



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101981177 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 26

(21) 申请号 200880110360. X

C12N 11/14 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 10. 02

C12Q 1/24 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 1/40 (2006. 01)

60/977, 180 2007. 10. 03 US

G01N 33/543 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2010. 04. 06

EP 0093027 A1, 1983. 03. 23, 全文 .

(86) PCT申请的申请数据

GB 2228477 A, 1989. 02. 28, 全文 .

PCT/US2008/078587 2008. 10. 02

JP 06081595 B2, 1994. 10. 19, 全文 .

(87) PCT申请的公布数据

审查员 李振鹏

W02009/085357 EN 2009. 07. 09

(73) 专利权人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 曼基里·T·克什尔萨格尔

图沙尔·A·克希尔萨加

托马斯·E·伍德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 张爽 樊卫民

(51) Int. Cl.

C12N 1/02 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书15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用于检测或测定的微生物的方法,所述方法包括:(a) 提供浓集剂,所述浓集剂包含无定形金属硅酸盐,并且具有如下表面组成,该表面组成具有如通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测的小于或等于 0.5 的金属原子与硅原子比例;(b) 提供包含至少一种微生物菌株的样品;以及(c) 使所述浓集剂与所述样品接触,使得所述至少一种微生物菌株的至少一部分与所述浓集剂结合或被其捕集。

1. 一种用于捕集或浓集微生物的方法,该方法包括:(a) 提供浓集剂,所述浓集剂包含无定形金属硅酸盐,并且具有如下表面组成,该表面组成具有通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测的小于或等于 0.5 的金属原子与硅原子比例;(b) 提供包含至少一种微生物菌株的样品;以及(c) 使所述浓集剂与所述样品接触,使得所述至少一种微生物菌株的至少一部分与所述浓集剂结合或被其捕集,其中所述浓集剂是无定形的球化硅酸镁。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括用于非治疗目的检测至少一种结合的微生物菌株的存在。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述浓集剂是粒状浓集剂。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述表面组成具有小于或等于 0.4 的金属原子与硅原子比例。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述表面组成为至少 10 平均原子%的碳。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述浓集剂在 pH 为 7 时具有负 ζ 电位。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述样品是流体形式。

8. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述微生物菌株选自如下物质的菌株:细菌、真菌、酵母、原生动物、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中所述微生物菌株选自如下物质的菌株:细菌、酵母、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合。

10. 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。

11. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述检测是通过选自如下的方法进行的:基于培养的方法、显微镜法和其它成像方法、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。

12. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述方法还包括离析所得的结合了微生物的浓集剂。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述离析是通过选自如下的方法实现的:重力沉降、离心、过滤以及它们的组合。

14. 根据权利要求 13 所述的方法,其中所述离析至少部分通过重力沉降来实现。

15. 根据权利要求 12 所述的方法,其中所述方法还包括将所述所得的离析的浓集剂与所述样品分离。

16. 一种用于捕集或浓集微生物的方法,该方法包括:(a) 提供浓集剂,所述浓集剂是无定形的球化硅酸镁,并且具有如下表面组成,该表面组成具有通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测的小于或等于 0.5 的金属原子与硅原子比例;(b) 提供包含至少一种微生物菌株的样品,所述微生物选自细菌、酵母、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合;以及(c) 使所述浓集剂与所述样品接触,使得所述至少一种微生物菌株的至少一部分与所述浓集剂结合或被其捕集。

17. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述方法还包括用于非治疗目的检测至少一种结合的微生物菌株的存在。

18. 根据权利要求 16 所述的方法,其中所述浓集剂包括微粒,所述样品是流体形式,并且所述接触是通过将所述浓集剂与所述样品混合来进行的。

19. 根据权利要求 18 所述的方法,其中所述方法还包括至少部分通过重力沉降来离析所述所得的结合了微生物的浓集剂。

20. 一种试剂盒,其包括:(a) 浓集剂,所述浓集剂包含无定形球化硅酸镁,并且具有如下表面组成,该表面组成具有通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测的小于或等于 0.5 的镁原子与硅原子比例;(b) 检测容器;和(c) 在实施根据权利要求 1 所述的方法中使用所述浓集剂的说明书。

21. 根据权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述试剂盒还包括至少一种选自如下的组分:微生物培养基、裂解试剂、缓冲剂、生物发光检测分析组分、基因检测分析组分以及它们的组合。

22. 根据权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述浓集剂是颗粒形式,所述检测容器是无菌且一次性的,并且所述检测容器容纳有所述浓集剂。

23. 根据权利要求 20 所述的试剂盒,其中所述试剂盒包括处于至少一个撕开式密封袋中的至少一个预测量等份的颗粒形式的所述浓集剂。

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 60/977,180 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品传染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测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,能够检测特定细菌存在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菌株的特异性抗体(例如,为抗体包被的磁性珠或非磁性珠的形式)来分离(并由此浓集)特定细菌菌株的方法。然而,这些方法倾向于昂贵,并且比至少一些诊断应用所需的速度稍微慢些。

[0008] 也已经使用了非菌株特异性的浓集方法(例如,以获得样品中所存在的微生物的更为一般性的评估)。在浓集了混合种群的微生物之后,如果需要,通过使用菌株特异性探针来测定特定菌株的存在。

[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提供微生物非特异性捕集的配基。

[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)、样品需求(例如,样品性质和 / 或体积限制)、空间需求、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(涉及不复杂的设备或程序)和 / 或在多种条件下有效(例如,不同

类型样品基质、不同细菌负荷以及不同样品体积)。

[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菌株(例如,细菌、真菌、酵母、原生动物、病毒(包括无包膜病毒和有包膜病毒)和细菌内生孢子的菌株)使得微生物保留用于检测或测定一种或多种菌株的活力的方法。所述方法包括:(a) 提供浓集剂(例如,粒状浓集剂),所述浓集剂包含无定形金属硅酸盐,并且具有金属原子与硅原子比例小于或等于约 0.5 的表面组成,如通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测(例如,球化的滑石);(b) 提供包含至少一种微生物菌株的样品(优选地,为流体形式);以及(c) 使所述浓集剂与所述样品接触(优选地,通过混合接触),使得至少一种微生物菌株的至少一部分被所述浓集剂结合或捕集。优选地,所述方法还包括检测至少一种结合的微生物菌株的存在(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/或离析(优选地,通过重力沉降)所产生的结合微生物的浓集剂。所述方法还可任选包括将所产生的离析的浓集剂与样品分离。

[0013] 本发明的方法不靶向特定的微生物菌株。然而,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。这类材料可以以非菌株特异性方式浓集存在于样品(例如,食品样品)中的微生物菌株,使得可较容易且快速地测定一种或多种微生物菌株(优选地,一种或多种细菌菌株)。

[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菌株特异性材料),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,甚至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低成本、在多种条件下快速检测病原微生物的简单方法的迫切需要。

[0015] 在另一方面,本发明还提供了用于实施本发明的方法的诊断试剂盒,所述试剂盒包括:(a) 浓集剂(优选地,粒状浓集剂),所述浓集剂包含金属硅酸盐,并且具有金属原子与硅原子比例小于或等于约 0.5 的表面组成,如通过 X 射线光电子波谱(XPS)检测;(b) 检测容器(优选地,无菌检测容器);和(c) 有关实施本发明方法中使用浓集剂的说明书。优选地,所述诊断试剂盒还包括一种或多种选自以下的组份:微生物培养基、裂解试剂、缓冲剂、生物发光检测分析组分、基因检测分析组分以及它们的组合。

具体实施方式

[0016] 定义

[0017] 如本专利申请中所使用的:

[0018] “样品”是指通过非修饰方法(即,通过除了将包含上述浓集剂的组合物应用于人体和/或将其从人体移取之外的方法)采集的(例如,待分析的)物质或材料。

[0019] “样品基质”是指除了微生物以外的样品组分。

[0020] “检测”是指鉴定微生物的至少一种组分,由此测定微生物的存在。

[0021] “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。

[0022] “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。

[0023] “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。

[0024] “微生物菌株”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菌株的微生物);并且

[0025] “靶微生物”是指需要检测的任何微生物。

[0026] 浓集剂

[0027] 适用于实施本发明方法的浓集剂包括下述那些:其包含金属硅酸盐,并且具有金属原子与硅原子比例小于或等于约0.5(优选小于或等于约0.4;更优选小于或等于约0.3;最优选小于或等于约0.2)的表面组成,如通过X射线光电子波谱(XPS)检测。优选地,所述表面组成还包括至少约10平均原子%的碳(更优选地,至少约12平均原子%的碳,最优选地,至少约14平均原子%的碳),如通过X射线光电子波谱(XPS)检测。XPS是一种可测定样品表面最外面约3至10纳米(nm)的元素组成并且对于周期表中除了氢和氦之外的所有元素都敏感的技术。XPS是对于大多数元素而言检测极限范围为0.1至1原子%浓度的定量技术。XPS的优选表面组成评价条件可包括相对于具有 ± 10 度接受立体角的样品表面测量的90度飞离角。

[0028] 使用上述浓集剂的浓集或捕集通常对于任何特定株系、种类或类型的微生物来说是非特异性的,因此提供了对样品中一般群落的微生物的浓集。然后,可使用任何已知的检测方法使用菌株特异性探针从捕集的微生物群落中检测特定的微生物菌株。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)。

[0029] 当分散或悬浮于水系统中时,诸如金属硅酸盐之类的无机材料显示具有该材料的特征性表面电荷和水系统的pH。该材料-水界面的电位称为“ ζ 电位”,这可从电泳迁移率(即,从该材料颗粒在置于水系统中的带电荷的电极之间移动的速率)计算得来。用于实施本发明方法的浓集剂具有 ζ 电位,比(例如)常用的金属硅酸盐如普通滑石带有更多负电荷。然而,令人惊讶地,所述浓集剂比滑石更有效地浓集微生物,如细菌,其表面通常倾向于带负电荷。优选地,所述浓集剂在约7的pH具有负 ζ 电位(更优选地,在约7的pH具有范围在约-9毫伏至约-25毫伏的Smoluchowski ζ 电位;甚至更优选地,在约7的pH具有范围在约-10毫伏至约-20毫伏的Smoluchowski ζ 电位;最优选地,在约7的pH具有范围在约-11毫伏至约-15毫伏的Smoluchowski ζ 电位)。

[0030] 可用的金属硅酸盐包括金属的无定形硅酸盐,金属例如为镁、钙、锌、铝、铁、钛等(优选镁、锌、铁和钛,更优选镁)以及它们的组合。优选的是为至少部分熔凝的颗粒形式的无定形金属硅酸盐(更优选无定形球化的金属硅酸盐;最优选无定形球化硅酸镁)。金属硅酸盐是已知的,并且可通过已知方法化学合成或通过天然存在的原矿石的采矿和加工来获得。

[0031] 至少部分熔凝的颗粒形式的无定形金属硅酸盐可通过在控制条件下熔化或软化较小的供料颗粒(例如,平均粒度最多为约25微米)以制造通常是椭圆形或球形的颗粒的任何已知方法来制备(即,具有扩大的通常为圆形和无尖锐角或边缘的二维图像的颗粒,包括实际或基本上是圆球形和椭圆形和任何其他圆形或弯曲形状)。所述方法包括雾化、火

抛光、直接熔化等。优选的方法是焰熔法，其中通过直接熔化或火抛光固体供料颗粒而形成至少部分熔化的基本玻璃质的颗粒（例如，在美国专利号 6,045,913(Castle) 中描述的方法，将其说明内容以引用方式并入本文中）。最优选地，所述方法可通过将大部分的不规则形状的供料颗粒（例如，约 15 至约 99 体积百分数；优选地，约 50 至约 99 体积百分数；更优选地，约 75 至约 99 体积百分数；最优选地，约 90 至 99 体积百分数）转变为通常是椭圆形或球形的颗粒而用于产生无定形球化的金属硅酸盐。

[0032] 一些无定形金属硅酸盐可商购获得。例如，无定形球化硅酸镁可商购获得用于化妆品（例如，3M™ Cosmetic Microspheres CM-111，可从 3M 公司（St. Paul, MN）获得）。

[0033] 除了无定形金属硅酸盐，所述浓集剂还可包含其他材料，包括金属（例如，铁或钛）氧化物、晶态金属硅酸盐、其他晶态材料等，前提条件是所述浓集剂具有上述表面组成。然而，所述浓集剂优选基本不含有晶态二氧化硅。

[0034] 在实施本发明方法中，可以以适于样品接触和微生物捕集的任何形式（例如，以颗粒形式或用于支持物的形式，例如浸渍片、薄膜、过滤器、试管、微孔、培养板、珠、膜或微流体装置的通道等）使用所述浓集剂。优选地，以颗粒形式使用浓集剂，更优选包括微粒（优选地，粒度范围为约 1 微米（更优选地，约 2 微米）至约 100 微米（更优选地，约 50 微米；甚至更优选地，约 25 微米；最优选地，约 15 微米；其中，范围的任何较低限可与任何较高限配对）的微粒）。

[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、临床样品和试验样品以及它们的组合。医学或兽医样品可包括（例如）来自临床诊断待测定的生物来源（例如，人或动物）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）、实验室或可潜在经历生物恐怖的区域。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品供应污染方面常常受到特别的关注。

[0037] 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直接使用，或者，如果需要的话，可通过例如用液体介质（例如，缓冲液）洗涤或漂洗或者悬浮或分散于该液体介质（例如，缓冲液）中的方法萃取。可从表面（例如，通过擦洗或漂洗）获取样品。优选地，样品为流体（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液）。

[0038] 可用于实施本发明方法的样品的例子包括食品（例如，新鲜生产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、引用水、生物流体以及它们的组合（更优选为食品、饮料、引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,所述体积可为千分之十升。

[0040] 本发明方法可从浓集状态的样品分离微生物,并且还使得能从可抑制待使用的检测程序的样品基质组分分离微生物。在所有这些情况中,本发明的方法可排除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。

[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的方法中的任何方法来实施本发明方法。例如,可将浓集剂添加至样品,或者可将样品添加至浓集剂。可将涂覆浓集剂的浸渍片浸于样品溶液中,可将样品溶液倾注至涂覆浓集剂的薄膜上,可将样品溶液倾注至涂覆浓集剂的试管或微孔中,或者可将样品溶液通过涂覆有浓集剂的过滤器(例如,机织滤布或无纺滤布)。

[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,盖帽的容器、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)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,可在尺寸和性质上有很大程度不同。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,Erlenmeyer 锥形瓶或聚丙烯大口瓶)。容器、浓集剂以及直接接触样品的任何其他装置或附属物可在使用前进行灭菌(例如,通过控制热、环氧乙烷气或辐射来进行),以减轻或防止可导致检测误差的任何样品污染。足以捕集或浓集特定样品的微生物用于成功检测的浓集剂的量将不同(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 毫克浓集剂是可用的。

[0044] 如果需要,可通过将粒状浓集剂至少一次通过样品来产生接触(例如,通过依赖经一段时间例如约 10 分钟的重力沉降)。可通过混合(例如,通过搅拌、摇动或使用振动台)使得浓集剂颗粒重复通过样品的大部分或经样品的大部分沉降来增强接触。对于微升级的小体积(通常,小于 0.5 毫升)来说,可通过快速的如涡旋或“回转”来混合,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)级的较大体积来说,可通过以“端对端”的方式轻柔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。可借助于例如配置成容纳试管或其他类型反应容器并以“端对端”方式缓慢旋转试管或容器的装置来实现所述翻转。可进行所需时间的接触(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、振动或搅拌)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样品(优选为流体)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物中,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,磁性珠)、微生物培养基、缓冲剂(例如,润湿固体样品的缓冲剂)、微生物染色试剂、洗液(例如,洗除未

结合材料的洗液)、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] 如果需要,可将浓集剂(单独,或与例如抗微生物材料和/或与液体形式的载体材料(例如水或油)、固体(例如,纤维、聚合物、纸或无机固体)、凝胶、乳膏、泡沫或糊剂组合)涂覆至无孔或多孔、固体、污染微生物的或可污染微生物的材料或表面,或针对无孔或多孔、固体、污染微生物的或可污染微生物的材料或表面摩擦(例如,用作“清洁”剂)。如果需要,可使用粘合剂、稳定剂、表面活性剂或其他特性改性剂。

[0047] 对于这样的用途,可将浓集剂涂覆至机织物或无纺布,并且可涂覆至一次性表面,例如纸、组织、棉拭子以及多种吸附性和非吸附性材料。例如,可将浓集剂掺入布或纸载体材料,以用作“清洁”擦拭物。可将浓集剂涂覆至(例如,以包含载体材料的擦拭物或糊剂的形式)固体表面,例如,在家庭、日间护理、工业以及医院设施中用于清洗玩具、设备、医学装置、工作表面等。当用于清洗或其他目的时,如果需要,可同时采集样品并在单独的步骤中使样品与浓集剂接触。

[0048] 离析和/或分离

[0049] 任选地但也优选地,本发明的方法还包括离析所产生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(重力沉积,例如,经约 5 分钟至约 30 分钟的时间段)实现这样的离析。然而,在一些情况下,促进离析(例如,通过离心或过滤)或使用任何离析方法的组合是理想的。

[0050] 本发明的方法还可任选包括分离产生的结合微生物的浓集剂和样品。对于流体样品而言,这可包括去除或分离离析时产生的上清液。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位于实施本发明方法中使用的容器或器皿的底部)实现上清液的分离。

[0051] 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)。

[0052] 检测

[0053] 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、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(优选为细菌、酵母、病毒、细菌内生孢子、真菌以及它们的组合;更优选为细菌、酵母、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合;甚至更优选为细菌、病毒、细菌内生孢子以及它们的组合;最优选为革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、无包膜病毒(例如,诺沃克病毒(norovirus)、脊髓灰质炎病毒、甲型肝炎病毒、鼻病毒以及它们的组合)、细菌内生孢子以及它们的组合)。所述方法可用于检测病原体,这对于食品安全或对于医学、环境或反恐恐怖主义原因来说是重要的。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)。

[0054] 待检测的靶微生物属包括(但不限于)李斯特菌(Listeria)、埃希杆菌(Escherichia)、沙门氏菌(Salmonella)、弯曲杆菌(Campylobacter)、梭状芽孢杆菌(Clostridium)、缠绕杆菌(Helicobacter)、分枝杆菌(Mycobacterium)、葡萄球菌(Staphylococcus)、志贺氏菌(Shigella)、肠球菌(Enterococcus)、芽孢杆菌(Bacillus)、

奈瑟氏菌 (*Neisseria*)、志贺氏菌 (*Shigella*)、链球菌 (*Streptococcus*)、弧菌 (*Vibrio*)、耶尔森氏菌 (*Yersinia*)、博德特氏菌 (*Bordetella*)、包柔氏螺旋体 (*Borrelia*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、酵母菌 (*Saccharomyces*)、念珠菌 (*Candida*) 等以及它们的组合。样品可含有多种微生物菌株,并且任何一种菌株可独立于任何其他菌株而被检测到。可作为用于检测的靶的具体微生物菌株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 (*Vibrioparahaemolyticus*)、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、酿酒酵母菌、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)。

[0055] 由浓集剂捕集或结合 (例如,通过吸附) 的微生物可通过目前已知或将来开发的基本任何所需方法来检测。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) 以及其它成像方法、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。

[0056] 免疫检测是对衍生自靶生物体的抗原物质的检测,该抗原物质通常是用作细菌或病毒颗粒表面标志的生物分子 (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。

[0057] 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,通过使用荧光染料、使用量子点或使用可产生化学发光或有色底物的酶来标记初级抗体或次级抗体,和使用读板机或侧流装置) 来检测抗体结合。

[0058] 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成使得它们的遗传物质可用于检测。裂解方法是熟知的,并包括 (例如) 下述处理,例如声裂法、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。

[0059] 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。盐浓度和温度的高严格条件可限制对靶的准确核酸序列的检测。因此,使用高度严格的基因检测可区分靶核酸序列中具有小变异度的微生物菌株。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探针标记,

例如放射性标记、荧光标记以及化学发光标记,其用于在凝胶电泳、毛细管电泳或其他分离方法之后检测杂交物。

[0060] 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))和等温法以及链置换扩增(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)。

[0061] 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。

[0062] 由于本发明方法是非菌株特异性的,它提供了允许在相同样品中对多种微生物菌株靶向以进行检测的常用捕集系统。例如,在测定食品样品的污染中,检测相同样品中的所有单核细胞增多性李斯特菌、大肠埃希氏杆菌以及沙门氏菌是合乎需要的。然后,在单个捕集步骤之后可为(例如)使用扩增来自这些微生物菌株中各菌株的不同核酸序列的特异性引物的PCR或RT-PCR测定。因此,可避免对各菌株的分开样品处理和制备程序的需要。

[0063] 诊断试剂盒

[0064] 用于实施本发明方法的试剂盒包括:(a)上述浓集剂(优选地,为颗粒);(b)检测容器(优选地,无菌检测容器);和(c)有关在实施本发明方法中使用浓集剂的说明书。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、荧光酶、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。

[0065] 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),连同用以在实施本发明方法中使用所述试剂的说明书(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,以及检测浓集剂结合的至少一种靶微生物菌株的存在)。任选地,浓集剂可在含有防腐剂的小量缓冲液中水合,以增强储存和运输过程中的稳定性和/或可容纳/等分于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,诊断试剂盒包括粒状浓集剂的预测量的等分试样(例如,基于样品体积),更优选地,其容纳于一个或多个撕开式密封袋内。

[0066] 实施例

[0067] 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。

[0068] 材料

[0069] 晶态硅酸镁浓集剂(下文中为Talc)购自Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ)。所有微生物培养物均购自美国模式培养物保藏中心(ATCC; Manassas, VA)。

[0070] 无定形球化硅酸镁浓集剂(下文中为AS-Talc)以3M™ Cosmetic Microspheres CM-111获得(固体球形形状,2.3g/立方米的颗粒密度,3.3m²/g的表面积,颗粒大小:90%

小于约 11 微米,50%小于约 5 微米,10%小于约 2 微米,获得自 3M 公司 (St. Paul, MN))。

[0071] ζ 电位测量

[0072] 使用装配有 TM200 自动滴定模块、pH 电极和在线电导池的 Colloidal Dynamics Acoustosizer II™ 多频电声光谱仪 (ColloidalDynamics, Warwick, RI) 将 Talc 和 AS-Talc 浓集剂 (于 18 兆欧姆去离子水 (通过使用 Millipore Corporation, Bedford, MA 的 Milli-Q™ Elix 10™ Synthesis A10 去离子系统获得) 中的分别为 5.75 重量百分数的 Talc 和 5.8 重量百分数的 AS-Talc) 的水分散体的 ζ 电位作为添加的盐酸 (pH) 的函数来进行测量。使用极性校正和极性样品沉降用下述常用参数进行测量:

[0073] 起始体积:170mL 分散体

[0074] 滴定体积:终末时 5 至 10mL;各滴定为 20 步,

[0075] 滴定剂:1.0N 水中的盐酸

[0076] (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)

[0077] 搅拌速率:300 转 / 分钟 (rpm)

[0078] 泵速率:400mL/ 分钟

[0079] 混合延迟时间:在测量前酸加成之后搅拌 120 秒

[0080] 在约 7 的 pH, AS-Talc 表现出约 -12mV 的 Smoluchowski ζ 电位, Talc 表现出约 -8mV 的 Smoluchowski ζ 电位。

[0081] 表面组成分析

[0082] 通过 X 射线光电子波谱 (XPS, 也称为 ESCA) 分析 Talc 和 AS-Talc 浓集剂的样品的表面组成。将粉末样品压至铝箔上的双面压敏粘合带上。通过用压缩氮气扫动来从各样品表面去除多余的粉末。

[0083] 使用具有单色 Al-K。X 射线激发源 (1487eV) 的 Kratos AXIS Ultra™ DLD 光谱仪 (Kratos Analytical, Manchester, England) 和在恒定通过能量模式操作的半球电子能量分析仪获取光谱数据。在相对于 ±10 度的接受立体角的样品表面测量的 90 度的飞离角检测发射的光电子。低能量泛射式电子枪用于使表面带电荷最小化。使用 140 瓦特阳极功率和 2×10^{-8} 托的腔室压进行测量。

[0084] 对各浓集剂样品表面测量的约 300 微米至约 700 微米的区域进行各数据点的分析。分析各样品上三个区域,并取平均数,获得所报道的平均原子%数值。使用标准的 Vision2™ 软件 (Kratos Analytical, Manchester, England) 进行数据处理。结果 (以 XPS 可检测到的水平存在于浓集剂表面的元素) 显示于下面的列表 A 中:

[0085] 表 A。

[0086]

浓集剂	镁 (平均 原子%)	硅 (平均 原子%)	镁与硅 的比例	碳 (平均 原子%)	氧 (平均 原子%)
Talc	17	26	0.65	6.9	50
AS-Talc	6.5	32	0.20	14	47

[0087] 镁浓集试验方法

[0088] 将分离的微生物集落接种于 5mL BBL™ Trypticase™ 大豆肉汤 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 中并在 37℃ 孵育 18-20 小时。在 pH7.2 的吸附缓冲液 (含 5mM KCl、1mM CaCl₂、0.1mM MgCl₂, 以及 1mMKHPO₄) 中以每 mL 约 10⁹ 个集落形成单位稀释该过夜培养物, 获得每 mL 稀释液 10³ 个微生物。将 1.1mL 体积的微生物稀释液添加至各标记的含 10mg 浓集剂的 5mL 无菌聚丙烯管 (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 给各管盖上帽, 并在 Thermolyne Maximix Plus™ vortex 混合器 (Barnstead International, Iowa) 上混合。在室温 (25℃) 下于 Thermolyne Vari Mix™ 振动器平台 (Barnstead International, Iowa) 上孵育各盖帽的管 15 分钟。在孵育后, 使得各管立在实验台上 10 分钟, 以沉降浓集剂。以相同方式处理含有 1.1mL 无浓集剂的微生物稀释液的对照样品管。然后将所产生的沉降的浓集剂和 / 或上清液 (以及对照样品) 用于分析。

[0089] 根据制造商的说明书, 将沉降的浓集剂重悬浮于 1mL 无菌巴特菲尔德氏 (Butterfield's) 缓冲溶液 (pH 7.2±0.2; 磷酸二氢钾缓冲溶液; VWR Catalog Number 83008-093, VWR, West Chester, PA) 中并铺板于 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板培养基 (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)) 对菌落总数计数进行定量。使用下式计算结果:

[0090] 重悬浮的浓集剂中的 CFU 百分数 /mL =

[0091] (来自铺板的重悬浮的浓集剂的集落数) / (来自铺板的未处理的对照样品的集落数) × 100

[0092] (其中, CFU = 集落形成单位, 其为活的或有活力的微生物的单位)。

[0093] 然后使用下式根据微生物被浓集剂捕集的百分数来报告结果:

[0094] 捕集效率或捕集百分数 = 重悬浮的浓集剂中的 CFU 百分数 /mL

[0095] 为了比较的目的, 在至少一些情况下, 移取 1mL 上清液, 未稀释地进行铺板或在巴特菲尔德氏缓冲溶液中以 1 : 10 稀释进行铺板, 将其铺板至 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板培养基上。使用 3M™ Petrifilm™ 读板机 (3M 公司, St. Paul., MN) 对菌落总数计数板进行定量。使用下式计算结果:

[0096] 上清液中的 CFU 百分数 /mL =

[0097] (来自铺板的上清液的集落数) / (来自铺板的未处理的对照样品的集落数) × 100

[0098] (其中, CFU = 集落形成单位, 其为活的或有活力的微生物的单位)。

[0099] 当微生物集落和浓集剂的颜色相似时 (读板机显示的差别很小), 结果是基于上清液, 然后使用下式根据微生物被浓集剂捕集的百分数来报告结果:

[0100] 捕集效率或捕集百分数 = 100 - 上清液中的 CFU 百分数 /mL

[0101] 实例 1 和 2 以及比较例 1 和 2

[0102] 使用上述微生物浓集试验方法, 分别测定 10mg 无定形球化硅酸镁 (如上所述制备, 下文中为 AS-Ta1c) 和晶态 (非球化的) 硅酸镁 (下文中为 Ta1c) 对靶微生物的细菌浓集, 所述靶微生物为革兰氏阴性菌肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 和革兰氏阳性菌的金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)。结果示于下面的表 1 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0103] 表 1。

[0104]

实例号	微生物	浓集剂	捕集百分数
C-1	葡萄球菌	Talc	58
1	葡萄球菌	AS-Talc	99
C-2	沙门氏菌	Talc	69
2	沙门氏菌	AS-Talc	92

[0105] 实例 3-5 和比较例 3-5

[0106] 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 AS-Talc 和 Talc 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。结果示于下面的列表 2 中(所有样品的标准差均小于 10%)。

[0107] 表 2。

[0108]

实例号	微生物	浓集剂	浓集剂的量 (mg/mL)	捕集百分数
C-3	沙门氏菌	Talc	1	63
3	沙门氏菌	AS-Talc	1	82
C-4	沙门氏菌	Talc	5	64
4	沙门氏菌	AS-Talc	5	90
C-5	沙门氏菌	Talc	10	69
5	沙门氏菌	AS-Talc	10	95

[0109] 实例 6-8 和比较例 6-8

[0110] 使用上述微生物浓集试验方法,分别对 10mg AS-Talc 和 Talc 针对不同细菌浓度的靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌(ATCC35987)进行试验。结果示于下面的表 3 中。

[0111] 表 3。

[0112]

实例号	微生物	浓集剂	微生物浓度 (CFU/mL)	捕集百分数 ± 标准差
C-6	沙门氏菌	Talc	10	68±9
6	沙门氏菌	AS-Talc	10	92±11
C-7	沙门氏菌	Talc	100	74±3
7	沙门氏菌	AS-Talc	100	98±3
C-8	沙门氏菌	Talc	1000	69±1
8	沙门氏菌	AS-Talc	1000	92±1

[0113] 实例 9-11 和比较例 9-11

[0114] 使用上述微生物浓集试验方法,分别测定 10mg AS-Talc 和 Talc 对孵育 5、10 和 15 分钟的靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 的细菌浓集。结果示于下面的表 4 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0115] 表 4。

[0116]

实例号	微生物	浓集剂	孵育时间 (分钟)	捕集 百分数
C-9	沙门氏菌	Talc	5	74
9	沙门氏菌	AS-Talc	5	97
C-10	沙门氏菌	Talc	10	77
10	沙门氏菌	AS-Talc	10	96
C-11	沙门氏菌	Talc	15	75
11	沙门氏菌	AS-Talc	15	92

[0117] 实例 12 和比较例 12

[0118] 使用上述微生物浓集试验方法,除了使用巴特菲尔德氏缓冲液替代吸附缓冲液外,分别对 10mg AS-Talc 和 Talc 针对靶微生物酿酒酵母菌 (10^2 CFU/mL; ATCC 201390) 的酵母菌浓集进行试验。根据制造商的说明书将所产生的材料铺板于 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。对分离的酵母集落进行人工计数,并如上所述计算出捕集百分数。AS-Talc 的捕集百分数为 97%,Talc 的捕集百分数为 82% (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0119] 实例 13-15

[0120] 食品样品购自当地的杂货店 (Cub Foods, St. Paul)。在无菌玻璃皿中称量火鸡片和苹果汁 (11g), 并将其添加至无菌 Stomacher™ 聚乙烯过滤袋 (Seward Corp, Norfolk, UK) 中。以 10^2 CFU/mL 的浓度使用细菌培养物, 使用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) 给食品样品加料。然后, 添加 99mL 巴特菲尔德氏缓冲液至各加料的样品。在 Stomacher™400 Circulator 实验室搅拌机 (Seward Corp, Norfolk, UK) 中搅拌所得样品 2 分钟的循环。将所搅拌的样品收集在无菌 50mL 离心管 (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中, 以 2000 转 / 分钟 (rpm) 离心 5 分钟, 以去除大的碎片。将所得上清液用作进一步试验的样品。将基于苹果汁的上清液的 pH 调节至 7.2, 然后通过添加 1N 氢氧化钠 (VWR, West Chester, PA) 进行试验。将来自饮水喷头的引用水 (100mL) 收集在无菌的 250mL 玻璃瓶 (VWR, West Chester, PA) 中, 用 10^2 CFU/mL 的靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 接种, 人工端对端混合 5 次, 在室温 (25℃) 下孵育 15 分钟。将该水样品用于进一步的试验。

[0121] 使用上述微生物浓集试验方法, 将各 1mL 如上所述制备的样品分别添加至含有 10mg AS-Talc 的试管中, 针对靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 的细菌浓集进行试验。结果示于下面的表 5 中 (所有样品的标准差均小于 10%)。

[0122] 表 5。

[0123]

实例号	微生物	浓集剂	样品	捕集百分数
13	沙门氏菌	AS-Talc	苹果汁	86
14	沙门氏菌	AS-Talc	火鸡	78
15	沙门氏菌	AS-Talc	饮用水	98

[0124] 实例 16 和 17

[0125] 测试 AS-Talc 对靶微生物的浓集, 所述靶微生物为来自大体积样品 (每 30mL 样品体积 300mg AS-Talc) 的肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987)。将来自饮水喷头的引用水 (100mL) 收集在无菌 250mL 的玻璃瓶 (VWR, West Chester, PA) 中, 用 10^2 CFU/mL 的靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 进行接种。人工端对端混合所得接种水 5 次, 在室温 (25℃) 下孵育 15 分钟。将 30mL 孵育水的样品添加至含有 300mgAS-Talc 的无菌 50mL 圆锥形聚丙烯离心管 (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 通过使用上述微生物浓集试验方法进行试验。将所产生的沉降的 AS-Talc 重悬浮于 30mL 无菌巴特菲尔德氏缓冲液中, 将 1mL 产生的悬浮液铺板于 3M™ Petrifilm™ 菌落总数计数板培养基。捕集百分数为 98% (标准差小于 10%)。

[0126] 将来自当地杂货店 (Cub Foods, St. Paul) 的全部葡萄西红柿 (11g) 置于无菌培养皿中, 并用 10^2 CFU/mL 的靶微生物肠道沙门氏菌亚种鼠伤寒沙门氏菌 (ATCC 35987) 进行接种, 通过回荡 5 次进行人工混合, 并在室温 (25℃) 下孵育 5 分钟。将西红柿添加至含有 99mL 巴特菲尔德氏缓冲液的无菌 Stomacher™ 聚乙烯过滤袋 (Seward Corp, Norfolk, UK)。通过回荡 1 分钟混合该袋的内容物。将 30mL 样品添加至含有 300mgAS-Talc 的无菌的 50mL 圆锥形聚丙烯离心管 (BD Falcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。通过以 2000rpm

离心 5 分钟 (Eppendorf, Westbury, NY) 沉降 AS-Talc 颗粒。将沉降的颗粒重悬浮于 30mL 无菌巴特菲尔德氏缓冲液中, 将 1mL 所得悬浮液铺板于 3M™ 菌落总数计数板培养基。捕集百分数为 99% (标准差小于 10%)。

[0127] 实例 18 和 19

[0128] 测试 10mg AS-Talc 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。使用下列修改方案来利用上述微生物浓集试验方法: 过夜培养物分别具有 2×10^2 CFU/mL 萎缩芽孢杆菌和 7×10^2 CFU/mL 枯草芽孢杆菌; 将产生的上清液未经稀释铺板; 将沉降的带有萎缩芽孢杆菌的浓集剂重悬浮于 1mL 无菌巴特菲尔德氏缓冲液中并进行铺板; 以及将沉降的带有结合的枯草芽孢杆菌的浓集剂重悬浮于 5mL 无菌巴特菲尔德氏缓冲液中并进行铺板 (各 1mL)。基于铺板的上清液的计数计算捕集效率, 结果示于下面的表 6 中 (所有样品的标准差均小于 0%)。

[0129] 表 6。

[0130]

实例号	微生物	浓集剂	捕集百分数
18	萎缩芽孢杆菌	AS-Talc	97
19	枯草芽孢杆菌	AS-Talc	95

[0131] 实例 20 和 21

[0132] 检测 10mg AS-Talc 对无包膜的感染细菌的靶病毒大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2 (ATCC 15597-B1; 其常用作多种感染人类的无包膜肠道病毒的替代品) 的浓集。双层琼脂方法 (下文所述) 用于测定使用大肠埃希氏杆菌 (ATCC 15597) 作为宿主对大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2 (ATCC 15597-B1) 的捕集。

[0133] 在 pH7.2 的无菌 $1 \times$ 吸附缓冲液 (含有 5mM KCl、1mM CaCl_2 、0.1mM MgCl_2 , 以及 1mM K_2HPO_4) 中 10 倍系列稀释大肠埃希氏杆菌噬菌体 MS2 原种, 分别获得每毫升 10^3 和 10^2 噬斑形成单位 (PFU/mL) 的稀释度。将 1.0mL 体积的所得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°C) 下于 Thermolyne VariMix™ 振动器平台 (Barnstead International, Iowa) 上孵育各盖帽的管 15 分钟。孵育后, 使管立在实验台上 10 分钟, 以沉降浓集剂。以相同方式处理含有 1.0mL 无浓集剂的噬菌体稀释液的对照样品管。然后将所得的沉降的浓集剂和 / 或上清液 (以及对照样品) 用于分析。

[0134] 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。

[0135] 双层琼脂方法:

[0136] 将单集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) 的振动培养箱 (Innova™ 44, New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ) 中在 37°C 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 的振动培养箱中于 37℃ 孵育所得培养物, 获得指数期的大肠埃希氏杆菌细胞, 如使用 SpectraMax M5 分光光度计 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 通过 550nm 的吸光度 (吸光度值 0.3-0.6) 所测量。将细胞在冰上孵育直至用于测定。

[0137] 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。将所得样品与 5mL 无菌熔化的顶层琼脂 (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。使混合物的熔化的琼脂组分固化 5 分钟, 倒置培养皿或培养板并在 37℃ 下孵育。过夜孵育后, 目测检查培养板, 含有沉降的浓集剂的那些板 (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, 经测定对于 10^2 PFU/mL 的稀释液而言为 72% (标准差小于 10%)。

[0138] 实例 22

[0139] 苹果汁购自当地杂货店 (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。通过回荡混合所得组合物 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), 用各自为 1CFU/mL 浓度的这两种细菌培养物给所述组合物加料。如上所述在 $1 \times$ 吸附缓冲液中制备细菌原种的系列稀释液。

[0140] 使用上述微生物浓集试验方法, 将 10mL 体积的加料的苹果汁样品添加至含有 100mg AS-Talc 的无菌的 50mL 圆锥形聚丙烯离心管 (BDFalcon™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), 并孵育 15 分钟用于靶微生物沙门氏菌 (存在大肠埃希氏杆菌, 一种竞争微生物) 的细菌捕集/浓集。去除所得上清液, 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。给管松动地盖上帽, 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™ 沙门氏菌测流免疫测定试验带检测所得肉汤混合物的沙门氏菌的存在。试验带的目测检查显示其为沙门氏菌阳性。

[0141] 还对含有微生物的肉汤混合物进行通过聚合酶链反应 (PCR) 的核酸检测。使用来自 Applied Biosystems (Foster City, CA) 的 TaqMan™ ABI 肠道沙门氏菌检测试剂盒, 测定作为试验样品的 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。从对照样品获得 17.71 的平均 ($n = 2$) 循环阈值 (CT 值)。从含有浓集剂的检测样品获得 19.88 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。

[0142] 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情况下, 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。