



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103228794 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 31

(21) 申请号 201180056543. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 11. 23

C12Q 1/02 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/06 (2006. 01)

61/420, 045 2010. 12. 06 US

C12M 1/16 (2006. 01)

C12M 1/34 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/062069 2011. 11. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02012/078374 EN 2012. 06. 14

(71) 申请人 3M 创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

(72) 发明人 M·克施尔萨加尔 A·W·雷宾斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈长会

权利要求书3页 说明书25页

(54) 发明名称

微生物浓集方法和装置

(57) 摘要

本发明提供了一种捕获或浓集微生物以便检测或测定的方法,其包括(a)提供浓集装置,所述浓集装置包括(1)多孔纤维非织造基质和(2)至少一种浓集剂的多个粒子,所述浓集剂包含硅藻土,所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中;(b)提供包含至少一种靶细胞分析物的样品;(c)使所述浓集装置与所述样品接触,从而所述至少一种靶细胞分析物的至少一部分由所述浓集装置结合或捕获;以及(d)检测至少一种结合的靶细胞分析物的存在。

1. 一种浓集方法,包括
 - (a) 提供浓集装置,其包括
 - (1) 多孔纤维非织造基质,以及
 - (2) 至少一种浓集剂的多个粒子,所述浓集剂包含硅藻土,所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中;
 - (b) 提供包含至少一种靶细胞分析物的样品;
 - (c) 使所述浓集装置与所述样品接触,从而所述至少一种靶细胞分析物的至少一部分由所述浓集装置结合或捕获;以及
 - (d) 检测至少一种结合的靶细胞分析物的存在。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多孔纤维非织造基质通过湿成网方法形成。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述多孔纤维非织造基质包含至少一种原纤化纤维。
4. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述多孔纤维非织造基质的纤维选自聚合物纤维、无机纤维以及它们的组合。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述聚合物纤维包含选自聚酰胺、聚烯烃、聚砜以及它们的组合的至少一种聚合物。
6. 根据权利要求4或权利要求5所述的方法,其中所述无机纤维包含选自玻璃、陶瓷以及它们的组合的至少一种无机材料。
7. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述多孔纤维非织造基质包含至少一种聚合物粘合剂。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述聚合物粘合剂选自聚合物树脂、聚合物粘合剂纤维以及它们的组合。
9. 根据权利要求7或权利要求8所述的方法,其中所述聚合物粘合剂基本上不附着于所述浓集剂粒子。
10. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述粒子机械夹带于所述多孔纤维非织造基质之中。
11. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述粒子包括微粒子。
12. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述硅藻土已经受到表面改性来增强其浓集微生物的能力。
13. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合。
14. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含至少一种金属氧化物。
15. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含至少一种金属氧化物,所述金属氧化物选自二氧化钛、氧化铁以及它们的组合。
16. 根据权利要求1或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述样品处于流体形

式。

17. 根据权利要求 1 或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述靶细胞分析物选自细菌、真菌、酵母、原生动物、病毒、细菌内生孢子的细胞、其组分以及它们的组合。

18. 根据权利要求 1 或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述接触通过将所述样品通过所述浓集装置而实施。

19. 根据权利要求 1 或任何其他前述权利要求所述的方法,其中所述检测通过选自以下方法来实施: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、基于发光的检测方法以及它们的组合。

20. 一种浓集方法,包括

(a) 提供浓集装置,其包括

(1) 多孔纤维非织造基质,其包括

(i) 至少一种原纤化纤维,以及

(ii) 至少一种聚合物粘合剂,以及

(2) 至少一种浓集剂的多个粒子,所述至少一种浓集剂包含硅藻土,所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合;

所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中;

(b) 提供流体样品,其包含至少一种靶细胞分析物;以及

(c) 将所述流体样品以如此方式通过所述浓集装置,从而所述至少一种靶细胞分析物的至少一部分由所述浓集装置结合或捕获。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述方法还包括检测至少一种结合的靶细胞分析物的存在;和/或其中所述表面改性剂包含至少一种金属氧化物;和/或其中所述多孔纤维非织造基质通过湿成网方法形成。

22. 一种浓集装置,包括

(a) 多孔纤维非织造基质;以及

(b) 至少一种浓集剂的多个粒子,所述至少一种浓集剂包含硅藻土,所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合;

其中所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中。

23. 一种试剂盒,包括:

(a) 根据权利要求 22 所述的至少一种浓集装置;和

(b) 用于实施根据权利要求 1 所述的方法的至少一种测试容器或测试试剂。

24. 一种用于制备浓集装置的方法,包括:

(a) 提供多根纤维;

(b) 提供至少一种浓集剂的多个粒子,所述至少一种浓集剂包含硅藻土,所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合;以及

(c) 将所述多根纤维的至少一部分形成使所述多个粒子的至少一部分网结于其中的多孔纤维非织造基质。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,其中所述形成过程通过湿成网方法实施;和/或其中所述表面改性剂包含至少一种金属氧化物。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中所述湿成网方法包括

(a) 在至少一种分散液中形成所述多根纤维、所述多个粒子以及至少一种聚合物粘合剂的分散体;

(b) 将所述聚合物粘合剂沉积于所述多根纤维的至少一部分上;以及

(c) 从所述分散体中除去所述分散液。

27. 一种过滤介质,包括:

(a) 多孔纤维非织造基质;和

(b) 至少一种浓集剂的多个粒子,所述至少一种浓集剂包含硅藻土,所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂,所述表面处理剂包含表面改性剂,所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合;

其中所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中。

微生物浓集方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及用于捕获或浓集微生物,从而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这类方法的浓集装置(以及包括这些装置的诊断试剂盒)并涉及用于装置制备的方法。

背景技术

[0002] 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,测定多种临床样品、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种类和/或量常常是合乎需要的或是必要的。

[0003] 例如,可以分析细菌 DNA 或细菌 RNA,以便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。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。可以对细菌样品进行平板涂布或培养,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延缓评估结果。

[0004] 浓集样品中的细菌可以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针对特定细菌菌株特异的抗体(例如,以抗体包被的磁性粒子或非磁性粒子形式)来分离(并由此浓集)所述菌株的方法。然而,这些方法往往倾向于昂贵,而且对于至少一些诊断应用来说速度仍比期望的稍慢。

[0005] 也已经使用了并非菌株特异性的浓集方法(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)。在浓集微生物混合群体之后,如果需要,可以通过使用菌株特异性探针确定特定菌株的存在。

[0006] 已经通过基于糖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获。涂覆壳聚糖的支持物已经用作非特异性捕获装置,并且用作微生物营养素的物质(例如,糖、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获。

[0007] 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、色谱法、离心和重力沉降)已经被用于非特异性捕获,其使用和/或不使用无机结合剂。这些非特异性浓集方法具有不同的速度(至少一些食品检测程序仍需要至少过夜孵育作为主培养富集步骤)、成本(至少一些需要昂贵的设备、材料和/或受训技术人员)、样品要求(例如,样品特性和/或体积限制)、空间要求、易于使用性(至少一些需要复杂的多步骤方法)、就地使用的合适性和/或有效性。

发明内容

[0008] 因此,我们认识到迫切需要用于快速检测病原微生物的方法。这类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,不同类型样品基质和/或病原微生物、不同微生物负荷、以及不同样品体积)有效。

[0009] 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

物菌株（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）和细菌内生孢子的菌株）的方法，使得微生物保留活力以便检测或测定一种或多种菌株。该方法包括 (a) 提供浓集装置，该浓集装置包含 (1) 多孔纤维非织造基质和 (2) 至少一种浓集剂的多个粒子，该浓集剂包含硅藻土（优选地是表面改性的硅藻土），所述粒子网结于多孔纤维非织造基质中；(b) 提供样品（优选地以流体的形式），该样品包含至少一种靶细胞分析物（例如，至少一种微生物菌株）；(c) 使浓集装置与样品接触（优选地使该样品通过该浓集装置）从而至少一种靶细胞分析物的至少一部分由该浓集装置结合或捕获；以及 (d) 检测至少一种结合的靶细胞分析物的存在。

[0010] 该方法还可以任选地包括将浓集装置与样品分离和 / 或培养性地富集至少一种结合的靶细胞分析物（例如，通过在通用或微生物特异性的培养基中孵育分离的浓集装置，这取决于需要通用的微生物富集还是选择性的微生物富集）和 / 或在样品接触（例如，通过使洗脱剂或裂解剂通过浓集装置）之后将捕获的靶细胞分析物（例如，微生物或其一种或多种组分）与浓集装置隔离或分离。然而，如果需要，对所述靶细胞分析物的检测（例如，通过基于培养物的、显微法 / 成像、遗传学、基于荧光的或免疫检测方法）通常可在该浓集装置存在的情况下进行。

[0011] 本发明的方法并非靶向于特定的细胞分析物（例如，特定的微生物菌株）。相反，已经发现，包含网结于多孔纤维非织造基质中的某些相对廉价的无机材料的浓集装置可以在捕获多种微生物方面出乎意料地有效（并且相对不具有无机材料的相应装置而言，在通过洗脱隔离或分离捕获的微生物方面出乎意料地有效）。这类装置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，使得可更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）。

[0012] 本发明的方法是相对简单和低成本的（无需复杂的装备或昂贵的菌株特异性材料）并且可以是相对快速的（相对于未与浓集装置接触的对应对照样品，优选的实施例在低于约 10 分钟内捕获至少约 70%（更优选地，至少约 80%；最优选地，至少约 90%）的存在于相对均质的流体样品中的微生物）。与单独使用粒状浓集剂相比，本发明的方法可以在仅使用相对短样品接触时间（例如，短至约 20 秒）且无需沉降步骤的情况下在微生物捕获方面出乎意料地有效。

[0013] 本发明的方法还出乎意料地是“分析适用的 (assay-friendly)”。检测通常可以在浓集装置存在下有效进行而无显著的分析干扰（例如，不存在由于浓集装置对分析试剂的吸收而造成的检测误差或由于分析抑制剂从浓集装置中的浸出而造成的检测误差）。这实现了在采样环境下快速（例如，快至 10 分钟或更短时间）进行浓集和检测。

[0014] 另外，该方法可以对于多种微生物（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以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] 本发明的方法可以尤其有利于浓集食品样品中的微生物（例如，含颗粒的食品样品，尤其是包含相对较粗颗粒的那些），因为所述方法中所用的浓集装置与至少一些过滤装置（例如，绝对的微米过滤器）相比可以显示具有至少更大的抗阻塞性。这可以促进更完整的样品处理（这对于消除食品检测中的假阴性测定至关重要）和相对较大体积样品的处

理（例如，在现场条件下）。

[0016] 优选的浓集方法包括

[0017] (a) 提供浓集装置，其包含

[0018] (1) 多孔纤维非织造基质，其包含 (i) 至少一种原纤化纤维和 (ii) 至少一种聚合物粘合剂，以及

[0019] (2) 至少一种浓集剂的多个粒子，所述至少一种浓集剂包含硅藻土，所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂，所述表面处理剂包含表面改性剂，所述表面改性剂包含金属氧化物（优选地是二氧化钛或氧化铁）、细纳米级金或铂或它们的组合；所述粒子网结于多孔纤维非织造基质中；

[0020] (b) 提供流体样品，其包含至少一种靶细胞分析物；以及

[0021] (c) 使流体样品以如此方式通过浓集装置，从而至少一种靶细胞分析物的至少一部分由浓集装置结合或捕获。

[0022] 在另一方面，本发明还提供了浓集装置，其包含 (a) 多孔纤维非织造基质；以及 (b) 至少一种浓集剂的多个粒子，所述至少一种浓集剂包含硅藻土，所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂，所述表面处理剂包含表面改性剂，所述表面改性剂包含金属氧化物（优选地是二氧化钛或氧化铁）、细纳米级金或铂或它们的组合；其中所述粒子网结于多孔纤维非织造基质中。本发明还提供了用于进行本发明的浓集方法的诊断试剂盒，该试剂盒包含 (a) 至少一种本发明的浓集装置；以及 (b) 用于进行上述浓集方法的至少一种测试容器或测试试剂。

[0023] 在又一方面，本发明提供了用于制备浓集装置的方法，所述方法包括 (a) 提供多根纤维；(b) 提供至少一种浓集剂的多个粒子，所述至少一种浓集剂包含硅藻土，所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂，所述表面处理剂包含表面改性剂，所述表面改性剂包含金属氧化物（优选地是二氧化钛或氧化铁）、细纳米级金或铂或它们的组合；以及 (c) 将多根纤维的至少一部分形成使所述多个粒子的至少一部分网结于其中的多孔纤维非织造基质。

[0024] 在又一方面，本发明还提供了过滤介质，其包含 (a) 多孔纤维非织造基质；以及 (b) 至少一种浓集剂的多个粒子，所述至少一种浓集剂包含硅藻土，所述硅藻土在其表面的至少一部分上载有表面处理剂，所述表面处理剂包含表面改性剂，所述表面改性剂包含金属氧化物、细纳米级金或铂或它们的组合；其中所述粒子网结于多孔纤维非织造基质中。

具体实施方式

[0025] 在以下详细说明中，描述了各组数值范围（例如，特定部分中的碳原子数的数值范围、特定组分的量的数值范围等等），并且在每组数值范围内，范围的任何下限可与范围的任何上限配对。这种数值范围另外旨在包括包含在该范围内的所有数（例如，1 至 5 包括 1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5 等等）。

[0026] 如本文所用，术语“和 / 或”意指所列要素的一个或全部，或所列要素的任何两个或更多个的组合。

[0027] 术语“优选的”和“优选地”是指本发明的实施例在某些情况下可提供一定的益处。然而，其他实施例在相同或其他情况下也可能是优选的。此外，对一个或多个优选实施例的

表述并不暗示其他实施例是不可用的,且并非意图将其他实施例排除在本发明范围之外。

[0028] 当术语“包括”及其变型出现在说明书和权利要求中时,这些术语不具有限制的意思。

[0029] 如本文所用,“一种(个)”、“所述(该)”、“至少一种(个)”以及“一种或多种(一个或多个)”可互换使用。

[0030] 上述“发明内容”部分不意在描述本发明的每个实施例或每种实施方式。以下具体实施方式更具体地描述了示例性实施例。在整个具体实施方式中,通过实例的列表提供指导,这些实例可以各种组合使用。在每种情况下,所述的列表仅用作代表性的组类,并且不应解释为排它性列表。

[0031] 定义

[0032] 如本专利申请中所用的:

[0033] “聚芳酰胺”是指芳族的聚酰胺;

[0034] “细胞分析物”是指细胞来源的分析物(即,微生物或其组分(例如,细胞或细胞组分,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、蛋白质、核苷酸如三磷酸腺苷(ATP)等,以及它们的组合);在本说明书全部内容中对微生物或微生物菌株的引述意在更广义地适用于任何细胞分析物);

[0035] “浓集剂”是指结合细胞分析物的材料或组合物(优选地,其细胞分析物捕获或结合效率为至少约60%;更优选地,至少约70%;甚至更优选地,至少约80%;最优选地,至少约90%);

[0036] “培养装置”是指可用于在将允许至少一次细胞分裂发生的条件下繁殖微生物的装置(优选地,培养装置包括用于降低或最小化偶发污染可能性的壳体和/或支持微生物生长的营养物质源);

[0037] “检测”是指鉴定细胞分析物(例如,靶微生物的至少一种组分,从而确定这种靶微生物存在);

[0038] “网结”(针对处于纤维非织造基质中的浓集剂的粒子)是指所述粒子夹带于所述纤维非织造基质(并且优选地分布于其内部)中,而非仅仅携带于其表面;

[0039] “原纤化”(针对纤维或纤维材料)是指以形成附接于纤维主干上的原纤或分枝的方式进行处理(例如,通过打浆);

[0040] “纤维非织造基质”是指并非织造或针织织物的幅材或介质,其包含互层的纤维(例如,包含通过熔吹、纺粘法或其他气流成网技术;粗梳法;湿法成网;等等进行互层的纤维的幅材);

[0041] “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。

[0042] “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。

[0043] “微生物”是指具有适于分析或检测的遗传物质的任何细胞或粒子(包括(例如)细菌、酵母、病毒和细菌内生孢子);

[0044] “微生物菌株”是指通过检测方法可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);

[0045] “对位聚芳酰胺”是指聚芳酰胺,其酰胺键与取代的(例如,烷基取代的)或非取代的苯环以对位关系(键合至1位和4位碳)进行键合;

[0046] “样品”是指所采集的（例如，待分析的）物质或材料；

[0047] “样品基质”是指除细胞分析物之外的样品组分；

[0048] “靶细胞分析物”是指需要进行检测的任何细胞分析物；

[0049] “靶微生物”是指需要检测的任何微生物；并且

[0050] “穿透孔”（关于多孔基质）是指包括穿过基质的通道或沟槽（具有单独的入口和出口）的孔。

[0051] 浓集剂

[0052] 适用于进行本发明方法的浓集剂包括含有硅藻土的那些粒状浓集剂。硅藻土可以按天然（未处理）形式使用或可以经表面改性（例如，通过沉积另一种材料或通过其他已知的或今后开发出的表面处理方法）来增强其浓集微生物的能力（优选地，所述硅藻土经表面改性）。

[0053] 使用上述浓集剂进行的浓集或捕获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，可以使用任何已知的检测方法用菌株特异性探针从捕获的微生物群落中检测特定的微生物菌株。因此，所述浓集剂可以用于检测临床样品、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）。

[0054] 当分散于或悬浮于水体系中时，无机材料如硅藻土呈现出该材料和水体系 pH 特征性的表面电荷。跨材料-水界面的电位称为“ ζ 电位”，其可以从电泳迁移率（即，材料粒子在设置于水体系中的带电电极之间移动的速率）计算。优选地，浓集剂在约 7 的 pH 下具有负 ζ 电位。

[0055] 在实施本发明的方法中，浓集剂可以基本上以任何粒状形式（优选地，相对干燥或不含挥发物的形式）使用，所述粒状形式适于与纤维共混以形成用于所述方法中的浓集装置。例如，浓集剂可以按粉末形式使用或者可以施加至诸如珠等等的粒状载体。

[0056] 优选地，浓集剂按粉末形式使用。可用的粉末包括含有微粒子（优选地，具有处于约 1 微米（更优选地，约 2 微米；甚至更优选地，约 3 微米；最优选地，约 4 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 或 20 微米）范围内粒度的微粒子，其中任何下限可以与所述范围的任何上限成对，如上文引述）的那些粉末。

[0057] 适用于实施本发明方法的表面改性的硅藻土包括这些物质，所述物质包含硅藻土，所述硅藻土在其表面的至少一部分上携带表面处理剂，所述表面处理剂包含表面改性剂，所述表面改性剂包含金属氧化物（优选地，二氧化钛或氧化铁）、细纳米级金或铂、或者它们的组合（优选地，包含至少一种金属氧化物的表面改性剂）。这类浓集剂包括在 2010 年 8 月 19 日公布的美国专利申请公开 No. US 2010/0209961 (Kshirsagar 等人；3M 创新有限公司 (3M Innovative Properties Company)) 中描述的那些浓集剂，这些浓集剂及其制备方法的描述以引用的方式并入本文。

[0058] 表面处理剂还优选包括选自以下物质的金属氧化物：氧化铁、氧化锌、氧化铝等等以及它们的组合（更优选地为氧化铁）。尽管已知诸如金之类的贵金属具有抗微生物特性，但令人惊讶的是，用于本发明的方法中的含金浓集剂不仅可有效用于浓集微生物而且还出于检测或分析使它们是活的。

[0059] 可用的表面改性剂包括细纳米级金 ; 细纳米级铂 ; 细纳米级金与至少一种金属氧化物 (优选地, 二氧化钛、氧化铁, 或它们的组合) 的组合 ; 二氧化钛 ; 二氧化钛与至少一种其他 (即, 除二氧化钛之外) 金属氧化物的组合 ; 氧化铁 ; 氧化铁与至少一种其他 (即, 除氧化铁之外) 金属氧化物的组合 ; 等等 ; 以及它们的组合。优选的表面改性剂包括细纳米级金 ; 细纳米级铂 ; 细纳米级金与至少氧化铁或二氧化钛的组合 ; 二氧化钛 ; 氧化铁 ; 二氧化钛与至少氧化铁的组合 ; 以及它们的组合。

[0060] 更优选的表面改性剂包括细纳米级金 ; 细纳米级铂 ; 细纳米级金与氧化铁或二氧化钛的组合 ; 二氧化钛 ; 二氧化钛与氧化铁的组合 ; 氧化铁 ; 以及它们的组合 (甚至更优选地, 细纳米级金 ; 细纳米级金与氧化铁或二氧化钛的组合 ; 二氧化钛与氧化铁的组合 ; 二氧化钛 ; 氧化铁 ; 以及它们的组合)。氧化铁、二氧化钛以及它们的组合为最优选的。

[0061] 表面改性的硅藻土浓集剂中的至少一些与未经处理的硅藻土相比具有带至少稍高正电的 ζ 电位, 并且浓集剂可令人惊讶地比未经处理的硅藻土能显著更有效地浓集诸如细菌之类的微生物 (其表面通常往往带负电)。优选地, 浓集剂在约 7 的 pH 下具有负 ζ 电位 (更优选地, 在约 7 的 pH 下具有在约 -5 毫伏至约 -20 毫伏范围内的 ζ 电位 ; 甚至更优选地, 在约 7 的 pH 下具有在约 -8 毫伏至约 -19 毫伏范围内的 ζ 电位 ; 最优选地, 在约 7 的 pH 下具有在约 -10 毫伏至约 -18 毫伏范围内的 ζ 电位)。

[0062] 包含细纳米级金或铂的表面改性的硅藻土浓集剂可通过这样制备 : 通过物理气相沉积 (任选地, 通过氧化气氛中的物理气相沉积) 将金或铂沉积在硅藻土上。如本文所用, 术语 “细纳米级金或铂” 是指所有维度上的尺寸均小于或等于 5 纳米 (nm) 的金或铂团粒 (例如, 粒子或原子簇)。优选地, 所沉积的金或铂的至少一部分在所有维度 (例如, 粒径或原子簇直径) 上的平均尺寸范围为至多 (小于或等于) 约 10nm (更优选地, 至多约 5nm ; 甚至更优选地, 至多约 3nm)。

[0063] 在最优选的实施例中, 金的至少一部分是超纳米级的 (即, 具有尺寸方面小于 0.5nm 的至少两个维度和尺寸方面小于 1.5nm 的所有维度尺寸)。可以通过透射电子显微镜 (TEM) 分析法测定单个金或铂纳米粒子的尺寸, 如本领域中熟知。

[0064] 硅藻土 (或硅藻土粉) 为由硅藻 (一种海洋栖居微生物) 残余物产生的天然硅土材料。因此, 其可得自天然来源并且也为市售的 (例如, 得自马萨诸塞州沃德希尔的庄信万丰旗下阿法埃莎公司 (Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, Ward Hill, MA))。硅藻土粒子通常包括小的、开放的二氧化硅网络 (形式为对称立方体、圆柱体、球体、板、矩形盒等等)。这些粒子的孔结构通常可以为显著均一的。

[0065] 硅藻土可以原始开采材料或以纯化和任选碾磨的粒子进行使用。优选地, 硅藻土为具有直径尺寸范围为约 1 微米至约 50 微米 (更优选地, 约 3 微米至约 10 微米) 的碾磨粒子形式。

[0066] 可以任选将硅藻土在使用之前进行热处理以去除有机残余物的任何残迹。如果使用热处理, 则优选热处理为 500°C 或更低, 因为较高温度可以产生不利地高含量的晶态二氧化硅。

[0067] 提供于硅藻土上的金或铂的量可以在宽范围上变化。由于金和铂昂贵, 因此期望使用不超过实现所需浓集活性程度而所需要的合理量。另外, 因为纳米级金或铂在使用 PVD 沉积时可具有高度移动性, 如果使用过多的金或铂, 则活性可因金或铂中的至少一些聚结

成较大团粒而损失。

[0068] 由于这些原因,基于硅藻土和金或铂的总重量,硅藻土上的金或铂的负载重量范围优选为约 0.005(更优选地,0.05)至约 10 重量%、更优选为约 0.005(甚至更优选地,0.05)至约 5 重量%、并且甚至更优选为约 0.005(最优选地,0.05)至约 2.5 重量%。

[0069] 可以通过 PVD 技术(例如,通过溅射)沉积金和铂,以在载体表面上形成有浓集活性的细纳米级粒子或原子簇。据信,金属主要以元素形式沉积,但也可存在其他氧化态。

[0070] 除了金和/或铂之外,还可在同一硅藻土载体和/或与含金和/或铂载体混合的其他载体上提供一种或多种其他金属。这类其他金属的例子包括银、钯、铑、钇、钕、铜、铟等等,以及它们的组合。如果使用这些其他金属,则可由与所使用的金或铂源靶相同或不同的靶源将它们共沉积到载体上。或者,可以在沉积金和/或铂之前或之后将这些金属提供于载体上。可以在沉积金和/或铂之前有利地将需要热处理活化的金属施加到载体上并进行热处理。

[0071] 物理气相沉积是指金属从含金属的源或靶向载体介质的物理转移。可以按多种方式进行物理气相沉积。代表性的方法包括溅射沉积(优选的)、蒸镀和阴极电弧沉积。可使用这些或其他 PVD 方法中的任何一种来制备用于实施本发明的方法的浓集剂,但 PVD 技术的特性可赋予所得活性。可通过利用目前使用的或者将来为此目的开发的任何类型的设备来实施 PVD。

[0072] 为了确保载体表面得到足够的处理,优选在充分混合(例如,翻滚、流化、碾磨等)待处理的载体介质的同时进行物理气相沉积。美国专利 No. 4,618,525 (Chamberlain 等人)中描述了用于 PVD 沉积的翻滚粒子的方法,其说明书以引用方式并入本文中。当在细粒子或细粒子聚集体(例如,平均直径小于约 10 微米)上实施 PVD 时,优选在 PVD 过程中的至少一部分期间对载体介质既进行混合又进行粉碎(例如,研磨或碾磨到一定程度)。

[0073] 可以在非常宽范围内的基本上任意所需的温度条件下进行物理气相沉积。然而,如果在相对较低的温度下沉积金属(例如,温度低于约 150℃、优选低于约 50℃、更优选在环境温度(例如,约 20℃至约 27℃)或更低),则沉积的金属可以具有更大的活性(也许是因为缺陷更多和/或移动性及聚结更低)。基于有效性和经济性的考虑,环境条件下的操作通常可以是优选的,因为在沉积过程中不需要进行加热或冷冻。

[0074] 可以在惰性溅射气体气氛中(例如,在氩、氦、氙、氪或者它们中的两者或更多者的混合物(优选地,氩)中)实施物理气相沉积,并且可任选在氧化气氛中实施物理气相沉积。优选地,氧化气氛包含至少一种含氧气体(更优选地,含氧气体选自氧、水、过氧化氢、臭氧,以及它们的组合;甚至更优选地,含氧气体选自氧、水,以及它们的组合;最优选地,氧)。氧化气氛中还包含惰性溅射气体,如氩、氦、氙、氪或它们中的两种或更多种的混合物(优选为氩)。在 PVD 过程期间,真空室中的(所有气体的)总气压可以为约 1 毫托至约 25 毫托(优选为约 5 毫托至约 15 毫托)。按真空室中的所有气体的总重量计,氧化气氛可包含约 0.05 重量%至约 60 重量%的含氧气体(优选地,约 0.1 重量%至约 50 重量%;更优选地,约 0.5 重量%至约 25 重量%)。

[0075] 硅藻土载体介质可以在金属沉积之前任选地进行煅烧,但这可增加其结晶二氧化硅含量。由于金和铂在通过 PVD 沉积时立即具有活性,因此通常不需要在金属沉积之后进行热处理,这与通过一些其他方法的沉积不同。然而如果需要,也可以实施这种热处理或煅

烧以提高活性。

[0076] 通常,热处理可以涉及将载体在约 125℃至约 1000℃范围的温度在任何合适的气氛例如空气、惰性气氛(例如氮、二氧化碳、氩)、还原性气氛(例如氢)等等下加热持续约 1 秒至约 40 小时、优选约 1 分钟至约 6 小时范围内的时间段。采用的具体热条件可取决于包括载体性质在内的各种因素。

[0077] 通常,热处理可以在低于使载体组分发生分解、降解、或者说的不当地受到热损害的温度下实施。根据诸如载体性质、金属量等等之类的因素,如果在过高的温度下对系统进行热处理,则活性可能会在一定的程度上受到损害。

[0078] 包含金属氧化物的表面改性的硅藻土浓集剂可以通过以下方式制备:通过水解可水解金属氧化物前体化合物将金属氧化物沉积于硅藻土上。合适的金属氧化物前体化合物包括可以经水解以形成金属氧化物的金属络合物和金属盐。可用的金属络合物包括含有醇盐配体、过氧化氢作为配体、羧酸盐官能化配体等以及它们的组合的那些金属络合物。可用的金属盐包括金属硫酸盐、硝酸盐、卤化物、碳酸盐、草酸盐、氢氧化物等等,以及它们的组合。

[0079] 使用金属盐或者过氧化氢或羧酸盐官能化配体的金属络合物时,可通过化学或热方法来诱导水解。在化学诱导水解中,可以将金属盐以溶液形式引入硅藻土的分散体中,并且通过加入碱溶液来增加所得组合的 pH 直至金属盐作为金属的氢氧化物络合物沉淀于硅藻土上。合适的碱包括碱金属和碱土金属的氢氧化物和碳酸盐、铵和烷基铵的氢氧化物和碳酸盐等等,以及它们的组合。金属盐溶液和碱溶液的浓度通常可以为约 0.1 至约 2M。

[0080] 优选地,在搅拌(优选地,快速搅拌)硅藻土分散体的情况下实施将金属盐加入至硅藻土中。可以将金属盐溶液和碱溶液单独(以任一顺序)或同时引入到硅藻土分散体中,以便使所得金属氢氧化物络合物与硅藻土的表面进行优选基本上均一的反应。在反应期间可任选加热反应混合物以加快反应速度。通常,所添加的碱量可以等于金属的摩尔数乘以金属盐或金属络合物上的非氧或非羟基抗衡离子数。

[0081] 或者,当使用钛或铁的盐时,可以将金属盐热诱导以水解以便形成金属的氢氧化物络合物并且与硅藻土的表面相互作用。在这种情况下,通常可以将金属盐溶液添加至硅藻土的分散体(优选地,搅拌的分散体)中,所述分散体已经被加热至足够高的温度(例如,大于约 50℃)以便促进金属盐的水解。优选地,温度在约 75℃至 100℃之间,但如果在高压釜设备中进行反应,则可使用更高的温度。

[0082] 当使用金属醇盐络合物时,将金属盐热诱导以水解以便通过金属醇盐在醇溶液中的部分水解来形成金属的氢氧化物络合物。金属醇盐溶液在存在硅藻土的情况下的水解可产生沉积于硅藻土表面上的金属氢氧化物物质。

[0083] 或者,可以通过在存在硅藻土的情况下使金属醇盐在气相中与水反应,使金属醇盐水解并沉积到硅藻土表面上。在这种情况下,可以在(例如)流化床反应器或转筒式反应器中于沉积期间搅动硅藻土。

[0084] 在金属氧化物前体化合物于硅藻土存在的情况下进行上述水解之后,可以通过沉降或通过过滤或通过其他已知的技术来分离所得的经表面处理的硅藻土。可以将分离产物通过用水洗涤来纯化并随后进行干燥(例如,在 50℃至 150℃)。

[0085] 尽管经表面处理的硅藻土通常在干燥之后具有官能,但可以将它任选地通过在空

气中加热至约 250℃至 650℃煅烧来去除挥发性副产物,通常不丧失官能。当将金属醇盐用作金属氧化物前体化合物时,优选进行该煅烧步骤。

[0086] 通常,利用铁的金属氧化物前体化合物时,所得的表面处理剂包含纳米颗粒氧化铁。当氧化铁与硅藻土的重量比为约 0.08 时,X 射线衍射 (XRD) 没有显示明确定义的氧化铁材料的存在。相反,在 3.80、3.68 和 **2.94Å** 下观察到额外的 X 射线反射。该材料的 TEM 检查显示出硅藻土表面相对均匀地涂布有球形纳米粒状氧化铁材料。氧化铁材料的微晶尺寸小于约 20nm,其中大部分晶体的直径小于约 10nm。这些球形微晶在硅藻土表面上的堆积在外观上为致密的,并且硅藻土表面由于这些微晶的存在而似乎为粗糙的。

[0087] 通常,利用钛的金属氧化物前体化合物时,所得的表面处理剂包括纳米粒状二氧化钛。当将二氧化钛沉积至硅藻土上时,所得产物在煅烧至约 350℃之后的 XRD 可以显示出存在锐钛型二氧化钛的小晶体。利用相对较低的钛 / 硅藻土比率时或者在其中使用钛和铁氧化物前体的混合物的情况下,通过 X 射线分析通常观察不到锐钛的迹象。

[0088] 由于二氧化钛熟知为强效光氧化催化剂,因此经二氧化钛改性的硅藻土浓集剂可以用来浓集微生物以便分析,并且随后还可以任选地用作光活化剂以便使用之后杀灭残余微生物和去除有害的有机杂质。因此,经二氧化钛改性的硅藻土可以分离待分析的生物材料并随后经光化学清洁以便再用。另外可以将这些材料用于其中期望进行微生物去除以及抗微生物效果的过滤应用中。

[0089] 适用于实施本发明方法的其他特别优选的浓集剂包括含有经吸附缓冲剂改性的表面改性硅藻土的浓集剂。这类浓集剂包括在 2009 年 12 月 22 日提交的美国临时专利申请 No. 61/289,213 (Kshirsagar ;3M 创新有限公司 (3M Innovative Properties Company)) 中描述的那些浓集剂,这些浓集剂及其制备方法的描述以引用的方式并入本文。

[0090] 浓集装置

[0091] 适用于实施本发明的方法的浓集装置包括含这些浓集装置;所述浓集装置包含 (a) 多孔纤维非织造基质和 (b) 多个上述浓集剂粒子,所述粒子网结于多孔纤维非织造基质中。这类浓集装置可以基本上通过能够提供使浓集剂粒子网结于其中的纤维非织造基质(即,并非织造或针织织物的幅材或介质,其包含互层的纤维)的任何方法而制备。可用的方法包括熔吹、纺粘法和其他气流成网技术;粗梳法;湿法成网;等等;以及它们的组合(优选地为气流成网、湿法成网以及它们的组合;更优选地,湿法成网)。

[0092] 适用于制备浓集装置的多孔纤维非织造基质的纤维包括可制浆纤维。优选的可制浆纤维为对辐射和 / 或对多种溶剂稳定的那些纤维。可用的纤维包括聚合物纤维、无机纤维及其组合(优选地为聚合物纤维及其组合)。优选地,至少一些所使用的纤维表现出一定程度的亲水性。

[0093] 合适的聚合物纤维包括从天然聚合物(动物或植物)和 / 或合成聚合物(包括热塑性聚合物和溶剂可分散的聚合物)制成的那些聚合物纤维。可用的聚合物包括羊毛;丝;纤维素聚合物(例如纤维素、纤维素衍生物等);氟化聚合物(例如,聚(氟乙烯)、聚(偏二氟乙烯)、偏二氟乙烯共聚物(例如,聚(偏二氟乙烯-共-六氟丙烯))、三氟氯乙烯共聚物(例如,聚(乙烯-共-三氟氯乙烯)等);氯化聚合物;聚烯烃(例如,聚(乙烯)、聚(丙烯)、聚(1-丁烯)、乙烯和丙烯的共聚物、 α 烯烃共聚物(诸如乙烯或丙烯与 1-丁烯、1-己烯、1-辛烯和 1-癸烯的共聚物)、聚(乙烯-共-1-丁烯)的聚合物、聚(乙烯-共-1-丁

烯-共-1-己烯)等);聚(异戊二烯);聚(丁二烯);聚酰胺(例如,尼龙6;尼龙6,6、尼龙6,12、聚(亚氨基二酰亚氨基六亚甲基);聚(亚氨基二酰亚氨基十亚甲基);聚己内酰胺;等);聚酰亚胺(例如,聚(均苯四酰亚胺)等);聚醚;聚(醚砜)(例如,聚(二苯醚砜)、聚(二苯砜-共-二苯醚砜)等);聚(砜);聚(醋酸乙烯酯);醋酸乙烯酯的共聚物(例如,聚(乙烯-共醋酸乙烯酯)),其中至少一些醋酸酯基团已经水解以提供多种聚(乙烯醇)的共聚物,包括聚(乙烯-共乙烯醇)等);聚(磷腈);聚(乙烯酯);聚(乙烯醚);聚(乙烯醇);聚芳酰胺(例如,聚对-芳酰胺,诸如聚(对苯二甲酰对苯二胺)以及特拉华州威名顿市的杜邦公司(DuPont Co., Wilmington, DE)以商品名“KEVLAR”销售的纤维,其浆液以基于制成浆液的纤维长度的多种品级商购获得,所述品级诸如“KEVLAR 1F306”和“KEVLAR 1F694”,两者均包含长度至少4mm的聚芳酰胺纤维;等);聚(碳酸酯);等等;以及它们的组合。优选的聚合物纤维包括聚酰胺、聚烯烃、聚砜以及它们的组合(更优选地为聚酰胺、聚烯烃以及它们的组合;最优选地为尼龙、聚乙烯以及它们的组合)。

[0094] 合适的无机纤维包括含有至少一种无机材料的无机纤维,所述无机材料选自玻璃、陶瓷以及它们的组合。可用的无机纤维包括玻璃纤维(例如,E-玻璃、S-玻璃等)、陶瓷纤维(例如,由金属氧化物(诸如氧化铝)、碳化硅、氮化硼、碳化硼等制成的纤维)等,以及它们的组合。可用的陶瓷纤维可以是至少部分晶态的(表现出可识别的X射线粉末衍射花纹或同时包含晶态相和非晶态(玻璃)相)。优选的无机纤维包括玻璃纤维及其组合。

[0095] 用于形成多孔纤维非织造基质的纤维可以具有这样的长度和直径,所述长度和直径可以为具体应用(例如,用于特定类型的样品基质)提供具有充分结构完整性和充分孔隙率的基质。例如,至少约0.5mm、1mm、2mm、3mm、4mm、6mm、8mm、10mm、15mm、20mm、25mm或甚至30mm(以及它们的组合)的长度和至少约10 μ m(微米)、20 μ m、40 μ m、或甚至60 μ m(以及它们的组合)的直径可能是有用的。优选的纤维长度和直径将根据包括纤维性质和应用类型在内的因素而变化。例如,对于多种样品基质,长度约1mm至约3mm的原纤化聚乙烯可以是有用的,并且长度约6mm至约12.5mm的非原纤化尼龙可以是有用的。

[0096] 为辅助夹带浓集剂粒子和/或确保高表面积基质,用于形成多孔纤维非织造基质的纤维优选地包含至少一种原纤化纤维(例如,以被大量较小的连接原纤所围绕的主纤维的形式)。主纤维一般可以具有约0.5mm至约4mm范围的长度以及约1至约20微米范围内的直径。所述原纤通常可以具有亚微米直径。

[0097] 多孔纤维非织造基质可以包含两种、三种、四种或者甚至更多种不同类型的纤维。例如,可以为了强度和完整性而加入尼龙纤维,同时可以为了夹带颗粒而加入原纤化聚乙烯。如果使用原纤化和非原纤化纤维,则通常,原纤化纤维对非原纤化纤维的重量比可以为至少约1:2、1:1、2:1、3:1、5:1或甚至8:1。无论选择什么类型的纤维,所得浓集装置中纤维的量(干形式)(基于所述浓集装置的全部组分的总重量)优选地为至少约10、12、12.5、14、15、18、20或甚至22重量%,最高达约20、25、27、30、35或甚至40重量%。

[0098] 优选地,该多孔纤维非织造基质还包含至少一种聚合物粘合剂。合适的聚合物粘合剂包括相对惰性(与纤维或浓集剂粒子几乎不表现出或不表现出化学相互作用)的天然和合成聚合物材料。可用的聚合物粘合剂包括聚合物树脂(例如,粉末和胶乳形式)、聚合物粘合剂纤维等,以及它们的组合。对于至少一些应用而言,优选的聚合物粘合剂包括聚合物粘合剂纤维及其组合。对于其他应用而言,聚合物树脂及其组合可以为优选的聚合物粘

合剂。

[0099] 合适的聚合物树脂包括但不限于天然橡胶、氯丁橡胶、苯乙烯-丁二烯共聚物、丙烯酸酯树脂、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯等,以及它们的组合。优选的聚合物树脂包括丙烯酸酯树脂及其组合。合适的聚合物粘合剂纤维包括纯粘合剂型纤维(例如,Kodel™ 43UD 纤维,可得自田纳西州金斯波特市的伊士曼化学品公司(Eastman Chemical Products, Kingsport, TN))、双组分纤维(例如,并列型形式,诸如 Chisso ES 聚烯烃热粘合双组分纤维,可得自日本大阪市的智索株式会社(Chisso Corporation, Osaka, Japan);皮/芯型形式,诸如 Melty™ 纤维 4080 型双组分纤维,其具有聚酯芯和聚乙烯外皮,可得自日本大阪市的尤尼吉可株式会社(Unitika Ltd., Osaka, Japan);等等)等等,以及它们的组合。优选的聚合物粘合剂纤维包括双组分纤维及其组合(更优选地,皮/芯型双组分纤维及其组合)。

[0100] 无论使用什么类型的聚合物粘合剂,在所得浓集装置中粘合剂的量(干形式)基于浓集装置的全部组分的总重量,一般可以为约 3 重量%至约 7 重量%(优选地,约 5 重量%)。此类量的聚合物粘合剂通常可以为多孔纤维非织造基质提供充分的完整性以用于多种应用,而并不显著地涂覆所述粒子。令人惊讶地是,相对纤维在浓集装置中的重量,聚合物粘合剂在浓集装置中的量可以低于约 5、4、3、2 或甚至 1 重量%。

[0101] 在该浓集装置的优选实施例中,聚合物粘合剂基本上不粘附于所述粒子。换言之讲,当通过扫描电子显微镜法检验浓集装置时,低于约 5、4、3、2 或甚至 1%的所述粒子总表面积被聚合物粘合剂覆盖。

[0102] 本发明的方法中使用的浓集装置可以通过包括下述方法制备,所述方法包括(a)提供多根上述纤维;(b)提供多个上述浓集剂粒子;以及(c)将多根纤维的至少一部分形成使所述多个粒子的至少一部分网结于其中的多孔纤维非织造基质。如上文提及,所述形成过程可以基本上通过能够提供使所述浓集剂粒子网结于其中的纤维非织造基质(即,并非织造或针织织物的幅材或介质,其包含互层的纤维)的任何方法而进行。可用的方法包括熔吹、纺粘法和其他气流成网技术;粗梳法;湿法成网;等等;以及它们的组合(优选地为气流成网、湿法成网以及它们的组合;更优选地,湿法成网)。

[0103] 优选地,所述形成过程通过使用湿法成网或“湿成网”方法进行,所述方法包括(a)形成分散体,所述分散体包含处于至少一种分散液(优选地是水)中的多根纤维、多个粒子(其可在进行其他加工步骤前与其他组分一起加入并分散,或者如果需要,可在该方法中稍后但通常在除去分散液之前加入并分散)以及至少一种聚合物粘合剂;(b)将该聚合物粘合剂至少部分地沉积在纤维的至少一部分上;以及(c)从分散体中除去分散液。在这种方法中,纤维可以在分散液中分散以形成浆液。如果需要,纤维可以包含添加剂或化学基团或部分来辅助其分散。例如,聚烯烃基的纤维可以包含马来酸酐或琥珀酸酐官能团,或在聚烯烃纤维的熔融加工期间可以加入合适的表面活性剂。

[0104] 可以在除去分散液或脱水步骤之前或之后实施聚合物粘合剂在纤维上的沉积,这取决于聚合物粘合剂的特性。例如,当聚合物乳胶用作聚合物粘合剂时,可以在粒子加入之前或之后并且在脱水之前将该聚合物乳胶沉淀在纤维上。在脱水之后,可以施加热以完成脱水并且对所得的沉积乳胶定型。当聚合物粘合剂纤维用作聚合物粘合剂时,一般可以首先进行脱水,随后加热来完成脱水并且熔化聚合物粘合剂纤维(并且由此而将聚合物粘合剂沉积在纤维上)。

[0105] 一种或多种助剂或添加剂可以用于制备该浓集装置。可用的助剂包括加工助剂（例如，沉淀剂，诸如铝酸钠和硫酸铝，它们可以有助于使聚合物粘合剂沉淀于纤维上），可以增强所得浓集装置的整体性能的材料，等等。当使用时，这类助剂的量可以是大于零最多至约 2 重量%（优选地最多至约 0.5 重量%；其基于浓集装置的组分总重量），不过优选地使它们的量保持尽可能低以便最大化可以包括的浓集剂粒子的量。

[0106] 在一个优选的湿成网方法中，纤维（例如，短纤维）可在分散液（例如，水、水混溶性有机溶剂，诸如醇类，或它们的组合）存在的情况下在容器中共混。未发现共混所得混合物的剪切力的量影响所得浓集装置的最终性质，但共混期间引入的的剪切力的量优选是相对高的。此后，可以向该容器中加入粒子、聚合物粘合剂以及过量的沉淀剂（例如，pH 调节剂，诸如明矾）。

[0107] 当通过使用本领域中已知的抄片法（hand-sheet）实施优选的湿成网方法时，未发现向纤维分散体添加这三种成份的顺序显著地影响浓集装置的最终性能。然而，在加入粒子之后加入聚合物粘合剂可提供表现出粒子对纤维一定程度上更好的粘附力的浓集装置。当通过使用连续法实施优选的湿成网方法时，三种成份优选地以下列顺序加入。（以下描述是基于抄片法，尽管本领域的技术人员可以容易地了解如何调整这一方法以提供连续方法。）

[0108] 将粒子、聚合物粘合剂和沉淀剂加入纤维-液体浆液中后，可以将所得混合物倾入模具，所述模具的底部可以由筛网覆盖。可以使分散液（优选地是水）通过该筛网从混合物（以湿片材的形式）中排出。在足够的液体从片材排出后，一般可以从模具中移出湿片材，并通过压轧、加热或两者的组合来使之干燥。可以在这些干燥过程中使用约 300 至约 600kPa 的压力和约 100 至约 200℃ 的温度（优选地，约 100 至约 150℃）。在优选的湿成网方法中使用聚合物粘合剂纤维作为聚合物粘合剂时，无需沉淀剂，并且所施加的热可用于熔融该聚合物粘合剂纤维。

[0109] 所得干片材可以具有至少约 0.2、0.5、0.8、1、2、4 或甚至 5mm 最多至约 5、8、10、15 或甚至 20mm 的平均厚度。可以除去最多至约 100% 的分散液（优选地，最多至约 90 重量%）。如果需要，可以使用压延来提供额外的压轧或熔合。

[0110] 如上提及，浓集剂粒子可以是微粒子。根据所使用的纤维的性质，微粒子可以通过化学相互作用（例如，化学键）或物理相互作用（例如，吸附或机械夹带）夹带于多孔纤维非织造基质之中。浓集装置的优选实施例包括含有至少一种原纤化纤维的浓集装置，其中所述原纤化纤维可以影响对浓集剂粒子的机械夹带。在浓集装置的一个实施例中，粒子的有效平均直径比所得湿成网片材的未经压延的厚度低至少约 175 倍（优选地，比该片材的未经压延的厚度低至少约 250 倍；更优选地，比该片材的未经压延的厚度低至少约 300 倍）。

[0111] 由于浓集装置的容量和效率可以根据其中所包含的浓集剂粒子的量变动，因此相对高的粒子载量一般可能是想要的。浓集装置中的粒子量（基于浓集装置的全部组分的总重量）优选地可以为至少约 20、30、40、50、60、70 或甚至 80 重量%。粒子夹带于多孔纤维非织造基质中并且优选地分布于其中（更优选地，粒子基本上均匀地遍及整个基质分布）。

[0112] 所得浓集装置可以具有受控的孔隙率（优选地，对于 100mL 的空气具有至少约 0.1 秒（更优选地，至少约 2 至约 4 秒；最优选地，至少约 4 秒）的格利时间（Gurley time））。浓

集装置（以片材材料形式）的基重可以在约 250 至约 5000g/m²（优选地约 400 至约 1500g/m²；更优选地，约 500 至约 1200g/m²）的范围内。

[0113] 如通过扫描电子显微镜法（SEM）测量，片材材料的平均孔隙尺寸一般可在约 0.1 至约 10 微米范围内。处于约 20 至约 80 体积%范围内的空隙体积是可用的（优选地，约 40 至约 60 体积%）。可以通过在纤维混合物中引入具有较大直径或刚度的纤维来修改（增加）片材材料的孔隙率。

[0114] 该片材材料可以是柔性的（例如，能够围绕 0.75 英寸（约 2cm）直径的芯成辊）。这种柔性可以使片材材料起褶或成辊。片材材料可以具有相对低的背压（意味着相对高体积的液体可以相对快速地通过片材材料而不产生相对高的背压）。（如本文所用，“相对低的背压”是指在 3mL/cm² 的流速低于约 3 磅每平方英寸（20.7Kpa）、2.5（17.2）、2（13.8）、1.5（10.3）或甚至 1 磅每平方英寸（6.9kPa）的背压差，其中流速基于片材材料的前表面积计。）

[0115] 可以将未压延的片材材料切割成所需的尺寸并且用来实施本发明的浓集方法。如果需要（例如，当跨片材的显著压降不成问题时），可以在使用前压延片材材料来提高其抗张强度。当欲将片材材料起褶时，可以优选地避免干燥和压延。

[0116] 单层片材材料可以有效实施本发明的浓集方法。如果需要，可以使用多层来提供更大的浓集容量。

[0117] 浓集装置的多孔纤维非织造基质的明显益处在于可使用非常小的浓集剂粒子粒度（10 μm 或更小）和 / 或具有相对宽广的粒度分布的浓集剂粒子。这允许优异的单程通过动力学，原因在于增大的表面积 / 质量比，以及对于多孔粒子而言最小化的内扩散距离。由于相对低的压降，可以使用最低驱动力（例如重力或真空）以推动样品通过浓集装置，甚至当使用小的浓集剂粒子粒度时仍是如此。

[0118] 如果需要，浓集装置还可以包括一种或多种其他组件，例如（如）一种或多种预滤器（例如，以便在样品通过多孔基质之前从样品移除相对较大的食物粒子）、用于多孔基质的支持物或基座（例如，以玻璃料或网格的形式）、用于施加跨装置压差的歧管（例如，以有助于使样品通过多孔基质）和 / 或外部壳体（例如，容纳和 / 或保护多孔基质的一次性料筒）。

[0119] 样品

[0120] 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。医学或兽医样品可以包括（例如）来自生物来源（例如，人或动物）的待测定以进行临床诊断的细胞、组织或流体。环境样品可以为（例如）来自医学或兽医设施、工业设施、土壤、水源、食品制备区（食品接触区和非接触区）、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。

[0121] 以液体形式或者以固体在液体中的分散体或悬浮液形式获得的样品可以直接使用，或可以进行浓集（例如，通过离心法）或稀释（例如，通过添加缓冲（控制 pH 的）溶液）。固体或半固体形式的样品可直接使用或可根据需要通过（例如）用流体介质（例如，缓冲溶液）洗涤或冲洗或者悬浮或分散于流体介质中的方法来提取。可以从表面（例如，通过擦拭或冲洗）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在液

体或气体中的分散体或悬浮液)。

[0122] 可用于实施本发明的方法的样品的例子包括食品(例如,新鲜农产品或即食午餐或“熟食”肉类)、饮料(例如,果汁或碳酸饮料)、水(包括饮用水)和生物流体(例如,全血或其组分,如血浆、富含血小板的血液级分、血小板浓缩物或压积的红细胞;细胞制品(例如分散的组织、骨髓吸出物或椎体骨髓);细胞悬浮液;尿液、唾液和其他体液;骨髓;肺液;脑脊液;伤口渗出物;伤口活检标本;眼液;脊液;等),以及可以使用已知工序(如使用裂解缓冲液)形成的裂解制品如细胞裂解物,等等。优选的样品包括食品、饮料、水、生物流体以及它们的组合(其中食品、饮料、水以及它们的组合为最优选的)。

[0123] 样品体积可以根据具体应用而不同。例如,当本发明的方法用于诊断或研究应用时,样品的体积可以通常为微升范围(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,所述体积可以为成千上万升。

[0124] 本发明的方法可以从浓集状态的样品分离微生物,并且还可以允许从可能抑制待使用检测程序的样品基质组分中分离微生物。在所有这些情况下,本发明的方法可以伴随或替代细胞分析物或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,可以在实施本发明的方法之前或之后从样品培养培养物。这种培养富集可以为总体的或初级的(以便富集大部分或基本上所有微生物的浓集物)或者可以为特异性或选择性的(以便仅富集一种或多种选定微生物的浓集物)。

[0125] 接触

[0126] 可以通过多种已知的或将来开发的提供两种材料间接触的方法中的任何一种来实施本发明的方法。例如,可以将浓集装置添加至样品,或者可以将样品添加至浓集装置。可以将浓集装置浸于样品中、可以将样品倾注到浓集装置上、可以将样品倾注到含有浓集装置的管或孔内,或优选地,可以使样品在浓集装置其上或其内(优选地,其内)通过(或反之亦然)。优选地,以下述方式进行接触,从而样品穿过多孔纤维非织造基质的至少一个孔(优选地,通过至少一个穿透孔)。

[0127] 可在多种容器或夹持器(任选地,加盖的、关闭的或密封的容器;优选地为柱、注射针筒或设计用于容纳该装置而基本无样品泄漏的其他夹持器)中将浓集装置与样品结合(使用任何添加顺序)。用于实施本发明的方法的合适容器将由具体样品决定,并且可在尺寸和性质上大不相同。例如,所述容器可以为小容器(例如 10 微升容器(例如,试管或注射器))或较大容器(例如 100 毫升至 3 升容器(例如,锥形瓶或环状圆柱形容器))。

[0128] 直接接触样品的容器、浓集装置、以及任何其他装置或添加剂可以在使用前进行灭菌(例如,通过受控加热、环氧乙烷气体或辐射来进行),以便减少或防止任何可能导致检测误差的样品污染。浓集装置中足以捕获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,浓集剂和装置的性质和形式以及样品的体积),并且可由本领域的技术人员容易地确定。

[0129] 接触可以进行所需的一段时间(例如,对于数升的样品体积或对于涉及多次通过浓集装置的方法而言,最多至约 60 分钟的接触可能是有用的;优选地,约 15 秒至约 10 分钟或更长;更优选地,约 15 秒至约 5 分钟;最优选地,约 15 秒至约 2 分钟)。任选但可以优选的是,可以通过混合(例如,通过搅动、摇动或通过在整个装置上施加压差以有利于样品通

过其多孔基质)和/或通过孵育(例如,在环境温度下)来增强接触,以便增加微生物与浓集装置接触。

[0130] 优选地,可以通过使样品通过浓集装置(例如,通过泵送)至少一次(优选地,仅一次)来实现接触。可以使用用于建立跨装置(例如,注射器或柱塞)压差的泵(例如,蠕动泵)或其他设备中的基本上任何一种。可用的流速将根据此类因素如样品基质的特性和具体应用而变化。

[0131] 例如,以最多至约100毫升/分钟或更高的样品流速通过所述装置可以为有效的。优选地,对于诸如饮料或水这样的样品而言,可以使用每分钟约10-20毫升的流速。对于预过滤的或以其他方式澄清的食品样品而言,每分钟约6毫升(每15秒1.5毫升)的流速可能是有用的。更长的接触时间和更慢的流速对于更复杂的样品基质(诸如牛肉馅或火鸡肉馅)可能是有用的。

[0132] 优选的接触方法包括将样品如此通过浓集装置(例如,通过泵送)。如果需要,可以在接触其间在浓集装置和样品的组合中包含一种或多种添加剂(例如,裂解试剂、生物发光测定试剂、核酸捕获试剂(例如,磁珠)、微生物生长培养基、缓冲液(例如,用于润湿固体样品)、微生物染色试剂、洗涤缓冲液(例如,用于洗除未结合的材料)、洗脱剂(例如,血清白蛋白)、表面活性剂(例如,可得自联合碳化物与塑料公司(德克萨斯州休斯敦市)(Union Carbide Chemicals and Plastics(Houston, TX))的Triton™ X-100非离子型表面活性剂)、机械磨蚀/洗脱剂(例如,玻璃珠)、吸附缓冲剂(例如,用于制备上述吸附缓冲剂改性的浓集剂的相同缓冲剂或不同缓冲剂)等等)。

[0133] 本发明的方法还可以任选地包括将所得的结合靶细胞分析物的浓集装置与样品分离。可以通过本领域中熟知的多种方法来实施分离(例如,通过泵送、离心或虹吸流体样品,以便将结合靶细胞分析物的浓集装置留在用于实施所述方法的容器或夹持器中)。也可以在样品接触之后从浓集装置隔离或分离(例如,通过使洗脱剂或裂解剂在浓集装置之上或之内穿过)捕获的靶细胞分析物(靶微生物或其一种或多种组分)。

[0134] 本发明的方法可以人工实施(例如,以批次方式)或可以为自动的(例如,以能够进行连续或半连续处理)。

[0135] 检测

[0136] 可以通过使用本发明的方法浓集和检测多种微生物,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(例如,芽孢杆菌属(*Bacillus*)(包括炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*))和梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)(包括肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*)、艰难梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)和产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*))等等,以及它们的组合(优选地是细菌、酵母、病毒、细菌内生孢子、真菌,以及它们的组合;更优选地是细菌、酵母、细菌内生孢子、真菌,以及它们的组合;甚至更优选地是细菌、酵母、真菌,以及它们的组合;更为优选的是革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母、真菌,以及它们的组合;最优选地是革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、酵母,以及它们的组合)。所述方法用于检测病原体,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)以及多种酵母菌和霉菌(以及这些中的任何的组合)。

[0137] 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*)、假丝酵母属 (*Candida*) 等以及它们的组合。样品可以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。可以作为检测靶的具体微生物菌株包括大肠杆菌 (*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*) (以无害李斯特菌 (*Listeria innocua*) 为替代物)、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*)、人类感染性无包膜肠道病毒 (以大肠杆菌噬菌体为替代物)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 等,以及它们的组合 (优选地,金黄色葡萄球菌、单核细胞增多性李斯特菌 (以无害李斯特菌为替代物)、肠道沙门氏菌、酿酒酵母菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、人类感染性无包膜肠道病毒 (以大肠杆菌噬菌体为替代物) 以及它们的组合;更优选地是金黄色葡萄球菌、单核细胞增多性李斯特菌 (以无害李斯特菌为替代物)、铜绿假单胞菌、以及它们的组合)。

[0138] 已由浓集装置捕获或结合 (例如,通过吸附或通过筛分) 的微生物可以通过目前已知或此后开发的基本上任何所需方法来检测。这类方法包括 (例如) 基于培养的方法 (当时间允许时可以为优选的)、显微镜法 (例如,使用可用于观察标记有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。在微生物捕获之后进行的检测过程可以包括进行清洗以除去样品基质组分、对浓集装置的多孔纤维非织造基质进行切片或其他方式的破碎、染色、煮沸或使用洗脱缓冲液或裂解剂以从浓集装置中释放细胞分析物,等等。

[0139] 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粒子的表面上的标志的生物分子 (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。

[0140] 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,和使用酶标仪或侧流装置) 来检测抗体结合。

[0141] 还可以通过基因检测（例如，通过核酸杂交或引物定向的扩增）来进行检测，所述基因检测常常是优选的方法。可以将捕获或结合的微生物裂解，以使它们的遗传物质可用于检测。裂解方法是熟知的，包括例如下述处理：声裂法、渗透休克、高温处理（例如，约 50℃ 至约 100℃）以及和酶一起孵育，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。

[0142] 许多常用的基因检测分析可以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。高度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，从而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。

[0143] 特别有用的基因检测方法是基于引物定向的核酸扩增。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）和连接酶链反应（LCR）），以及等温方法和链置换扩增（SDA）（以及它们的组合；优选地是 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。还可以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）。

[0144] 生物发光检测方法是熟知的，并且包括（例如）三磷酸腺苷（ATP）检测方法，包括美国专利 No. 7, 422, 868 (Fan 等人) 中所描述的那些方法，所述专利的说明内容以引用方式并入本文。也可以使用其他基于发光的检测方法。

[0145] 由于本发明方法是非菌株特异性的，它提供了容许在同一样品中靶向多种微生物菌株以检测的通用捕获系统。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、大肠杆菌以及沙门氏菌一并检测是合乎需要的。在单个捕获步骤之后可以接着进行例如 PCR 或 RT-PCR 测定，所述测定使用特异性引物来扩增来自这些微生物菌株中每个菌株的不同核酸序列。因此，可避免需要对每个菌株分开进行样品处理和制备程序。

[0146] 诊断试剂盒

[0147] 用于实施本发明浓集方法的诊断试剂盒包括用于实施本发明浓集方法的 (a) 至少一种上述浓集装置；以及 (b) 至少一种测试容器或测试试剂（优选地为无菌测试容器或测试试剂）。优选地，诊断试剂盒还包括用于实施所述方法的说明书。

[0148] 可用的测试容器或储存器包括上文所述的那些并且可以用于（例如）接触、用于孵育、用于采集洗脱液或用于其他所需的方法步骤。可用的测试试剂包括微生物培养基或生长培养基、裂解剂、洗脱剂、缓冲液、发光检测分析组分（例如，发光计、裂解试剂、荧光素酶、酶底物、反应缓冲液等等）、基因检测分析组分等等以及它们的组合。优选的裂解剂是在缓冲液中提供的分解酶或化学品，并且优选的基因检测分析组分包括针对靶微生物特异的一种或多种引物。所述试剂盒还可以任选包括无菌镊子等等。

[0149] 过滤介质

[0150] 在其他实施例中，本发明提供了一种过滤介质，其用于从样品中除去微生物污染物或病原体。根据本发明适用的过滤介质包括这些过滤介质，所述介质包含 (a) 多孔纤维

非织造基质和 (b) 多个上述浓集剂粒子,所述粒子网结于所述多孔纤维非织造基质中。这类过滤介质可以通过与上文针对浓集剂和浓集装置的描述的基本相同的方法制备,并且基本上包括相同的材料。

[0151] 实例

[0152] 通过以下实例进一步说明了本发明的目的和优点,但是这些实例中叙述的特定材料及其用量、以及其他条件和细节不应理解为对本发明进行不当限制。除非另外指明,否则下述实例中的所有份数、百分数、比率等均按重量计。除非另外指明,否则溶剂和其他试剂均来自威斯康辛州密尔沃基的西格玛奥德里奇化学公司 (Sigma-Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI)。所有微生物培养物均购自弗吉尼亚州马纳萨斯市的美国典型培养物保藏中心 (ATCC ;Manassas,VA)。除非另外指明,实验性结果是 2 组测试的平均值。通过将选择的微生物划线于胰酶大豆琼脂平板上并随后在 37℃ 下过夜孵育来制备过夜培养物。全部微生物计数根据用于菌落形成单位的标准微生物学计数方法进行,并且计数是近似值。

[0153] 材料

[0154] ■ 粒状浓集剂 1 (此后称为“粒子 1”) – 通过沉积氧化铁而进行表面改性的硅藻土 (基本上如下文所述制备)

[0155] ■ 粒状浓集剂 2 (此后称为“粒子 2”) – 通过沉积二氧化钛而进行表面改性的硅藻土 (基本上如下文所述制备)

[0156] ■ BHI 液体培养基 –Difco™ 牛心浸液肉汤通用培养基,来自马里兰州斯帕克斯市的贝克顿 – 迪金森公司 (Becton Dickinson, Sparks, MD),其根据制造商的说明以 3.7 重量百分比 (重量%) 的浓度制备

[0157] ■ 缓冲溶液 – 巴特菲尔德缓冲液 (Butterfield' s Buffer), pH 7.2±0.2 ;磷酸二氢钾缓冲溶液 ;VWR 目录编号 83008-093 ;宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)

[0158] ■ 胰酶大豆琼脂平板 –Difco™ 胰酶大豆琼脂获自马里兰州斯帕克斯市的贝克顿 – 迪金森公司 (Becton Dickinson, Sparks, MD),其使用马里兰州斯帕克斯市的贝克顿 – 迪金森公司 (Becton Dickinson, Sparks, MD) 的 Difco™ 胰酶大豆肉汤根据制造商的说明以 3 重量百分比 (重量%) 的浓度制备

[0159] ■ MOX 平板 – 基于牛津培养琼脂 (改良用于李斯特氏菌) 的生长培养基,获自加利福尼亚州圣玛丽亚市的哈迪诊断公司 (Hardy Diagnostics, Santa Maria, CA)

[0160] ■ AC 平板 –3M™ Petrifilm™ 有氧计数板 (包括干燥的可复水培养基的平膜培养装置);明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 (3M Company (St. Paul, MN))

[0161] ■ PIA 平板 –Teknova 公司制造的假单胞菌属分离琼脂 ;购自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)

[0162] ■ C- 琼脂平板 – 贝克顿 – 迪金森公司 (Becton Dickinson) 制造的 BBL™ CHROMagar™ 金黄色葡萄球菌平板 (琼脂基的生长培养基);购自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)

[0163] ■ Elisa 测定 –3M™ TECRA™ 李斯特氏菌属可视免疫测定试剂盒 ;明尼苏达州圣保罗的 3M 公司 (3M Company (St. Paul, MN))

[0164] ■真空过滤装置-将具有侧面真空接口的 1000mL 烧瓶配有烧结瓶塞,所述烧结瓶塞作为多孔纤维非织造基质或滤器的支持物发挥作用。支持物面积的大小被设计为容纳多孔纤维非织造基质的 48mm 直径圆盘片。将筒顶部和底部周边具有凸缘环边、末端开放的收集筒(100mL 容量)夹到该烧瓶上,将瓶塞在它们间固定。柔性软管将该烧瓶与配备真空接口的龙头连接以提供真空。在每次使用之前,通过在 121℃ 高压消毒 15 分钟来对该装置灭菌,并且在使用期间,在过滤每份样品后以 70 重量百分比(重量%)乙醇和蒸馏水淋洗该装置。

[0165] ■滤器夹持器-13mm 直径的 Swinnex™ 滤器夹持器;马萨诸塞州贝德福德市的密理博公司(Millipore Corp., Bedford, MA)

[0166] ■匀质器和匀质器袋-Stomacher™ 400 型循环器实验室掺合器和 Stomacher™ 聚乙烯过滤袋,英国诺福克郡的赛沃德公司(Seward Corp., Norfolk, UK);购自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司(VWR, West Chester, PA)

[0167] 术语

[0168] ■多孔纤维非织造基质-在下文实例和比较例中还可以称为干毡、垫、基质或滤器

[0169] ■液体浓集-使包含微生物的 100mL 或 250mL 的液体样品通过多孔纤维非织造基质或滤器,并且所述微生物由该滤器收集或浓集。随后使用 1 或 2mL 添加的缓冲液或水来分析所述滤器(例如,平板涂布或其他方式分析)。由此,所述微生物从 100mL 或 250mL 的液体浓集至 1 或 2mL 液体。

[0170] ■CFU-菌落形成单位

[0171] ■滤液计数-滤液中微生物菌落的计数

[0172] ■过滤前计数-过滤前样品中的微生物菌落计数(即,未经浓集的样品的微生物计数)

[0173] ■MCE-多孔纤维非织造基质的微生物捕获效率(或结合效率)是对基质捕获微生物的程度的评估。以百分比(%)计的 MCE 由下式确定:

[0174]
$$MCE = 100 - [(\text{滤液计数} / \text{过滤前计数}) \times 100]$$

[0175] ■0.5 麦氏比浊标准-包含分散微生物的浊度标准物,使用来自北卡罗莱纳州德罕市的生物梅里埃公司(bioMerieux, Inc., Durham, NC)的 DensiCHEK™ 密度计制备

[0176] 表面改性的硅藻土粒状浓集剂的制备

[0177] 硅藻土粉(硅藻土)以白色粉末(325 目;所有粒子的尺寸小于 44 微米)购自马萨诸塞州沃德希尔的庄信万丰旗下阿法埃莎公司(Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company, Ward Hill, MA)。这种材料通过 X 射线衍射(XRD)显示包含非晶态二氧化硅以及晶态 α -方石英和石英。

[0178] 通过以下述方式对硅藻土表面处理来制备包含两种不同表面改性剂(即,二氧化钛和氧化铁)的粒状浓集剂:

[0179] 二氧化钛的沉积

[0180] 通过在搅拌下将 20.0 克的 $\text{TiO}(\text{SO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Noah Technologies Corporation(得克萨斯州圣安东尼奥(San Antonio, TX))溶于 80.0 克的去离子水中来制备 20 重量%的硫酸氧钛(IV)脱水溶液。将 50.0 克这种溶液与 175mL 去离子水混合,以形成二氧化钛前体化

合物溶液。通过在快速搅拌下将 50.0 克的硅藻土分散于大烧杯中的 500mL 去离子水中来制备硅藻土的分散体。将硅藻土分散体加热至约 80℃之后,将二氧化钛前体化合物溶液经约 1 小时的时间段逐滴添加,同时快速搅拌。添加之后,烧杯用表面皿盖住并将其内容物加热至沸腾持续 20 分钟。将氢氧化铵溶液添加到烧杯中,直到内容物的 pH 值为约 9。通过沉降 / 滗析来洗涤所得产物,直到洗涤水的 pH 值为中性。通过过滤分离产物并将其在 100℃ 下干燥过夜。

[0181] 将干燥产物的一部分置于瓷坩埚内并通过下述方式煅烧,即以约 3℃ / 分钟的加热速率从室温加热至 350℃并随后在 350℃保持 1 小时。

[0182] 氧化铁的沉积

[0183] 基本上使用上述的二氧化钛沉积方法将氧化铁沉积于硅藻土之上,不同之处在于使用溶解于 175mL 去离子水的 20.0g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (新泽西州菲利普斯堡市的杰帝贝柯公司 (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)) 溶液来取代硫酸氧钛溶液。将所得氧化铁改性的硅藻土的一部分按相似方法煅烧至 350℃以用于进一步的检测。

[0184] 实例 1-2 和比较例 C1 :浓集装置 1、2 和 C1 的制备

[0185] 通过首先将 30g 的 1 旦尼尔原纤化聚乙烯纤维 (FYBREL™620 纤维 ;田纳西州杰克森市的迷你纤维公司 (Minifibers, Inc., Johnson City, TN)) 与 4L 冷自来水在 4L 掺合器 (威力商用强力掺合器 37BL84 型 (Waring Commercial Heavy Duty Blender, Model 37BL84)) 中以中速进行 30 秒钟共混来制备纤维预混物。所述纤维在这时均匀地分散于水中而无结节或结块,并且随后将 6g 0.25 英寸长的 6 旦尼尔短切尼龙纤维 (田纳西州杰克森市的迷你纤维公司 (Minifibers, Inc., Johnson City, TN)) 和 6g 长玻璃纤维 (微股线 106-475 玻璃纤维 ;科罗拉多州丹佛市的舒勒公司 (Schuller, Inc., Denver, CO)) 加入该纤维分散体中并且以低速共混 30 秒。

[0186] 通过如下方式来制备基质组合物 :将 1000mL 所得纤维预混物加入 4L 不锈钢烧杯并且用叶轮混合器 (飞世尔科技公司 (Fisher Scientific) 的 Stedfast 搅拌器 SL2400 型 ;可得自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)) 以速度设定 4 混合 5 分钟。随后将 50mL 烧杯中处于约 25mL 自来水内的 1.0g 胶乳粘合剂分散体 (50 重量%的固体醋酸乙烯酯乳液 ;Airflex 600BP, 宾夕法尼亚州阿伦敦市的空气化工产品公司 (Air Products Polymers, Allentown, PA)) 添加至混合的纤维预混物,随后添加另外 25mL 水,所述水来自对该烧杯的淋洗。将所得组合混合 2 分钟后,将路易斯安那州戈尔德市的中南化学品公司 (Midsouth Chemical Co., Inc., Riggold, LA)) 的 2.0g 絮凝剂 (MP 9307 絮凝剂 (据信为二甲胺和环氧氯丙烷共聚物的水溶液) 预分散于约 25mL 水中并且随后添加至所述组合,接着添加来自该烧杯的另外 25mL 淋洗用水。胶乳粘合剂从溶液中溶出到纤维上,并且该基质组合物的液相从浑浊变为基本澄清。对于实例 1,将 10.0g 粒子 1 加入所得组合物并且涡旋混合 1 分钟。对于实例 2,将 10.0g 粒子 2 加入所得组合物并且涡旋混合 1 分钟。比较例 C1 以相同方式制备,无粒子加入。

[0187] 使用 TAPPI™ 制毡装置 (纽约州沃特敦市威廉姆斯设备制造公司 (Williams Apparatus, Watertown, NY)) 来制备毡。该装置具有度量约 20 厘米 (8 英寸) 见方和 20 厘米 (8 英寸) 深度的封闭盒,该封闭盒的底部附近具有细目筛网以及该筛网下的排水阀门。将该盒充以自来水直至超过该筛网约 1cm 的高度。将基质组合物倾入该盒,并且立刻打开

该阀门,从而产生了将水排出该盒的真空。所得湿成网毡约 3mm 厚。

[0188] 将该湿成网毡转移至吸墨纸片上(20 厘米×20 厘米(8 英寸×8 英寸)的 96 磅白纸,明尼苏达州圣保罗市的船锚造纸公司(Anchor Paper, St. Paul, MN))。将该毡夹于 2-3 层吸墨纸之间,并在设定为 413kPa(60psi;根据计算约 82.7kPa(12psi)的压力施加于该毡上)的气动压机中的 2 个强化筛网之间挤压 1-2 分钟,直至观察不到还有水被挤出。随后将挤压的毡转移至新鲜的吸墨纸片上并且置于设定为 125℃的烘箱中约 30 分钟来除去残余的水并且固化胶乳粘合剂以形成多孔纤维非织造基质。

[0189] 实例 3-4 和比较例 C2:对浓集装置 1、2 和 C1 的测试

[0190] 将来自过夜划线培养物的无害李斯特菌(ATCC 33090)菌落接种于 5mL BHI 液体培养基中并且在 30℃下孵育 18-20 小时。将包含 10^8 CFU/mL 的所得培养物在缓冲溶液中稀释并接种至 100mL 的 BHI 液体培养基以提供包含 10^5 CFU/mL(总计 2×10^7 CFU)的细菌悬液。从实例 1、2 和 C1 的多孔纤维非织造基质的片材上切下圆盘片(直径 48mm)并且在 121℃下灭菌 15 分钟。将来自实例 1 的盘片插入上文描述的真空过滤装置,并将 100mL 细菌悬液倾倒穿过该装置中的盘片至全部样品通过该盘片。使用来自实例 2 的盘片重复该过程。使用总计包含 1×10^7 CFU 的细菌悬液测试来自对比例 C1 的盘片。

[0191] 将两份 100 微升体积的每种所得滤液和过滤前对照进行 1 : 10、1 : 100 和 1 : 1000 稀释,涂布于 MOX 琼脂平板上,并且在 37℃孵育 18-20 小时。人工对菌落计数,并且计算微生物捕获效率(MCE)。结果列于表 1。

[0192] 表 1。

[0193]

实例号	C2	3	4
浓集装置	C1	1	2
微生物捕获效率(%)	小于 1	90	92

[0194] 对于所有样品均观察到了 100 倍的浓集(样品从 100mL 浓集至 1mL)。

[0195] 在过滤后,使用灭菌镊子从该装置中取出盘片并且保存于无菌培养皿中直至受测。使用灭菌剪刀切割这些盘片并将它们置于包含 2mL 缓冲溶液的无菌 50mL 聚丙烯离心管内以便煮沸。随后根据制造商的说明使用 Elisa 测定处理样品。通过分光光度计(SpectraMax™ M5,来自加利福尼亚州森尼韦尔市的分子仪器公司(Molecular Devices, Sunnyvale, CA))在 414 纳米的波长读取所得吸光度(以吸光单位计)(A_{414})。结果在表 2 中示出。

[0196] 表 2。

[0197]

[0198]

实例号	C2	3	4
浓集设备或对照	Elisa 测定的阴性对照	1	2
吸光度(A ₄₁₄)	0.005	0.265	0.095
相对于对照的吸光度量级	1×	53×	19×

[0199] 表 2 中的数据显示,实例 1 和 2 给出了更高的吸光度(相对于 Elisa 测定的阴性对照),即使实例 1 和 2 的盘片是在 2mL 缓冲溶液而非根据 Elisa 测定说明中的 1mL 缓冲溶液中煮沸。

[0200] 实例 5-6 和比较例 C3 :对浓集装置 1、2 以及商用尼龙滤器的测试

[0201] 火鸡肉馅(标签称 12%脂肪)购自当地零售商店。将 11g 所述火鸡肉馅置于无菌的匀质器袋中并且在匀质器中与 99mL 缓冲溶液以 200 转每分钟(rpm)的速度共混 1 分钟。将共混的样品倾入所述真空过滤装置中,其包含实例 1 的基质的 48mm 盘片(用于实例 5)。使用来自水龙头的真空过滤所述样品,直至通过该盘片的流动停止,表明盘片堵塞。使用来自实例 2 的盘片(用于实例 6)和购自明尼苏达州圣保罗市的 3M 净化公司(3M Purification, Inc., St. Paul, MN)的 0.45 微米尼龙滤器(用于比较例 C3)重复该工序。下表 3 中示出样品总体积和在堵塞之前通过该盘片的样品体积。

[0202] 表 3。

[0203]

实例号	浓集装置	通过装置的样品体积 (mL)	样品总体积 (mL)
5	1	7	100
6	2	8	100
C3	商用尼龙滤器	2.5	100

[0204] 表 3 中的数据显示,当使用负压进行处理时,与比较例 C3 的标准微生物滤器相比,实例 5 和 6 的盘片具有更佳的抗堵塞性。

[0205] 实例 7-8 和比较例 C4-C6 :对浓集装置 1 和 2 的测试以及与单独使用粒状浓集剂(粒子 1 和 2)的比较

[0206] 使用单核细胞增多性李斯特菌(ATCC 51414)的过夜培养物以便在 3mL 的 BHI 液体培养基中制备 0.5 麦氏比浊标准物。将包含 10⁸CFU/mL 的所得细菌原液在 BHI 液体培养基中连续稀释以获得包含 10³CFU/mL 的细菌悬液。

[0207] 对实例 1 和 2 以及比较例 C1 的基质进行模具冲孔而得测得直径为 14mm 的圆盘片。将来自实例 1 的基质的盘片(用于实例 7)插入直径 13mm 的滤器夹持器。将 1.5mL 体积的细菌悬液(通过 3 立方厘米(cc)的注射器递送至该滤器夹持器)在 20 秒内通过所述盘片。使用来自实例 2(用于实例 8)和比较例 C1(用于比较例 C6)的基质的盘片重复该工

序。

[0208] 将所得滤液在 100 微升体积按如下方式涂布在 MOX 平板上。将所述盘片使用表面灭菌的镊子从该滤器夹持器取下并且也用 100 微升缓冲溶液涂布于 MOX 平板上。将所述平板在 37℃ 下孵育 18-20 小时。对所得微生物菌落进行人工计数。

[0209] 对于比较例 C4, 将 20mg 量的粒子 1 与 1.1mL 细菌悬液在无菌 5mL 聚丙烯管中 (BD Falcon™, 新泽西州富兰克林湖的贝克顿-迪金森公司 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 得自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)) 混合。使用 20mg 粒子 2 (用于比较例 C5) 以相同的方式制备第二样品。将所述管封盖并且置于摇床 (Thermolyne Vari Mix™ 摇床; 爱荷华州的巴恩斯特德国际公司 (Barnstead International, Iowa)) 以每分钟 14 转进行 20 秒振摇。随后将该管转移至试管架上保持 1 分钟, 之后大多数粒子已经沉降管底部。将包含悬浮粒子的 100 微升体积所得上清液涂布于 MOX 平板上并且基本上根据上文针对滤液和盘片的描述来进行处理。还按照与对照 (即, 过滤前) 样品相同的方式将 100 微升体积的细菌悬液进行平板涂布并且孵育。对照的菌落计数为 2500。根据来自滤液和来自上清液的菌落计数计算微生物捕获效率 (MCE)。结果显示于下表 4 中。

[0210] 表 4。

[0211]

实例号	浓集装置或浓集剂	微生物捕获效率 (%)
C4	粒子 1	59
7	浓集装置 1	98
C5	粒子 2	73
8	浓集装置 2	99
C6	浓集装置 C1	80

[0212] 实例 9-10 和比较例 C7: 对浓集装置 1 和 2 以及商用聚碳酸酯滤膜的测试

[0213] 冷冻牛肉馅 (标签称 15% 脂肪) 购自当地零售商店, 并且将 11g 化冻的牛肉馅与 99mL 缓冲溶液在无菌的匀质器袋中共混并且以 230rpm 在匀质器中处理 30 秒。在 10cc 注射器中将 10mL 体积的共混牛肉递送至滤器夹持器中来自实例 1 的基质的 14mm 直径盘片 (用于实例 9)。还将来自实例 2 的基质盘片和商用滤膜 (Whatman 14mm 直径 0.22 微米聚碳酸酯滤膜, 购自宾夕法尼亚州西切斯特的 VWR 公司 (VWR, West Chester, PA)) 分别作为实例 10 和比较例 C7 进行测试。记录经共混的牛肉在堵塞与流动中断之前通过盘片或膜的体积以及在堵塞与流动中断之前通过的时长, 并在表 5 中显示。

[0214] 表 5。

[0215]

实例号	9	10	C7
浓集装置	1	2	商用聚碳酸酯滤膜

[0216]	实例号	9	10	C7
	通过装置的样品体积 (mL)	4.5	8	0.5
	通过时间 (秒)	90	120	60

[0217] 实例 11-14 :对浓集装置 1 和 2 的测试

[0218] 使用铜绿假单胞菌 (ATCC 9027) 的过夜培养物在 3mL 过滤的蒸馏去离子水 (18 兆欧姆水, 获自 Milli-Q™ 梯度去离子系统 ; 马萨诸塞州贝德福德市的密理博公司 (Millipore Corporation, Bedford, MA)) 中制备 0.5 麦氏比浊标准物。将包含 10^8 CFU/mL 的所得细菌原液在相同的水中连续稀释以获得包含 10^2 CFU/mL 的铜绿假单胞菌悬液。使用相同的工序制备金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538) 的细菌悬液。

[0219] 基本上根据上文针对实例 7-8 的描述, 使 1mL 体积的铜绿假单胞菌悬液经滤器夹持器中来自实例 1 的 13mm 盘片 (用于实例 11) 过滤。根据制造商的说明将所得的滤液涂布于 AC 平板上。将盘片使用灭菌的镊子从该滤器夹持器取出并且使用 100 微升的缓冲溶液将其涂布于 PIA 平板上。使用来自实例 2 的盘片 (用于实例 13) 重复所述过滤工序。

[0220] 随后使用金黄色葡萄球菌悬液和来自实例 1 和 2 的盘片 (分别用于实例 12 和 14) 重复所述过滤工序。将所得滤液涂布于 AC 平板上并且将使用过的盘片以 100 微升缓冲溶液涂布于 C 琼脂平板上。

[0221] 将全部平板在 37°C 孵育 18-20 小时, 并对所得菌落进行人工计数并计算出微生物捕获效率。全部平板均显示出微生物的生长 (铜绿假单胞菌, 特征在于 PIA 平板上的黄绿色颜料 ; 金黄色葡萄球菌, 特征在于 C 琼脂平板上的橙紫色)。未浓集 (未过滤) 的对照样品分别具有 140 CFU/mL 的铜绿假单胞菌和 170 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌。结果示于表 6 中。

[0222] 表 6。

[0223]

实例号	浓集装置	微生物	微生物捕获效率 (%)
11	1	铜绿假单胞菌	78
12	1	金黄色葡萄球菌	96
13	2	铜绿假单胞菌	99
14	2	金黄色葡萄球菌	99

[0224] 实例 15-16—水过滤

[0225] 大肠杆菌 (ATCC 51813) 的划线培养物在血琼脂平板 (含有 5% 绵羊血液的胰酶大豆琼脂 ; 加利福尼亚州圣玛丽亚市的哈迪诊断公司 (Hardy Diagnostics ; Santa Maria, CA)) 上制备并且在 37°C 下孵育过夜。该培养物用于使用 DensiCHEK™ 密度计 (北卡罗莱纳州德罕市的生物梅里埃公司 (bioMerieux, Inc., Durham, NC)) 在 3ml 巴特菲尔德缓冲液中制备 0.5 麦氏比浊标准物。将包含 10^8 cfu/mL 的所得细菌原液在巴特菲尔德缓冲液中连续

稀释以获得具有约 10^6 cfu/mL 的接种物。

[0226] 通过向 100mL 去离子水 (MilliQ 梯度系统, 马萨诸塞州的密理博公司 (Millipore, Ma)) 接种 1 : 100 稀释度的 10^6 细菌 /ml 接种物来制备测试样品, 得到包含 10^4 CFU/ml (在水中总计 10^6 CFU) 的水测试样品。

[0227] 将接种的水样品泵压穿过过滤装置, 所述过滤装置夹持表 7 中所示的纤维非织造基质的 47mm 直径冲切盘片。该装置具有聚碳酸酯筒体, 据测为直径约 60mm、高约 115mm, 并且具有支承筛网以将该过滤盘片夹持于该筒体中。该筒体的顶端以螺纹盖闭紧, 所述螺纹盖具有通过 1/8 英寸厚壁的 PVC 管 (目录编号 60985-522 ; 伊利诺伊州巴达维亚市的 VWR 公司 ; (VWR ; Batavia, IL)) 附接至蠕动泵 (型号 7553-70 ; 科尔帕默公司 (Cole Parmer)) 的进口。该泵用来输送水样品至过滤装置。圆筒的底端使用具有出口的螺纹部分封闭。将 O 型环设置在螺纹部件之间以防泄漏。该装置在上游侧排气以换气。

[0228] 实例 15 的结果是基于单次测试, 而实例 16 的结果是两次重复的平均值。对于每组测试, 以 70ml/ 分钟的流速将 100mL 接种的水样品泵入该过滤装置。将滤液收集于无菌的 100ml 聚丙烯烧杯中。在每组过滤测试之后, 拆卸该装置并且使用无菌镊子取出盘片。在每个测试之间, 该过滤装置用 500mL 过滤的灭菌去离子水淋洗。

[0229] 将一百微升体积的每种滤液和过滤前悬浮液在巴特菲尔德缓冲液中进行 1 : 10 和 1 : 100 稀释并且涂布到 AC 平板上。将平板在 37°C 下孵育 18-20 小时。根据制造商的说明从平板确定菌落计数。对数下降值 (LRV) 是水滤器的除菌能力的指示。根据从涂布平板的滤液和过滤前样品中获得的计数, 通过使用下式计算所述值 :

[0230] $LRV = (\text{过滤前样品中的对数 CFU/mL}) - (\text{滤液样品中的对数 CFU/mL})$

[0231] 过滤前悬浮液包含平均 8500 CFU/ml (3.9 对数 CFU/ml)。

[0232] 结果在表 7 中示出。

[0233] 表 7。

[0234]

实例	盘片	LRV
15	实例 1	3.9
16	实例 2	3.9

[0235] 将本文所引用的专利、专利文献、专利公开中包含的参考描述以引用方式全文并入本文, 就如同将它们每个单独引入本文一样。在不脱离本发明的范围和精神下, 对本发明的多种不可预见的修改和更改将对本领域技术人员来说是显而易见的。应该理解, 本发明不旨在不当地受限于本文所述的示例性实施例和实例, 并且上述实例和实施例仅以举例的方式提出, 同时本发明的范围仅旨在受限于如下文所述的权利要求。