关。高严格的盐浓度和温度条件可使检测限于靶标的精确核酸序列。因此，使用高度严格的基因检测可区分靶核酸序列存在小变异的微生物株系。基因检测可以基于核酸杂交，其中，单链核酸探针与微生物的变性核酸杂交，使得产生包含探针链的双链核酸。本领域技术人员应熟悉用于在凝胶电泳、毛细管电泳或其他分离方法之后检测杂交物的探针标记，例如放射性标记、荧光标记以及化学发光标记。

[0058] 特别有用的基因检测方法是基于引物指导的核酸扩增。引物指导的核酸扩增方法包括（例如）热循环方法（例如，聚合酶链反应（PCR）、逆转录酶聚合酶链反应（RT-PCR）以及连接酶链反应（LCR）以及等温法和链置换扩增（SDA）（以及它们的组合，优选地，为 PCR 或 RT-PCR）。用于检测扩增产物的方法包括（但不限于）例如凝胶电泳分离和溴化乙锭染色，以及检测产物中掺入的荧光标记或放射性标记。还可使用在检测扩增产物之前不需要分离步骤的方法（例如，实时 PCR 或均相检测）。

[0059] 生物发光检测方法是熟知的，并且包括（例如）腺苷酸三磷酸（ATP）检测方法，包括美国专利号 7, 422, 868 (Fan 等人) 中所描述的那些，将其说明内容以引用方式并入本文中。

[0060] 由于本发明方法是非株系特异性的，它提供了容许在同一样品中靶向多种微生物株系以便检测的通用捕集系统。例如，在测定食品样品的污染时，将同一样品中的单核细胞增多性李斯特菌、大肠埃希氏杆菌以及沙门氏菌一并检测是合乎需要的。在单个捕集步骤之后接着可进行例如 PCR 或 RT-PCR 测定，其使用特异性引物来扩增来自这些微生物株系中每个株系的不同核酸序列。因此，可避免需要对每个株系分开进行样品处理和制备程序。

[0061] 诊断试剂盒

[0062] 用于实施本发明方法的诊断试剂盒包括：(a) 上述浓集剂；(b) 检测容器（优选

地,无菌检测容器);和(c)关于使用所述浓集剂实施本发明方法的说明书。优选地,所述诊断试剂盒还包括一种或多种选自以下的组分:微生物培养基或生长培养基、裂解试剂、缓冲剂、生物发光检测分析组分(例如,光度计、裂解试剂、萤光素酶、酶底物、反应缓冲剂等)、基因检测分析组分以及它们的组合。优选的裂解试剂是在缓冲剂中提供的水解酶,优选的基因检测分析组分包括靶微生物的一种或多种特异性引物。

[0063] 例如,本发明的诊断试剂盒的优选实施例包括:粒状浓集剂(例如,在诸如玻璃或聚丙烯瓶的无菌一次性容器中),连同关于使用所述浓集剂实施本发明方法的说明书(例如,通过将浓集剂与待分析的流体样品混合,通过重力使得浓集剂沉降,去除产生的上清液,以及检测至少一种被浓集剂结合的靶微生物株系的存在)。任选地,浓集剂可在含有防腐剂的小量缓冲液中水合以提高储存和运输过程中的稳定性,和/或可装在/等分分配在撕开式密封袋中以防止污染。浓集剂可以是液体中的分散液或悬浮液形式,或者可为粉末形式。优选地,诊断试剂盒包括预量出的等份的(例如,基于样品体积)粒状浓集剂(更优选地,装在一个或多个撕开式密封袋内)。

[0064] 实施例

[0065] 通过以下的实例进一步说明本发明的目标和优点,但不应当将这些实例中例举的具体材料及其量以及其它的条件和细节理解成对本发明的不当限制。

[0066] 材料

[0067] γ -FeO(OH) (60目粉末,直径小于250微米,目录号17531)、 Fe_2O_3 (粉末,目录号10716)以及 Fe_3O_4 (粉末)购自Alfa Aesar(A JohnsonMatthey Company, Ward Hill, MA)。FeO(10目粉末,直径小于2mm)购自Sigma-Aldrich Corporation(目录号40,086-6, St. Louis, MO)。所有微生物原种培养物均购自美国模式培养物保藏中心(ATCC, Manassas, VA)。

[0068] 使用扫描电子显微镜术(SEM)对各含铁粉末的样品进行检测。发现 Fe_3O_4 样品主要包含块状、针状、蠕虫状晶体,最小的晶体尺寸小于约5微米,最大的晶体初始尺寸为约44-45微米。蠕虫状晶体包含以小角度晶界连接的较小晶体,边上有均匀的亚微米孔隙。

[0069] Fe_2O_3 颗粒的尺寸和形状与 Fe_3O_4 颗粒非常相似,例外的是 Fe_2O_3 颗粒样品含有较大比例的块状、蠕虫状晶体的大附聚物(约50-70微米)。

[0070] γ -FeO(OH)样品包含较小颗粒的附聚物,所述附聚物尺寸范围在略小于约10微米至约60微米。附聚物中的较小颗粒通常包含甚至更小颗粒的簇,所述更小颗粒为针状,长度约0.25-0.75微米,其他两种维度尺寸为约0.05微米至约0.25微米。在一些情况中,针状晶体附聚成更大的约0.5微米至约1微米筏状结构。这些筏状结构相似地附聚成更大的簇。

[0071] FeO样品包含大的颗粒(例如,尺寸大于约150微米)以及较小的颗粒(例如,尺寸小于约10微米)。大部分样品作为约30至70微米的颗粒存在。所述颗粒不显示为多晶态。

[0072] BET(Brunauer-Emmett-Teller) 表面积测量

[0073] 将约0.1-1.0g浓集剂转移至可购自Micromeritics, Inc. (Norcross, GA)的直径1.3厘米(0.5英寸)的样品管,使用购自Micromeritics的商品名为VACPREP 061的系统在110°C真空(低于10毫托或0.015毫巴)下至少过夜来除气。在除气之后,让浓集剂在

环境温度（即 20℃至 25℃）下真空下冷却 10 分钟，然后装入购自 Micromeritics 的商品名为 TRISTAR 3000 的表面积和孔隙度分析仪。

[0074] 用在约 0 开始直到约 0.3 的相对压力 (P/P_0)，建立 8 点吸附等温线（见下表的目标压力和点）。未设定第一“压力固定量”或最大体积增量。将“绝对压力公差”设定为 5mm Hg，并将“相对压力公差”设定为 5.0%。未使用“快速抽真空”选项，进行 120 秒的泄漏检测。随着分析仪杜瓦瓶的液氮降低（即，浓集剂不在液氮中），在自由空间测量之前应用 0.1 小时的抽真空时间。在自由空间测量之后，进行除气测试 180 秒。升高杜瓦瓶以便分析（即，将含有浓集剂的管置于液氮中）。在 77.350K（液氮的温度），初始测量 P_0 ，并在分析过程中以 120 分钟的间隔（如果需要的话）测量。使用氮气的标准 Pstat- 温度表，将气体吸附特性设定为如下数值：非理想系数，0.0000620；密度转换系数，0.0015468；分子横断面积，0.162nm²。基于在 8 点吸附等温线过程中各相对压力下吸附的 N₂ 量计算 BET 吸附表面积。

[0075] 下表显示了用于分析的压力和点。

[0076] 目标压力和点

[0077]

点	相对压力
	P/P_0
1	0.025
2	0.03
3	0.05
4	0.1
5	0.15
6	0.2
7	0.25
8	0.3

[0078] 所形成的 γ -FeO(OH) 的 BET 表面积为 81.43m²/g，所形成的 Fe₂O₃ 的 BET 表面积为 1.64m²/g，所形成的 Fe₃O₄ 的 BET 表面积为 1.74m²/g。

[0079] 微生物浓集试验方法

[0080] 将分离的微生物菌落接种于 5mL BBL™ Trypticase™ 大豆肉汤 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 中并在 37℃ 孵育 18-20 小时。将约 ~ 10⁹ 个菌落形成单位 /mL 的该过夜培养物在 pH7.2 的吸附缓冲液（含 5mM KCl、1mM CaCl₂、0.1mM MgCl₂，以及 1mM K₂HPO₄）中稀释，获得 10³ 个微生物 /mL 的稀释液。将 1.1mL 体积的微生物稀释液添加至各经标记的含 10mg 浓集剂的无菌 5mL 聚丙烯管 (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)，给各管封盖，并在 Thermolyne MaximixPlus™ 涡旋混合器 (Barnstead International,

Iowa) 上混合。在室温 (25 °C) 下于 Thermolyne Vari Mix™ 振荡器平台 (Barnstead International, Iowa) 上孵育各封盖的管 15 分钟。在孵育后, 让各管在试验台上静放 10 分钟以使浓集剂沉降下来。以相同方式处理含有 1.1mL 微生物稀释液但无浓集剂的对照样品管。然后将所形成的沉降的浓集剂和 / 或上清液 (以及对照样品) 用于分析。

[0081] 根据制造商的说明书, 将沉降的浓集剂重悬浮于 1mL 无菌巴特非尔德氏 (Butterfield's) 缓冲液 (pH 7.2±0.2; 磷酸二氢钾缓冲液; VWR 目录号 83008-093, VWR, West Chester, PA) 中并铺板于 3M™ Petrifilm™ 好氧性微生物计数板培养基 (干燥、可再水合, 3M 公司 (St. Paul., MN))。使用 3M™ Petrifilm™ 读板机 (3M 公司 (St. Paul., MN)) 对好氧性微生物计数进行定量。使用下式计算结果:

[0082] 重悬浮的浓集剂中的 CFU 百分数 /mL = (来自铺板的重悬浮的浓集剂的菌落数) / (来自铺板的未处理的对照样品的菌落数) × 100

[0083] (其中, CFU = 菌落形成单位, 其为活的或有活力的微生物的单位)。

[0084] 然后使用下式以微生物被浓集剂捕集的百分数来报告结果:

[0085] 捕集效率或捕集百分数 = 重悬浮的浓集剂中的 CFU 百分数 /mL 浓集剂

[0086] 出于比较目的, 在至少一些情况中, 移取 1mL 上清液, 未经稀释进行铺板或在巴特非尔德氏缓冲液中 1 : 10 稀释来铺板, 铺板至 3M™ Petrifilm™ 好氧性微生物计数板培养基。使用 3M™ Petrifilm™ 读板机 (3M 公司 (St. Paul., MN)) 对好氧性微生物计数进行定量。使用下式计算结果:

[0087] 上清液中的 CFU 百分数 /mL = (来自铺板的上清液的菌落数) / (来自铺板的未处理的对照样品的菌落数) × 100

[0088] (其中, CFU = 菌落形成单位, 其为活的或有活力的微生物的单位)。

[0089] 当微生物菌落和浓集剂的颜色相似时 (给读板机提供的对比度很小), 结果是基于上清液, 因而使用下式以微生物被浓集剂捕集的百分数来报告结果:

[0090] 捕集效率或捕集百分数 = 100 - 上清液中的 CFU 百分数 /mL

[0091] 实例 1 和比较例 1-3

[0092] 使用上述微生物浓集试验方法, 分别测定不同含铁浓集剂各 10mg 对靶微生物革兰氏阴性菌肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, ATCC 35987) 的细菌浓集作用。结果示于下表 1 中

[0093] 表 1。

[0094]

实例号	微生物	浓集剂	捕集百分数	标准差
C-1	沙门氏菌	FeO	17.0	2.1
C-2	沙门氏菌	Fe ₂ O ₃	65.0	4.1
C-3	沙门氏菌	Fe ₃ O ₄	65.0	4.1
1	沙门氏菌	γ-FeO(OH)	93.7	1.4

[0095] 实例 2-4

[0096] 使用上述微生物浓集试验方法,分别测定每单位体积不同重量的 γ -FeO(OH) 对靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC35987) 的细菌浓集作用。结果示于下表 2 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0097] 表 2。

[0098]

实例号	微生物	浓集剂	浓集剂的量 (mg/mL)	捕集百分数
2	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	1	73
3	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	5	91
4	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	10	96

[0099] 实例 5

[0100] 使用上述微生物浓集试验方法,测定 10mg γ -FeO(OH) 对靶微生物革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538) 的细菌浓集作用。结果示于下表 3 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0101] 表 3。

[0102]

实例号	微生物	浓集剂	捕集百分数
5	葡萄球菌	γ -FeO(OH)	96

[0103] 实例 6-8

[0104] 使用上述微生物浓集试验方法,测定 10mg γ -FeO(OH) 在孵育 5、10 和 15 分钟下对靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC35987) 的细菌浓集作用。结果示于下表 4 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0105] 表 4。

[0106]

实例号	微生物	浓集剂	孵育时间 (分钟)	捕集百分数
6	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	5	85
7	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	10	95
8	沙门氏菌	γ -FeO(OH)	15	97

[0107] 实例 9

[0108] 使用上述微生物浓集试验方法,测定 10mg γ -FeO(OH) 对靶微生物白色念珠菌 (10^2 CFU/mL ;ATCC MYA-2876) 的酵母菌浓集。根据制造商的说明书将所形成的材料铺板于 3M™ Petrifilm™ 酵母菌和霉菌计数板培养基 (干燥,可再水合 ;3M 公司 (St. Paul, MN)), 并孵育 5 天。对分离的酵母菌落进行手工计数,并如上所述计算出捕集百分数。结果示于下表 5 中 (标准差小于 10%)。

[0109] 表 5。

[0110]

实例号	微生物	浓集剂	捕集百分数
9	念珠菌	γ -FeO(OH)	100

[0111] 实例 10 和 11

[0112] 测定 10mg γ -FeO(OH) 浓集剂样品对靶细菌内生孢子萎缩芽孢杆菌 (ATCC 9372) 和枯草芽孢杆菌 (ATCC 19659) 的浓集作用。采用上述的微生物浓集试验方法,但有以下修改:过夜培养物分别具有 0.9×10^2 CFU/mL 萎缩芽孢杆菌和 4.5×10^2 CFU/mL 枯草芽孢杆菌;将所形成的上清液未经稀释进行铺板;将沉降的带有结合的萎缩芽孢杆菌的浓集剂重悬浮于 2mL 无菌巴特非尔德氏缓冲液中并以双份进行铺板(各 1mL);将沉降的带有结合的枯草芽孢杆菌的浓集剂重悬浮于 5mL 无菌巴特非尔德氏缓冲液中并以双份进行铺板(各 1mL)。基于得自铺板的上清液的计数来计算捕集效率,测定出萎缩芽孢杆菌为 99%和枯草芽孢杆菌为 96%(所有样品的标准差均小于 10%)。

[0113] 实例 12

[0114] 检测 10mg γ -FeO(OH) 浓集剂对无包膜的细菌感染性靶病毒大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2(ATCC 15597-B1;其常用作多种人类感染性无包膜肠道病毒的替代物)的浓集作用。采用大肠埃希氏杆菌(ATCC15597)作为宿主,用双层琼脂方法(下文所述)测定对大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2(ATCC 15597-B1)的捕集。

[0115] 在 pH7.2 的无菌 1X 吸附缓冲液(含有 5mM KCl、1mM CaCl₂、0.1mM MgCl₂,以及 1mM K₂HPO₄)中 10 倍系列稀释大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2 原种,获得每毫升 10^3 噬斑形成单位(PFU/mL)。将 1.0mL 体积的所形成的噬菌体稀释液添加至含有 10mg 浓集剂的标记的无菌 5mL 聚丙烯管(BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ),并在 Thermolyne Maximix Plus™ 涡旋混合器(Barnstead International, Iowa)上混合。在室温(25℃)下于 Thermolyne Vari Mix™ 振荡器平台(Barnstead International, Iowa)上孵育封盖的管 15 分钟。孵育后,让管在试验台上静放 10 分钟以使浓集剂沉降下来。以相同方式处理含有 1.0mL 微生物稀释液但无浓集剂的对照样品管。然后将所形成的沉降的浓集剂和/或上清液(以及对照样品)用于分析。

[0116] 移取 100 微升上清液,使用下文所述的双层琼脂方法测定噬菌体。移取另外的 800 微升上清液并弃除。也对 100 微升沉降的浓集剂测定噬菌体。

[0117] 双层琼脂方法:

[0118] 将单菌落的大肠埃希氏杆菌(ATCC 15597)接种于 25mL 无菌的 3 重量百分数的胰蛋白酶大豆肉汤(Bacto™ 胰蛋白酶大豆肉汤, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD; 根据制造商的说明书制备)中,并在设置为每分钟 250 转(rpm)的振荡培养箱(Innova™ 44, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ)中在 37℃ 过夜培养。将 750 微升的该过夜培养物用于接种 75mL 无菌的 3 重量百分数的胰蛋白酶大豆肉汤。在设置为 250rpm 的振荡培养箱中于 37℃ 孵育所形成的培养物,获得指数期的大肠埃希氏杆菌细胞,指数生长期是通过用 SpectraMaxM5 分光光度计(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)于 550nm 处测得的吸光度(吸光度值 0.3-0.6)来测定。将细胞在冰上孵育直至用于测定。

[0119] 将 100 微升的上述噬菌体检测样品与 75 微升冰孵育的大肠埃希氏杆菌（宿主细胞）细胞一起混合，并在室温（25℃）下孵育 5 分钟。将所形成的样品与 5mL 无菌的融化顶层琼脂（3 重量百分数的胰蛋白酶大豆肉汤、1.5 重量百分数的 NaCl、0.6 重量百分数的琼脂，当天制备，保持在 48℃的水浴中）混合。然后将该混合物倒至培养皿中的底层琼脂（3 重量百分数的胰蛋白酶大豆肉汤、1.5 重量百分数的 NaCl、1.2 重量百分数的琼脂）之上。让混合物的融化琼脂组分固化 5 分钟，倒置培养皿或培养板，在 37℃下孵育。过夜孵育后，目测检查培养板，在三个独立的试验中，含有沉降的浓集剂的那些培养板（以及对照培养板）显示存在噬菌体噬斑。基于来自铺板的上清液的计数来计算捕集效率，测定出为 93%（标准差小于 10%）。

[0120] 实例 13

[0121] 苹果汁购自本地杂货店（Cub Foods, St. Paul）。在无菌玻璃皿中称量苹果汁（11g），将其添加至 99mL 无菌巴特菲尔德氏缓冲液中。将所形成的组合进行漩涡混合 1 分钟，并使用肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌（ATCC 35987）和大肠埃希氏杆菌（ATCC 51813）的 18-20 小时过夜培养物（细菌原种），各以 1CFU/mL 浓度将这两种细菌培养物对所述组合进行接种。如上所述在 1X 吸附缓冲液中制备细菌原种的系列稀释液。

[0122] 使用上述微生物浓集试验方法，将 10mL 体积的接种的苹果汁样品添加至含有 100mg γ-FeO(OH) 浓集剂的无菌 50mL 锥形聚丙烯离心管（BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ），检测对靶微生物沙门氏菌（在竞争性微生物大肠埃希氏杆菌存在下）的细菌捕集/浓集。去除所形成的上清液，将沉降的浓集剂转移至另一装有 2mL 3 重量百分数的无菌胰蛋白酶大豆肉汤（Bacto™ Tryptic Soy Broth, Becton Dickinson and Company, Sparks, MD；根据制造商的说明书制备）的无菌 50mL 管。给管封盖但不盖牢，混合其内容物，并在 37℃下孵育。在过夜孵育后，使用来自 SDI（Strategic Diagnostics, Inc., Newark, DE）的 RapidChek™ 沙门氏菌侧流免疫测定测试条检测所形成的肉汤混合物的沙门氏菌的存在。目测检查测试条显示其为沙门氏菌阳性。

[0123] 还通过聚合酶链反应（PCR）对含有微生物的肉汤混合物进行核酸检测。使用来自 Applied Biosystems（Foster City, CA）的 TaqMan™ ABI 肠道沙门氏菌检测试剂盒，测定作为检测样品的 1mL 上述过夜孵育的含有浓集剂的肉汤的沙门氏菌的存在。也对作为对照样品的 1mL 的肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌（ATCC 35987）的 18-20 小时过夜培养物（原种）进行了测定。通过使用下列每个循环的循环条件（45 个循环）在 Stratagene Mx3005P™ QPCR（定量 PCR）系统（Stratagene Corporation, La Jolla, CA）中进行 PCR 检测：25℃ 30 秒，95℃ 10 分钟，95℃ 15 秒，以及 60℃ 1 分钟。对照样品获得的平均（n = 2）循环阈值（CT 值）为 17.71。从检测样品获得 18.04 的平均（n = 2）CT 值，表明为阳性 PCR 反应并证实了沙门氏菌的存在。

[0124] 将本文所引用的包含在专利、专利文献以及出版物中的参考说明全文以引用方式并入，就如同各自独立地并入。在不脱离本发明的范围和精神的条件下，对本发明的多种无法预料的修改和更改对于本领域的技术人员来说将是显而易见的。应当理解，本发明并非意图受本文描述的示例性实施例和实例的不当限制，所述实例和实施例仅通过举例方式提供，本发明的范围旨在仅受本文中如下示出的权利要求书的限制。