



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02818041.0

[43] 公开日 2004 年 12 月 15 日

[11] 公开号 CN 1555418A

[22] 申请日 2002.9.13 [21] 申请号 02818041.0

[30] 优先权

[32] 2001. 9. 13 [33] FR [31] 01/11873

[86] 国际申请 PCT/FR2002/003132 2002. 9. 13

[87] 国际公布 WO2003/025207 法 2003. 3. 27

[85] 进入国家阶段日期 2004. 3. 15

[71] 申请人 海默系统公司

地址 法国马赛

[72] 发明人 让-皮埃尔·埃尔梅

伊莎贝尔·贝松-福尔

塞巴斯蒂安·里博 扬·戈德弗兰

安妮·莫诺·德·安格莱斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

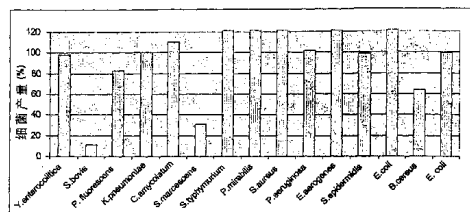
代理人 林晓红

权利要求书 6 页 说明书 25 页 附图 12 页

[54] 发明名称 从血液制品和/或其衍生物中浓缩和检测致病微生物的装置和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种浓缩血液制品或其衍生物中可能存在的致病微生物以及检测浓缩的所述微生物的方法。所述方法包括如下步骤：(a) 将所述血液制品的样品进行血细胞聚集处理，(b) 将步骤(a)中形成的聚集物通过将处理的样品经过第一个过滤器而消除，所述过滤器允许污染微生物通过但不允许细胞聚集物通过，(c) 将步骤(b)中获得的滤液中的残余细胞选择性裂解，(d) 通过将步骤(c)的裂解物通过第二个过滤器回收污染微生物，从而检测可能被捕获的污染微生物。



1. 浓缩可能存在于包含血细胞的血液制品中的污染微生物的方法，其特征在于包括以下步骤：

- a) 将所述血液制品的样品进行血细胞聚集处理，
- b) 将步骤 a)中形成的聚集物通过将处理的样品经过第一个过滤器而除去，所述第一个过滤器允许污染微生物通过而不允许细胞聚集物通过，
- c) 将步骤 b)中获得的滤液中的残余细胞选择性裂解，
- d) 通过将步骤 c)的裂解物经过允许细胞碎片通过的第二个过滤器而回收污染微生物。

2. 检测可能存在于包含血细胞的血液制品中污染微生物的方法，其特征在于根据权利要求 1 的方法的步骤 a)至 d)在过滤器上浓缩所述微生物，然后 e) 分析第二个过滤器以检测可能保留的污染微生物。

3. 权利要求 2 的检测方法，其特征在于在聚集步骤 a)或裂解步骤 c)期间加入所述污染微生物的标记试剂，或者在分析步骤 e)期间直接将所述污染微生物的标记试剂加至第二个过滤器上。

4. 权利要求 2 或 3 的方法，其特征在于包括在步骤 a)，c)或 e)中至少一个步骤中加入污染微生物的透化剂。

5. 权利要求 4 的方法，其特征在于所述透化剂选自聚乙烯亚胺，氯己定二醋酸盐，氯己定二葡萄糖酸盐，乙二胺四乙酸(EDTA) 单独或者与乳链菌肽组合，去污剂或者这些物质的混合物。

6. 权利要求 5 的方法，其特征在于所述去污剂选自 N-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷，SDS，Tween，triton，Brij 或者这些物质的混合物。

7. 权利要求 3—6 任一项的方法，其特征在于致病微生物的标记试剂是选自酯酶底物如 ChemChrome V6，标记的抗体或者核酸标记的一种标记溶液。

8. 权利要求 3—7 任一项的方法，其特征在于所述标记试剂包含荧光标记或者与荧光染料或能降解底物从而产生荧光的酶偶联的试剂。

9. 权利要求 8 的方法，其特征在于所述荧光通过激发激光检测。

10. 权利要求 1—9 任一项的方法，其特征在于血液制品的血细胞是血小板或红细胞或其混合物。

11. 权利要求 1—10 任一项的方法，其特征在于所述血液制品包含血小板，且聚集处理步骤 a) 包括将所述样品与一种聚集组合物接触，所述聚集组合物包含选自以下一组的至少一种聚集剂：

- 血小板抗原的特异性抗体，
- 血小板激活的强激动剂，选自：凝血酶，TRAP (凝血酶受体激活肽)，胰蛋白酶，胶原蛋白，血栓烷 A₂，PAF (血小板激活因子)，离子载体 A23187，免疫复合物和补体因子，
- 血小板激活的弱激动剂，选自 ADP，肾上腺素 (adrenalin)，花生四烯酸，Von Willebrand 因子，5-羟色胺或肾上腺素 (epinephrine)。

12. 权利要求 11 的方法，其特征在于聚集组合物中 CD9 的浓度在 0.5 $\mu\text{g/ml}$ —50 $\mu\text{g/ml}$ 之间，优选在 5 $\mu\text{g/ml}$ —40 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

13. 权利要求 11 的方法，其特征在于聚集组合物中强激动剂的浓度如下：

- 针对凝血酶型激动剂，在 0.5 IU/ml—100 IU/ml 之间，优选在 1 IU/ml—20 IU/ml 之间；

- 针对 TRAP 型激动剂, 在 $5\ \mu\text{M}$ — $200\ \mu\text{M}$ 之间, 优选在 $10\ \mu\text{M}$ — $100\ \mu\text{M}$ 之间;
- 针对胰蛋白酶型激动剂, 在 $1\ \text{nM}$ — $500\ \text{nM}$ 之间, 优选在 $10\ \text{nM}$ — $300\ \text{nM}$ 之间;
- 针对胶原蛋白型激动剂, 在 $0.05\ \mu\text{g/ml}$ — $50\ \mu\text{g/ml}$ 之间, 优选在 $1\ \mu\text{g/ml}$ — $20\ \mu\text{g/ml}$ 之间;
- 针对血栓烷 A₂ 型激动剂, 在 $0.01\ \mu\text{g/ml}$ — $5\ \mu\text{g/ml}$ 之间, 优选在 0.1 — $1\ \mu\text{g/ml}$ 之间;
- 针对 PAF 型激动剂, 在 $0.005\ \text{mg/ml}$ — $1\ \text{mg/ml}$ 之间, 优选在 0.05 — $0.5\ \text{mg/ml}$ 之间;
- 针对离子载体 A23187 型激动剂, 在 $0.1\ \mu\text{M}$ — $100\ \mu\text{M}$ 之间, 优选在 $1\ \mu\text{M}$ — $20\ \mu\text{M}$ 之间。

14. 权利要求 11 的方法, 其特征在于聚集组合物中弱激动剂的浓度如下:

- 针对 ADP, 肾上腺素 (adrenalin) 或肾上腺素 (epinephrine) 型激动剂, 在 $0.5\ \mu\text{M}$ — $100\ \mu\text{M}$ 之间, 优选在 $1\ \mu\text{M}$ — $20\ \mu\text{M}$ 之间;
- 针对花生四烯酸型激动剂, 在 $0.001\ \text{mM}$ — $10\ \text{mM}$ 之间, 优选在 $0.01\ \text{mM}$ — $5\ \text{mM}$ 之间;
- 针对 Von Willebrand 因子型激动剂, 在 $0.001\ \text{mg/ml}$ — $1\ \text{mg/ml}$ 之间, 优选在 $0.01\ \text{mg/ml}$ — $0.5\ \text{mg/ml}$ 之间; 或者
- 针对 5-羟色胺型激动剂, 在 $0.05\ \mu\text{M}$ — $100\ \mu\text{M}$ 之间, 优选在 $0.01\ \mu\text{M}$ — $50\ \mu\text{M}$ 之间。

15. 权利要求 11 的方法, 其特征在于所述抗体选自抗 CD, 抗 CD32, 抗 PTA1, 抗 D42, 抗 GpIIb/IIIa 或抗 GpIV 抗体。

16. 权利要求 1—15 任一项的方法, 其特征在于所述血液制品包括红细胞, 且聚集处理步骤 a) 包括将所述样品与一种凝集组合物接触, 所述凝集组合物包含选自以下的至少一种凝集剂: 凝集素, 聚

乙烯亚胺, 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP), 凝胶, 葡聚糖或聚乙二醇 (PEG)。

17. 权利要求 16 的方法, 其特征在于所述凝集素呈现红细胞凝集活性。

18. 权利要求 16 或 17 的方法, 其特征在于所述凝集素选自 *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba*, *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana* 或 *Triticum vulgare* 的凝集素。

19. 权利要求 18 的方法, 其特征在于凝集组合物中 *Phaseolus vulgaris* 凝集素的浓度在 10 $\mu\text{g/ml}$ —800 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

20. 权利要求 16 的方法, 其特征在于凝集组合物中聚乙烯亚胺的浓度在 0.1% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间, 优选在 20% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间。

21. 权利要求 16 的方法, 其特征在于聚乙烯吡咯烷酮(PVP)选自 PVP-40 或 PVP-360, 优选使用浓度在 0.1% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间, 最优选在 4% (重量/体积) 至 20% (重量/体积) 之间。

22. 权利要求 16 的方法, 其特征在于凝集组合物中凝胶的优选使用浓度在 0.5% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间, 最优选在 4% (重量/体积) 至 20% (重量/体积) 之间。

23. 权利要求 16 的方法, 其特征在于凝集组合物中葡聚糖选自 Dextran 70, Dextran 100 或 Dextran 500, 优选使用浓度在 0.1% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间, 最优选在 4% (重量/体积) 至 20% (重量/体积) 之间。

24. 权利要求 16 的方法, 其特征在于聚乙二醇选自 PEG8, PEG17 或 PEG35, 优选使用浓度在 0.05% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间, 最优选在 20% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间。

25. 前述任一权利要求的方法，其特征在于裂解细胞步骤 c) 用一种裂解溶液进行，所述裂解溶液包含选自以下的一或多种去污剂：皂苷，SDS, Tween 20, Triton X100, Brij 96, Polidocanol, N-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷或碳酸钠。

26. 前述任一权利要求的方法，其特征在于所述污染微生物是需氧菌或厌氧菌，霉菌，酵母或者活和/或死细菌孢子。

27. 前述任一权利要求的方法，其特征在于第一个过滤器的孔径在 $2\ \mu\text{m} - 20\ \mu\text{m}$ 之间。

28. 前述任一权利要求的方法，特征在第二个过滤器的孔径在 $0.2\ \mu\text{m} - 2\ \mu\text{m}$ 之间。

29. 前述任一权利要求的方法，其特征在于所述污染微生物是需氧菌或厌氧菌，霉菌，酵母或者活和/或死细菌孢子，第一个过滤器的孔径在 $2\ \mu\text{m} - 20\ \mu\text{m}$ 之间，第二个过滤器的孔径在 $0.2\ \mu\text{m} - 2\ \mu\text{m}$ 之间。

30. 权利要求 2-29 任一项的方法，其特征在于使用一种密闭的装置进行检测污染微生物的步骤 e)。

31. 能用于权利要求 1-30 任一项的方法中的浓缩可能存在于包含血细胞的血液制品中污染微生物的装置，其特征在于其包括：

- 第一个不透水的无菌罐(1)，其含有至少一种血细胞聚集剂，还可含有至少一种标记致病微生物的试剂；
- 第二个不透水的无菌罐 (2)，其含有至少一种血细胞裂解剂，还可含有至少一种标记致病微生物的试剂；
- 第一个过滤器(3)，其置于第一个和第二个罐之间，能保留在所述第一个罐中形成的聚集物；
- 第二个过滤器 (4)，其置于第二个罐的下游，能保留可能的污染致病微生物；

– 不透水的无菌连接装置(5)，置于第一个罐和第一个过滤器之间，第一个过滤器和第二个罐之间，及第二个罐和第二个过滤器之间。

32.权利要求 31 的装置，其特征在于其包括一个不透水的无菌连接装置(6)，以将含有血液制品的袋子与第一个无菌罐连接。

33.权利要求 32 的装置，其特征在于将含有血液制品的袋子与第一个无菌罐连接的所述不透水的无菌连接装置装备一个止回阀(7)。

34. 权利要求 31 或 33 的装置，其特征在于其包括直接从血液制品的贮存袋中取样一定体积的血液制品至所述第一个罐中的装置。

35.权利要求 32 或 34 的装置，其特征在于第一个无菌罐安装了一个样品抽吸系统(8)。

36. 权利要求 35 的装置，其特征在于所述抽吸系统是一个活塞。

37. 权利要求 31–36 任一项的装置，其特征在于第二个过滤器密闭在一个由两部分组成的膜支持物中，所述两部分可被分开以取出所述过滤器。

38.权利要求 31–37 任一项的装置，其特征在于是密闭及无菌的。

从血液制品和/或其衍生物中浓缩和检测 致病微生物的装置和方法

本发明涉及一种浓缩血液制品或其衍生物中可能存在的致病微生物以及检测浓缩的所述微生物以监测所述血液制品的致病性的方法。

术语“血液制品”是指全血以及从所述全血的级分中产生的任何制品，任选地包含细胞成分，以下列出了血液制品的实例：浓缩的红细胞或血小板，但也包括血浆或血清制品。

检测由不同的致病微生物如细菌，病毒，霉菌，酵母及其它微生物对血液制品及其衍生物的污染，是公共卫生机构以及输血行业面临的主要问题。

目前存在一些检测试验，但不能常规使用。

检测一群或一亚群血液细胞中这些致病微生物的大多数试验存在的主要问题包括这样的事实，即设想用于选择性提取所述致病微生物的大多数处理同时导致这些微生物被消除。

这种消除几乎系统地导致所测试的血液制品中所述微生物的存在不可测得，从而增加了对健康的危及。

因此本申请人设计可一种新的快速灵敏的方法，以检测血液制品或其衍生物中致病微生物的污染情况。

本发明的方法值得注意之处是其直接对从采自研究对象的血液制品中获得的样品进行检测，不用预先处理或稀释。

本申请人揭示的检测致病微生物的方法基本由以下步骤组成：选择性浓缩所述致病微生物，然后一旦其被浓缩则通过本领域熟知的方法检测。

选择性浓缩致病微生物通过相继或同时消除血液制品样品中存在的不同血细胞群而进行。

本发明浓缩致病微生物的方法包括第一步浓缩致病微生物，即通过选择性聚集血细胞群而减少这些细胞，随后进行过滤步骤以收集滤液中未聚集的浓缩的致病微生物，而血细胞聚集物保留在过滤器上。

本发明中所用术语“聚集 (aggregation)”是指导致细胞聚集物形成的任何作用。术语“细胞聚集物”是指包含两个以上细胞的任何细胞群体，其大小大于一个独立的细胞。在本发明中，聚集物可以通过聚集获得，如血小板激活后聚集，聚集物也可通过凝集 (agglutination) 获得，如获得的红细胞当存在特定分子时会凝集，或者聚集物可以通过改变细胞膜的静电电荷或其它粘附机制诱导的细胞群聚而获得，或者聚集物可以通过引起两个以上的细胞群聚的细胞群聚而获得。

根据本发明的优选实施方案，不同血细胞群的聚集可以通过诱导血小板聚集的化合物或者通过诱导红细胞特异性凝集的化合物而进行。

例如已知在存在一些化合物的情况下，血小板具有彼此聚集的能力。这些聚集物可易于通过过滤与致病微生物分离。

红细胞也存在一些凝集性质。

本发明浓缩致病微生物的方法任选包括第二个步骤降低血液中主要细胞群即血小板和红细胞的浓度，所述步骤包括裂解在第一步聚集步骤中分离的未聚集的细胞。

降低血细胞群浓度的该第二个步骤使得血小板的浓度降低 4 log (从 10^9 降至 10^5 个细胞/ml)，红细胞浓度降低 5 log (从 10^{10} 降至 10^5)。

更精确而言，本发明的目的是提供一种浓缩可能存在于包含血细胞的血液制品中的污染微生物的方法，所述方法特征在于其包括以下步骤：

- a) 将所述血液制品的样品进行血细胞聚集处理，
- b) 将步骤 a) 中形成的聚集物通过将处理的样品经过第一个过滤器而消除，所述过滤器允许污染微生物通过但不允许细胞聚集物通过，
- c) 将步骤 b) 中获得的滤液中的残余细胞选择性裂解，
- d) 通过将步骤 c) 的裂解物通过允许细胞碎片通过的第二个过滤器回收污染微生物。

根据本发明的优选实施方案，本发明的方法包括一个补充步骤 e)，即对第二个过滤器进行分析以检测可能保留在其上的污染微生物。

本发明的检测方法优选包括在聚集步骤 a) 期间加入污染微生物的标记试剂，或者在裂解步骤 c) 期间加入污染微生物的标记试剂，或者在分析步骤 e) 期间直接在第二个过滤器上加入污染微生物的标记试剂。

作为通过本发明方法可检测的致病微生物的标记试剂的实例，我们可以列举出一种标记溶液，其含有一种酯酶底物如 ChemChrome V6。

因此，作为通过本发明方法可检测的致病微生物的标记试剂，可以使用一种包含标记抗体或核酸标记的一种标记溶液。所述标记优选是荧光标记或者与荧光染料或能使底物降解而产生荧光的酶偶联，所述荧光可以通过激发激光而检测。

本发明的检测方法还包括加入污染微生物的透化剂，透化剂可以加入所述方法的至少一个步骤中，在聚集步骤 a) 期间加入，或者在裂解步骤 c) 期间加入，或者在分析步骤 e) 期间直接加入在第二个过滤器上，或者在几个这些步骤期间均加入。

作为污染微生物的透化剂的实例，我们可以列举出聚乙烯亚胺，氯己定二醋酸盐 (chlorhexidine diacetate)，氯己定二葡萄糖酸盐，乙二胺四乙酸 (EDTA) 单独或者与乳链菌肽组合，以及去污剂如 N-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷, SDS, Tween, triton, Brij 等。

根据本发明方法的一个特定实施方案，血液制品的血细胞是血小板或红细胞或者是这两种细胞的混合物。

根据本发明方法的另一个特定实施方案，血液制品的血细胞是血小板，步骤 a)的聚集处理包括将样品与一种聚集组合物接触，所述组合物包含选自以下一组的至少一种聚集剂：

- 一种血小板抗原的特异性抗体，
- 选自以下的一种血小板激活的强激动剂：凝血酶，TRAP (凝血酶受体激活肽)，胰蛋白酶，胶原蛋白，血栓烷 A₂ 或者离子载体 A23187，
- 选自以下的一种血小板聚集的弱激动剂：ADP，肾上腺素 (adrenalin)，花生四烯酸，Von Willebrand 因子，5-羟色胺或肾上腺素 (epinephrine)。

聚集组合物中血小板抗原的特异性 CD9 抗体的浓度有利地在 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 之间，优选在 5 $\mu\text{g/ml}$ 至 40 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

聚集组合物中强激动剂的浓度有利地：

- 对于凝血酶型激动剂，在 0.5 IU/ml 至 100 IU/ml 之间，优选在 1 IU/ml 至 20 IU/ml 之间；
- 对于 TRAP 型激动剂，在 5 μM 至 200 μM 之间，优选在 10 至 100 μM 之间；
- 对于胰蛋白酶型激动剂，在 1 nM 至 500 nM 之间，优选在 10 nM 至 300 nM 之间；
- 对于胶原蛋白型激动剂，在 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 至 50 $\mu\text{g/ml}$ 之间，优选在 1 $\mu\text{g/ml}$ 至 20 $\mu\text{g/ml}$ 之间；
- 对于血栓烷 A₂ 型激动剂，在 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 至 5 $\mu\text{g/ml}$ 之间，优选在 0.1 至 1 $\mu\text{g/ml}$ 之间；
- 对于 PAF 型激动剂，在 0.005 mg/ml 至 1 mg/ml 之间，优选在 0.05 至 0.5 mg/ml 之间；
- 对于离子载体 A23187 型激动剂，在 0.1 μM 至 100 μM 之间，优选在 1 μM 至 20 μM 之间。

聚集组合物中弱激动剂的浓度有利地:

-对于 ADP、肾上腺素 (adrenalin) 或肾上腺素 (epinephrine) 型激动剂, 在 0.5 μM 至 100 μM 之间, 优选在 1 μM 至 20 μM 之间;

-对于花生四烯酸型激动剂, 在 0.001 mM 至 10 mM 之间, 优选在 0.01 mM 至 5 mM 之间;

-对于 Von Willebrand 因子型激动剂, 在 0.001 mg/ml 至 1 mg/ml 之间, 优选在 0.01 mg/ml 至 0.5 mg/ml 之间;

-对于 5-羟色胺型激动剂, 在 0.05 μM 至 100 μM 之间, 优选在 0.01 μM 至 50 μM 之间。

在一个完全优选的方式中, 血小板抗原的特异性抗体选自抗-CD, CD32, 抗-PTA1, CD42, 抗-GpIIb/IIIa 或抗-GpIV 抗体。

根据本发明方法的另一个特定的实施方案, 血液制品包含红细胞, 聚集处理步骤 a) 包括将样品与一种凝集组合物接触, 所述凝集组合物包含选自凝集素, 聚乙烯亚胺, 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 凝胶, 葡聚糖或聚乙二醇(PEG)的至少一种凝集剂。

所述凝集素优选呈红细胞凝集素活性。

最优选地, 所述凝集素选自 *Phaseolus vulgaris*, *Vicia sativa*, *Vicia faba* 或 *Erythrina corallodendron*, *Lens culinaris*, *Phytolacca Americana* 或 *Triticum vulgare* 的凝集素。

凝集组合物中 *Phaseolus vulgaris* 型凝集素的浓度优选在 10 $\mu\text{g/ml}$ 至 200 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

凝集组合物中聚乙烯亚胺的浓度优选在 0.1% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间。

所述葡聚糖最优选选自 Dextran 70, Dextran 100, Dextran 500 等。

凝集组合物中葡聚糖的浓度优选在 0.1% (重量/体积) 至 40% (重量/体积) 之间。

所述 PEG 化合物最优选选自 PEG35, PEG 等。

凝集组合合物中 PEG 的浓度优选在 0.05% (重量/体积)至 40% (重量/体积)之间。

凝集组合合物中凝胶的浓度优选在 0.5% (重量/体积)至 40% (重量/体积)之间。

所述 PVP 化合物最优选选自 PVP-40, PVP-360 等。

凝集组合合物中 PVP 的浓度优选在 0.05% (重量/体积) 至 40% (重量/体积)之间。

细胞裂解步骤 c)优选使用裂解溶液进行, 所述裂解溶液包含一或多种选自以下一组去污剂: 皂苷, SDS, Tween 20, Triton X100, Brij 96, Polidocanol, N-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷或碳酸钠。

所述裂解溶液优选由皂苷, Triton X100 和 Tween 20 的混合物组成, 最优选所述裂解溶液包含浓度 (以重量/体积 %表示)在 0.005% 至 0.5%之间的皂苷, 浓度(以重量/体积 %表示)在 0.001%至 0.5%之间的 Triton X100, 及浓度在 0.01%至 1%之间的 Tween 20 及浓度在 0.1% and 0.5%之间的 N-辛基β-D-吡喃葡萄糖苷。

细菌透化处理优选包含一或多种选自以下一组的试剂的一种溶液进行: 氯己定(二葡萄糖酸盐, 二醋酸盐), 聚乙烯亚胺, N-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷, 乳链菌肽单独或与 EDTA 组合。

所述透化剂优选使用浓度(重量/体积)在 0.0001% (重量/体积)至 0.1% (重量/体积)的氯己定, 浓度在 5 μg/ml 至 120 μg/ml 之间的聚乙烯亚胺, 浓度在 0.1% (重量/体积)至 0.5% (重量/体积)之间的 N-辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷, 及浓度在 0.1 μg/mL 至 0.5 μg/mL 之间的乳链菌肽单独或者与浓度在 1 mM 至 10 mM 之间的 EDTA 组合。

本发明的方法可用于浓缩并检测血液制品的众多污染微生物, 其中可以列举出的有需氧菌和厌氧菌, 霉菌, 酵母, 活和/或死细菌孢子。

本发明方法中采用的第一个过滤器的孔径优选在 2 μm 至 20 μm 之间。

本发明方法中采用的第二个过滤器的孔径优选在 0.2 μm 至 2 μm 之间。

本发明方法的检测污染微生物的步骤 e) 优选在一个密闭的装置中进行。

最优选地，能根据本发明方法浓缩的污染微生物选自需氧菌和厌氧菌，霉菌，酵母及活和/或死细菌孢子，第一个过滤器的孔径在 2 μm 至 20 μm 之间，第二个过滤器的孔径在 0.2 μm 至 2 μm 之间。

本发明还涉及能用于本发明检测致病微生物的方法中的一种装置，以浓缩及标记可能存在于包含血细胞的血液制品中的污染微生物，所述装置包括：

- 第一个不透水的无菌罐(1)，其含有至少一种血细胞聚集剂，还可含有至少一种用于标记致病微生物的试剂；

- 第二个不透水的无菌罐(2)，其含有至少一种血细胞裂解剂，还可含有至少一种用于标记致病微生物的试剂；

- 第一个过滤器(3)，置于第一个和第二个罐之间并能保留在所述第一个罐中形成的聚集物；

- 第二个过滤器(4)，置于第二个罐的下游并能保留可能的污染的致病微生物；

- 不透水的无菌连接装置(5)，置于第一个罐(1)和第一个过滤器(3)之间，第一个过滤器(3)和第二个罐(2)之间，及第二个罐(2)和第二个过滤器(4)之间。

根据优选的实施方案，本发明的装置包括不透水的无菌连接装置(6)以将含有血液制品的袋子与第一个无菌罐(1)连接。

将含有血液制品的袋子与第一个无菌罐连接的不透水的无菌连接装置(6)优选装备一个止回阀(7)。

根据另一个优选的实施方案，本发明的装置包括将一定体积的血液制品直接从所述制品的贮存袋中取样入所述第一个罐(1)中的装置。

本发明的第一个不透水的无菌罐(1)优选装备一个样品抽吸系统(8)，所述抽吸系统优选是一个活塞(piston)。

根据另一个优选的实施方案，本发明装置的第二个过滤器(4)封装于一个由两部分组成的膜支持物中，所述两部分可以分开以取出所述过滤器。

本发明的装置优选是密闭的及无菌的。

本发明的其它优势和特征通过以下实施例及附图将更显而易见，其中：

– 图 1 示出在将血小板浓缩物与不同浓度的凝血酶接触之后的血小板计数；

– 图 2 示出两个血小板样品在存在 ADP 的情况下聚集后的血小板计数；

– 图 3 示出在存在 CD9 抗体(克隆 SN4)的情况下 4 个血小板样品的血小板计数；

– 图 4 示出在 3ml 血小板浓缩物中使用增加剂量的抗体 CD9(克隆 6B1)的血小板计数结果；

– 图 5 示出在存在增加浓度的抗体 CD9(克隆 SN4)的情况下获得的剂量应答曲线；

– 图 6 示出对 3 个红细胞浓缩物样品使用浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 *Phaseolus vulgaris* 凝集素后的红细胞凝集情况；

– 图 7 示出裂解溶液对从纯培养物中回收的不同致病微生物的作用；

– 图 8 示出裂解溶液对两个血小板的血小板数的作用；

– 图 9 示出裂解对红细胞浓缩物的两个不同样品的红细胞计数的作用；

– 图 10 示出使用聚乙烯亚胺 (PEI)作为透化剂以提高标记通透性，在血小板样品内大肠杆菌的计数；

– 图 11 示出裂解溶液中 N-辛基- β -D-吡喃葡萄糖苷的浓度对纯细菌培养物的作用；

– 图 12 示出本发明的用于浓缩致病微生物的装置的一个特定实施方案，包括：

- 第一个不透水的无菌罐(1)；
- 第二个不透水的无菌罐 (2)；
- 置于第一个罐 (1)和第二个罐(2)之间的第一个无菌过滤器(3)；
- 置于第二个罐(2)下游的第二个无菌过滤器 (4)；
- 不透水的无菌连接装置(5)，它们置于第一个罐 (1)和第一个过滤器(3)之间，第一个过滤器(3)和第二个罐(2)之间，及第二个罐(2)和第二个过滤器 (4)之间；
- 用于将含有血液制品的袋子与第一个罐 (1)连接的不透水的无菌连接装置(6)；
- 置于将含有血液制品的袋子与第一个罐(1)连接的连接装置(6)中的止回阀(7)；
- 样品抽吸系统 (8)。

实验结果

I. 通过聚集步骤浓缩致病微生物

I.1 血小板聚集

实施例 1. 用强激动剂凝血酶聚集

凝血酶是一种血小板聚集的强激动剂。

在由本申请人在完成本发明所进行的研究中，制备如下一些凝血酶溶液 (参考 T8885 Sigma)：当以 10 IU/试验的比率使用时，浓度为 100 IU/ml，当以 1 IU/试验的比率使用时，是稀释溶液形式(100 μ l 凝血酶母液加入 900 μ l 的 PBS 缓冲液)。

通过凝血酶介导的血小板聚集包括以下步骤：

- 向试管中 160 μ l 的血小板浓缩物中加入 20 μ l 的 PBS 缓冲液和 20 μ l 凝血酶；
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；
- 向所述试管中加入 800 μ l 的 PBS 缓冲液；
- 将试管内容物在孔径为 11 μ m 的过滤器上过滤；

- 从滤液中产生 1/20 至 1/10 系列稀释液；
- 将 100ml 的每一滤液稀释液在 CB04 膜上过滤；
- 进行酯酶标记；
- 计数可能保留在所述膜上的血小板。

下表 1 示出获得的结果并示出使用两种不同浓度的凝血酶获得的血小板聚集物数目。图 1 以图形形式例证了这些结果。

表 1

	对照	1 IU 凝血酶	10 IU 凝血酶
PC 6	1584 1535	374 490	
PC 6	2622 2737	1358 1399	44 30

实施例 2: 在存在致病微生物的情况下使用凝血酶的血小板聚集情况

进行本实验研究以评估存在凝血酶的情况下致病微生物的聚集情况，包括以下步骤：

- 将大肠杆菌的低温珠（cryobead）导入含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18-24 小时；
- 向 160 μ l 血小板浓缩物中加入 20 μ l 所述大肠杆菌悬浮液和 20 μ l 凝血酶；
- 将该试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；
- 加入 800 μ l 的 PBS 缓冲液；
- 通过 11 μ m 孔径的过滤器过滤；
- 进行系列稀释：1/20 及 1/10 及 1/10；
- 将 100 μ l 样品在 CB04 膜上过滤；
- 用酯酶进行标记；
- 进行检测。

下表 2 示出存在大肠杆菌的情况下，使用凝血酶聚集血小板浓缩物的情况。

表 2

致病微生物	血小板制品	凝血酶	计数结果
大肠杆菌	-	-	1921
		-	1999
大肠杆菌	PC 6	-	657 763
大肠杆菌	PC 6	1 IU	140 167
大肠杆菌	PC 6	10 IU	109
			122

在加入凝血酶后几乎立即呈现凝聚。

实施例 3：在存在弱激动剂 ADP 的情况下的血小板聚集

ADP (Sigma)以在蒸馏水中 200 μ M 浓度使用。

进行实验性研究以评估在存在 ADP 的情况下血小板的聚集，所述研究包括以下步骤：

- 将 400 μ l 血小板浓缩物导入一个试管中，向其中加入 50 μ l 的 PBS 缓冲液和 50 μ l 的 ADP；
- 试管在周围温度手工搅拌 5 分钟；
- 加入 500 μ l 的 PBS 缓冲液；
- 以 1/20 和 1/10 和 1/10 进行连续稀释；
- 将 100 μ l 的样品在 CB04 膜上过滤；
- 用酯酶进行标记；
- 进行检测。

图 1 示出的结果示出在存在 ADP 的情况下，血小板的浓度降低大约 50%—90%。

实施例 4：在致病微生物存在下使用 ADP 聚集血小板

在存在 ADP 的情况下聚集血小板包括以下步骤：

- 将 *Staphylococcus epidermidis* 的低温珠导入具有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18—24 小时；

- 向 400 μl 血小板浓缩物中加入 50 μl 的所述 *Staph. epidermidis* 悬浮液及 50 μl 的 ADP;
- 将试管在周围温度手工搅拌 5 分钟;
- 加入 500 μl 的 PBS 缓冲液;
- 在孔径 5 μm 的过滤器上进行过滤;
- 以 1/20 和 1/10 和 1/10 进行连续稀释;
- 将 100 μl 样品在 CB04 膜上过滤;
- 用酯酶进行标记;
- 进行检测。

将致病微生物以高浓度接种以增加可能的诱捕作用。将 ADP 以浓度为 10 μM 加入血小板中及细菌中。

表 3

致病微生物	血小板制品	聚集剂	结果	浓度 细菌/ml
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PC 6	无	590 605	6.0 E + 07
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PC 6	10 μM ADP	492 441	4.7 E + 07

上表 3 示出的结果表明在聚集步骤后回收 74% 的细菌。

实施例 5a: 在存在 CD9 抗体的情况下聚集血小板

已知 CD9 抗体诱导血小板激活及随后的聚集。使用两个 CD9 克隆进行所述实验, 所述克隆即克隆 SN4 (Ancel, ref. 156-020, 浓度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和克隆 6B1 (Hemosystem)。

使用这些 CD9 抗体进行的选择性聚集方法包括以下步骤:

- 向 400 μl 血小板浓缩物中加入 50 μl 的 PBS 缓冲液和 50 μl 的 CD9 抗体;
- 将试管在周围温度手工搅拌 5 分钟;
- 加入 500 μl 的 PBS 缓冲液;
- 在孔径 5 μm 的过滤器上进行过滤;

- 以 1/20 和 1/10 和及 1/10 进行连续稀释；
- 将 100 μl 样品在 CB04 膜上过滤；
- 用酯酶进行标记；
- 进行检测。

在存在血小板的情况下使用的 CD9 抗体(克隆 SN4)终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

图 2 示出了在存在 CD9 抗体（克隆 SN4）的情况下获得的血小板聚集。

建立剂量应答曲线以评估血小板凝集所需的抗体 CD9 最佳浓度。

方法：

- 向置于一些试管中的 400 μl 血小板浓缩物中加入不同稀释度的抗体，使抗体 CD9 的终浓度为 0—20 $\mu\text{l}/\text{ml}$ ；
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；
- 加入 500 μl 的 PBS 缓冲液；
- 在孔径 5 μm 的过滤器上进行过滤；
- 以 1/10 进行 4 次连续稀释；
- 将 100 μl 样品在 CB04 膜上过滤；
- 用酯酶进行标记；
- 进行检测。

图 3 和 5 分别示出在存在增加剂量的抗体 CD9（克隆 SN4）的情况下聚集的血小板的计数结果及从中获得的剂量应答曲线。

使用分析仪对残余的血小板进行计数。

聚集是剂量依赖性的。为增加聚集作用，将 CD9 的浓度尽可能地提高。然而，为检测细菌加以折中，确定通过使用浓度为大约 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗体 CD9 可以使血小板浓度降低 1—2 log。

实施例 5b:

建立剂量应答曲线以评估血小板聚集所需的抗体 CD9（克隆 6B1）的最佳浓度。

方法:

- 向置于一些试管中的 3 mL 血小板浓缩物中加入不同稀释度的抗体 CD9，使之终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ — 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 15 分钟;
- 在孔径 5 μm 的过滤器上进行过滤;
- 如上述进行血小板计数。

图 4 示出在存在增加剂量的抗体 CD9（克隆 6B1）的情况下聚集的血小板的计数结果。

实施例 6: 在细菌存在下使用 CD9 抗体的血小板聚集

方法:

- 将 *Staphylococcus epidermidis* 的低温珠导入含有胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18—24 小时;
- 向置于试管中的 400 μl 血小板浓缩物加入 50 μl 的所述 *Staphylococcus epidermidis* 悬浮液及 50 μl 的 CD9;
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟;
- 加入 500 μl 的 PBS 缓冲液;
- 在孔径 5 μm 的过滤器上进行过滤;
- 以 1/10 进行四次连续稀释;
- 将 100 μl 样品在 CB04 膜上过滤;
- 用酯酶进行标记;
- 进行检测。

下表 4 示出在细菌存在下使用 CD9 聚集血小板的情况。

表 4

细菌		CD9	结果	回收%
<i>Staph. epidermidis</i>	PC 10	-	46	93
			44	
<i>Staph. epidermidis</i>	PC 10	+ 搅拌	43	
			48	
大肠杆菌	PC 10		218	64
			243	
大肠杆菌	PC 10	CD9 + 搅拌	166	
			148	

这些结果示出 *Staphylococcus epidermidis* 被显著回收。大肠杆菌计数降低 36%。

I.2 红细胞的凝集

凝集素是非免疫起源的糖蛋白，其凝集细胞和/或沉淀碳水化合物复合物。这些分子易于与特异性碳水化合物结合

在本发明这些实验研究中使用两种凝集素：

- *Phaseolus vulgaris* PHA-E
- *Vicia sativa*

实施例 1：凝集素对红细胞的凝集作用

使用 *Phaseolus vulgaris* PHA-E 凝集素 (Sigma)，浓度为于 PBS 中 2 mg/ml。

Vicia sativa 凝集素 (Sigma) 使用浓度为 1 mg/ml。

对这两种凝集素的快速评估表明 *Vicia sativa* 无红细胞凝集作用。相反，*Phaseolus vulgaris* 诱导快速有效的凝集。

方法：

- 将 400 μ l 红细胞置于试管中，向其中加入 50 μ l 的 PBS 及 50 μ l 的 *Phaseolus vulgaris*；
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；
- 加入 500 μ l 的 PBS 缓冲液；
- 在孔径 5 μ m 的过滤器上进行过滤；

- 以 1/10 进行四次连续稀释；
- 用抗血型糖蛋白 PE 抗体进行标记；
- 进行检测。

图 6 示出在 *Phaseolus vulgaris* 存在下获得的红细胞凝集情况。

在这个实验中使用的 *Phaseolus vulgaris* 浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

我们可以见到在存在 *Phaseolus vulgaris* 情况下，红细胞的浓度可重复地降低两个 log。

实施例 2：在细菌存在下红细胞的凝集

初步测试示出 *Phaseolus* 凝集素和细菌之间无相互作用。

方法：

- 将大肠杆菌的低温珠导入含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18–24 小时；
- 将 400 μl 的 PBS，50 μl 的大肠杆菌 (纯培养物) 和 50 μl 的 *Phaseolus vulgaris* 在试管中混合；
- 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；
- 加入 500 μl 的 PBS 缓冲液；
- 在 5- μm 过滤器上进行过滤；
- 以 1/10 进行四次连续稀释；
- 将 100 μl 样品在 CB04 膜上过滤；
- 用酯酶进行标记；
- 进行检测。

使用浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 *Phaseolus vulgaris* 获得的结果示于下表 5。

表 5

细菌	红细胞	凝集素 (浓度)	计数	回收%
大肠杆菌 NCTC 9001	RBC 9		662 604	
大肠杆菌 NCTC 9001	RBC 9	Phaseolus 200 µg/ml	544 579	91

这些结果示出在凝集步骤之后检测到大约 91% 的细菌，而且在此凝集步骤之后，红细胞浓度降低两个 log，而大肠杆菌仍以显著被回收。

II. 通过裂解步骤浓缩致病微生物

在本发明中，本申请人对不同的能消除血细胞而不影响可能存在于分析样品中的细菌浓度的选择性裂解方法进行了评估。

在几次初步研究之后，本申请人观测到某些细菌对去污剂如 Triton X100 有抗性，并确定了细菌回收百分率最佳所对应的去污剂最佳浓度。

实施例 1: 裂解溶液的配方对纯细菌培养物的作用

方法:

- 将菌株保存在含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18-24 小时；
- 在 PBS 中连续稀释(1/10)直至 10^{-5} ；
- 将 1ml 的最后的稀释液用 9ml 裂解溶液处理 15 分钟，所述裂解溶液具有 0.01% (重量/体积)的皂苷，0.1% (重量/体积)的 Tween 和 0.001% (重量/体积)的 Triton X 100；
- 将 100 µl 样品在 CB04 膜上过滤；
- 根据附件 1 所示用酯酶进行标记；
- 进行检测。

这些不同试验的结果示于下表 6，其中表示了获得的不同细菌回收百分率。

表 6

菌株	对照	裂解的样品	回收百分率
大肠杆菌	132 145	153 119	98
<i>Bacillus cereus</i>	465 572	61 54	11
大肠杆菌	52 54	44 44	83
<i>Staph. epidermidis</i>	2952 3069	3024 3020	101
<i>E. aerogenes</i>	841 802	880 925	110
<i>Ps. aeruginosa</i>	261 215	82 66	31
<i>Staph. aureus</i>	105 94	126 122	125
<i>P. mirabilis</i>	729 906	1129 1151	139
<i>S. typhimurium</i>	608 600	820 787	133
<i>Serratia marcescens</i>	1848 1775	1826 1860	102
<i>C. amycolatum</i>	1103 1167	1512 2035	156
<i>K. pneumoniae</i>	72 82	79 73	99
<i>P. fluorescens</i>	4039 3951	4873 5105	125
<i>Streptococcus bovis</i>	3074 2939	1848 1978	64
<i>Y. enterocolitica</i>	10,218 10,321	9888 10,526	99

这些结果示图 7。

大多数菌株不受裂解溶液的影响：回收百分率与预先确定的预测结果一致，除了 *Ps. Aeruginosa* 和 *Bacillus cereus* 之外回收百分率均在 85—115%之间。

实施例 2a: 裂解溶液配方对接种于血小板中的细菌的作用

将两个菌株在血小板浓缩物中适应生长，以模拟污染。

方法:

- 将菌株 *Bacillus cereus* 和 *Staph. Aureus* 接种于 50ml 试管中的血小板中，浓度为 10^6 个细胞/20ml 血小板；
- 将这些 50-ml 试管在 22°C 在血小板温箱中保持几天；
- 将 1ml 接种的血小板用 9ml 裂解溶液稀释；
- 在周围环境温度裂解 15 分钟；
- 将 100 μ l 的样品在 CB047 膜上过滤；
- 将细菌如附件 1 所示用硬脂酸底物标记；
- 将膜用分析仪扫描。

在裂解后细菌计数结果示于下表 7。

表 7

		对照	裂解的
<i>Bacillus cereus</i>	细菌/ml	16	14
		24	27
		$2.0 \text{ E} + 06$	$2.1 \text{ E} + 06$
<i>Staph. aureus</i>	细菌/ml	1966	1885
		2046	1901
		$2.0 \text{ E} + 08$	$1.9 \text{ E} + 08$

将细菌以初始浓度为 5×10^3 个细胞/ml 接种，并在几天后检测浓度为 $10^6 - 10^9$ 个细胞/ml.

从这些实验中可以看出在血小板中生长的细菌不受裂解溶液的影响。

实施例 2b: 裂解溶液的配方对纯细菌培养物的作用

方法:

- 将菌株保存于含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18—24 小时；

- 在通过酯酶标记确定细菌数后，将 3000 个细菌接种于 3ml 的 PBS 中；
 - 将一些所述 3ml 溶液用裂解溶液 (NOG 0.25% - 2%) 处理 20 分钟；
 - 将全部样品在 CB04 膜上过滤；
 - 在固相细胞计数仪中进行计数。
- 所得结果示于图 11。

实施例 3：裂解组合物的配方对红细胞的作用

方法：

- 将 1ml 红细胞在 9ml 裂解溶液或者 9ml 的 PBS (对照) 中稀释；
- 在周围环境温度裂解 15 分钟；
- 使用细胞计数仪分析裂解的或未裂解的样品。

图 9 示出裂解的红细胞制品与未裂解的红细胞制品对比的结果。

实施例 4：裂解组合物的配方对血小板的作用

测试所述裂解溶液效力的可重复性。裂解并分析不同的血小板样品。

方法：

- 将 1ml 血小板在 9ml 的裂解溶液中稀释；
- 在周围环境温度进行裂解 15 分钟；
- 在 PBS 缓冲液中连续稀释(1/10)直至 10^{-5} ；
- 将 100 μ l 样品在 CB04 膜上过滤；
- 将微生物用酯酶底物标记；
- 用分析仪扫描该膜。

图 8 示出了用不同的血小板样品获得的裂解结果。

III. 利用两个聚集和裂解步骤浓缩致病微生物

通过在两个步骤中浓缩致病微生物而制备样品包括：

- 1) 特异性聚集或凝集血液制品的细胞，
- 2) 特异性裂解血液制品的细胞。

实施例 1：特异性分离血小板

方法：

– 将大肠杆菌的低温珠导入含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，并在 37°C 温育 18–24 小时；

如下进行第一个聚集步骤：

– 将 1ml 的血小板浓缩物，50 μ l 的大肠杆菌 (纯培养物)和 100 μ l 的 CD9 在试管中混合；

– 将试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟。

然后进行第二个裂解步骤：

– 在聚集后将 900 μ l 的裂解缓冲液加入 100 μ l 的滤液中；

– 将该混合物在周围环境温度保持 15 分钟；

– 1/10 连续稀释四次；

– 将 100 μ l 所得样品在 CB04 膜上过滤；

– 用酯酶底物进行细菌和血小板标记 (附件 1)；

– 用分析仪计数细菌和血小板。

进行两个步骤浓缩细菌的方法获得的结果示于下表 8。

表 8

细菌	血小板浓缩物 (PC)	聚集剂		细菌计数	细菌回收%
大肠杆菌 NCTC 9001	PC			337 313	
大肠杆菌 NCTC 9001	PC		裂解	302 256	86%
大肠杆菌 NCTC 9001	PC	CD9		266 161	66%
大肠杆菌 NCTC 9001	PC	CD9	裂解	157 138	45%

实施例 2：特异性分离红细胞

方法：

–将大肠杆菌的低温珠导入含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中，在 37°C 温育 18–24 小时。

如下进行凝集步骤：

–将 1ml 红细胞，50 μ l 的大肠杆菌 (纯培养物) 和 125 μ l 的凝集素在试管中混合；

–将该试管在周围环境温度手工搅拌 5 分钟；

–在孔径 5 μ m 的过滤器上进行过滤。

然后进行第二个裂解步骤：

–在凝集后将 900 μ l 裂解缓冲液加入 100 μ l 滤液中；

–将该混合物在周围环境温度保持 15 分钟；

–1/10 连续稀释四次；

–将 100 μ l 所得样品在 CB04 膜上过滤；

–用酯酶底物标记细菌及用抗血型糖蛋白 PE 抗体标记红细胞（附件 2）；

–用分析仪计数细菌和红细胞。

下表 9 示出在用凝集素凝集红细胞及随后的裂解步骤之后，进行细菌计数获得的结果。

表 9

				细菌计数	细菌回收 (%)	红细胞计数
大肠杆菌 NCTC 9001	红细胞 10			441		3582
				449		4188
大肠杆菌 NCTC 9001	红细胞 10	凝集素	裂解	261	68	161
				348		180

在凝集后，红细胞浓度降低 1.5 log。

在这两个步骤后，68%的细菌被回收。

IV. 标记试剂

实施例 1: 酯酶底物 ChemChrome V6

标记溶液根据如下方案可以从酯酶底物中制备并用于本发明的检测方法中:

a) 制备

- 10 μ l 酯酶底物 ChemChrome V6 /ml ChemSol B16 缓冲液 (500 μ l 标记溶液/膜);

- 将这一溶液在 4°C 避光贮存最多 4 小时。

b) 使用

- 将一种标记缓冲液导入直径 33-mm 的培养皿中;

- 将 500 μ l 标记溶液分散于该缓冲液中;

- 将 CB04 膜置于过滤梯度上。过滤 100 μ l 待分析的样品;

- 将该膜置于缓冲液;

- 在 37°C 温育 15 分钟。

实施例 2: 标记的抗体

因此，包含标记的抗体的一种标记溶液根据以下方案可用于本发明检测方法中:

- 收集 90 μ l 的样品稀释液;

- 加入 10 μ l 的抗血型糖蛋白 PE 抗体;

- 在周围环境温度旋动避光温育 15 分钟；
- 加入 900 μ l 的 PBS 缓冲液；
- 将 CB04 膜置于过滤梯度；
- 真空过滤 100 μ l 待分析的溶液；
- 在分析仪中分析膜，将分析仪的第一和第三个电缆颠倒（*inversant les cables primaire et tertiaire de l'Analyseur*）。

实施例 3：评价加入细菌透化剂对标记通透性的改良

方法：

- 将菌株保存于含有 9ml 胰化蛋白胨大豆肉汤的试管中并在 37°C 温育 18–24 小时；
- 在通过酯酶标记确定细胞计数后，将 3000 个细菌接种于 3ml 的血小板浓缩物中；
- 将该 3ml 溶液用 1ml 的聚集溶液(CD9: 克隆 6B1: 30 μ g/ml, Picogreen 1/2000, PEI 40 μ g/mL 于 80 μ g/mL)处理 40 分钟；
- 将样品通过孔径 5 μ m 的过滤器过滤；
- 将样品在裂解溶液中(氯己定 5×10^{-3} %, NOG 0.5%, 乳链菌肽 0.2 μ g/ml, EDTA 5 mM)温育 20 分钟；
- 将全部样品在 CB04 膜上过滤；
- 利用血细胞计数仪在固相进行计数。

V. 结论

达到制备致病微生物的最佳条件的技术选项通过这些实验研究而限定。

关于血小板浓缩物，这些技术选项包括：

- 1) 使用例如血小板激活物抗体如 CD9 的聚集步骤；
- 2) 使用去污剂的组合如皂苷，Tween 20 和 Triton X 100 的细胞裂解步骤。

关于红细胞浓缩物，这些技术选项包括：

- 1) 使用凝集素例如 *Phaseolus vulgaris* 的聚集步骤；

2) 使用去污剂组合如皂苷、Tween 20 和 Triton X 100 的细胞裂解步骤。

致病微生物的标记和透化可以根据所需在聚集步骤，裂解步骤期间进行，或者在分析之前对最后的过滤器上的浓缩的微生物直接进行。

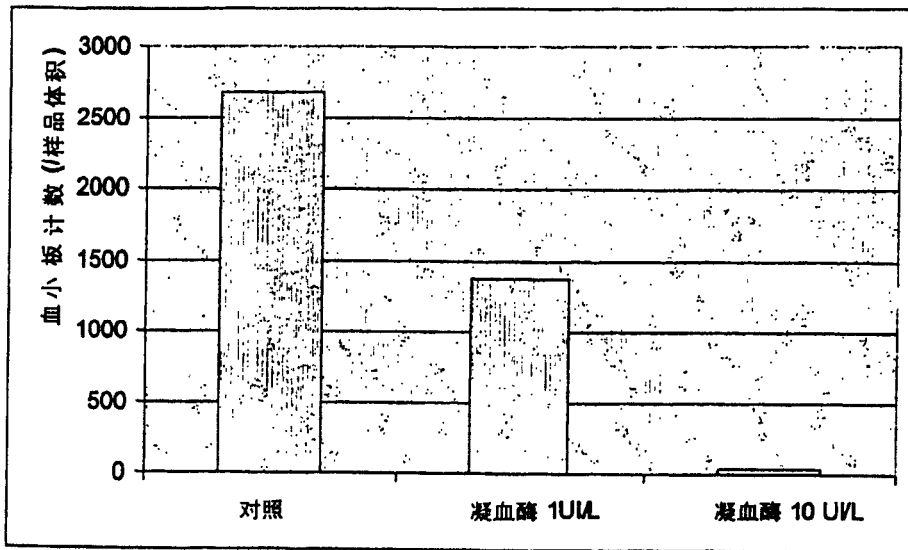


图1

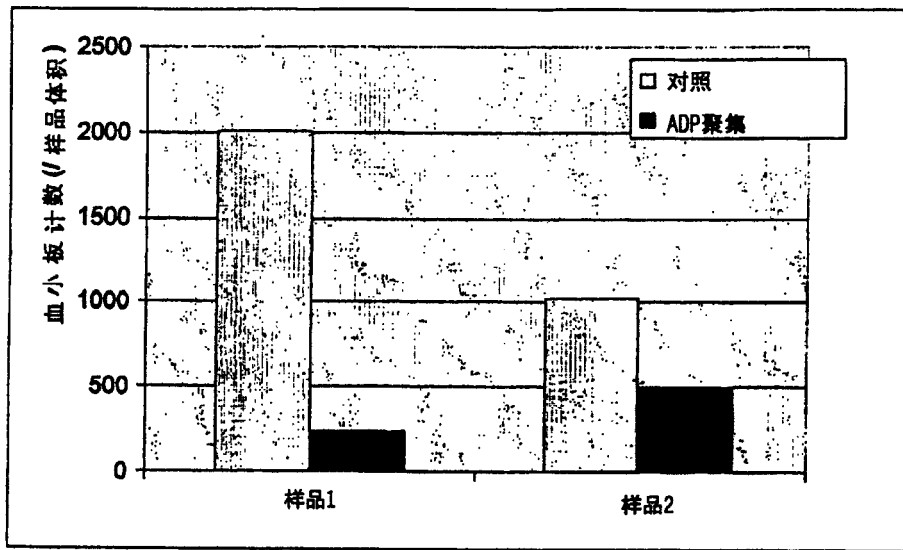


图2

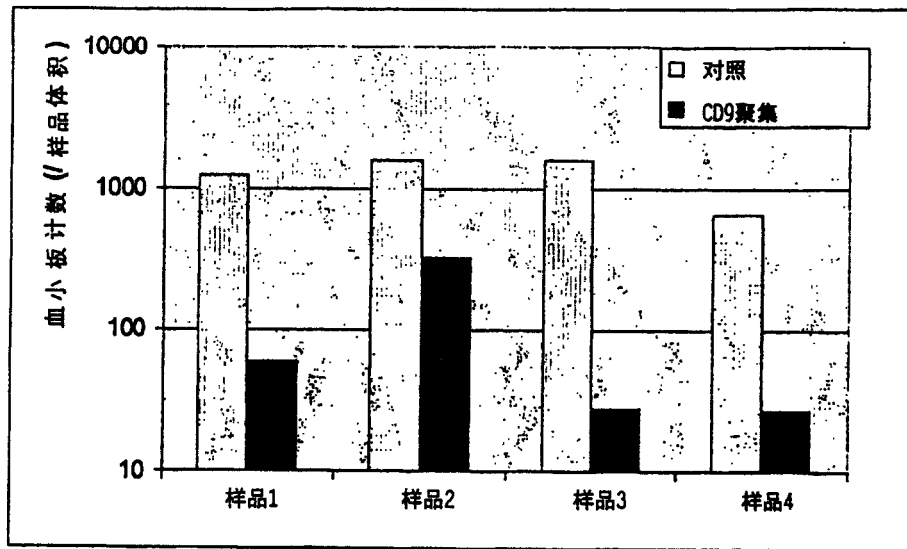


图3

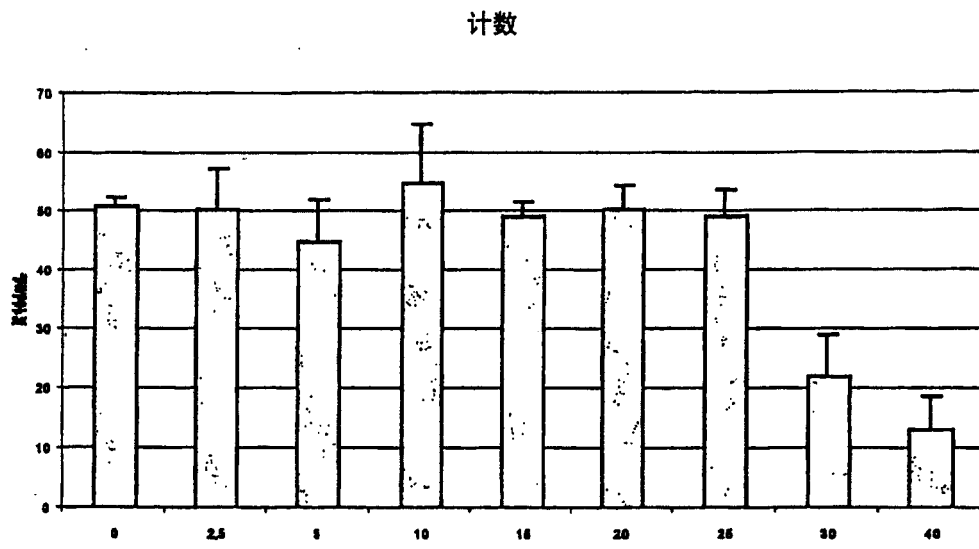


图4

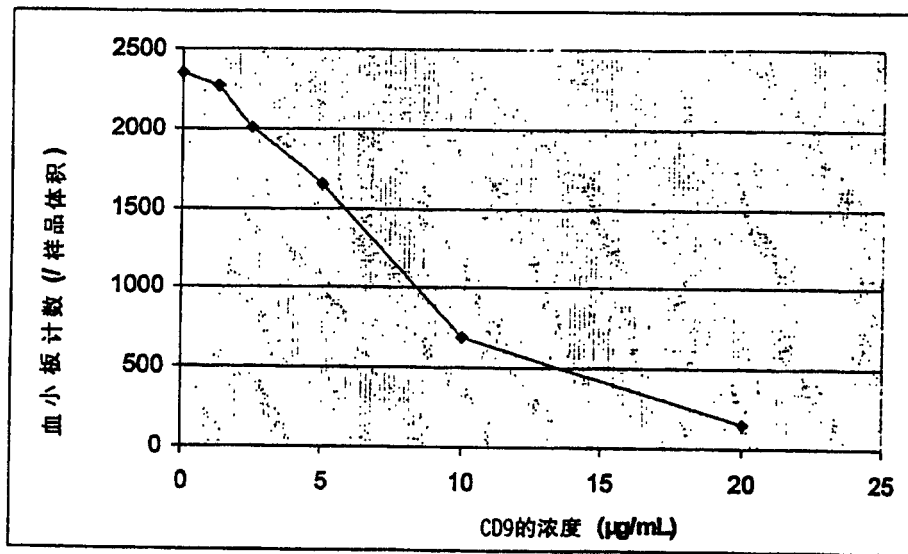


图5

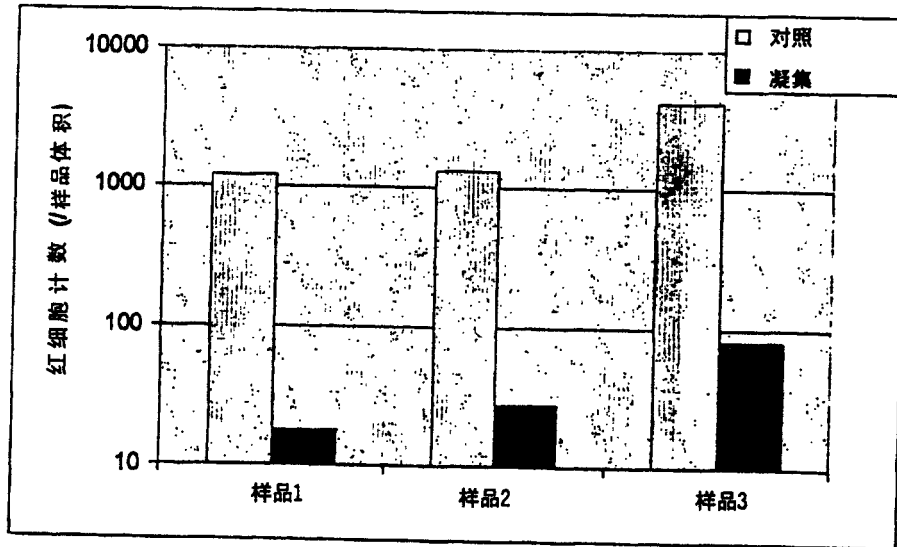


图6

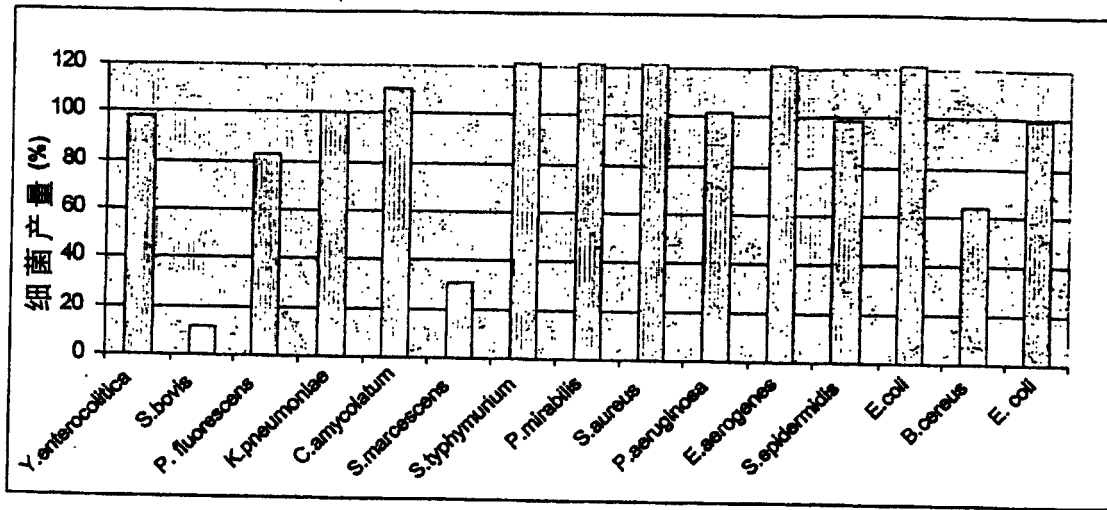


图7

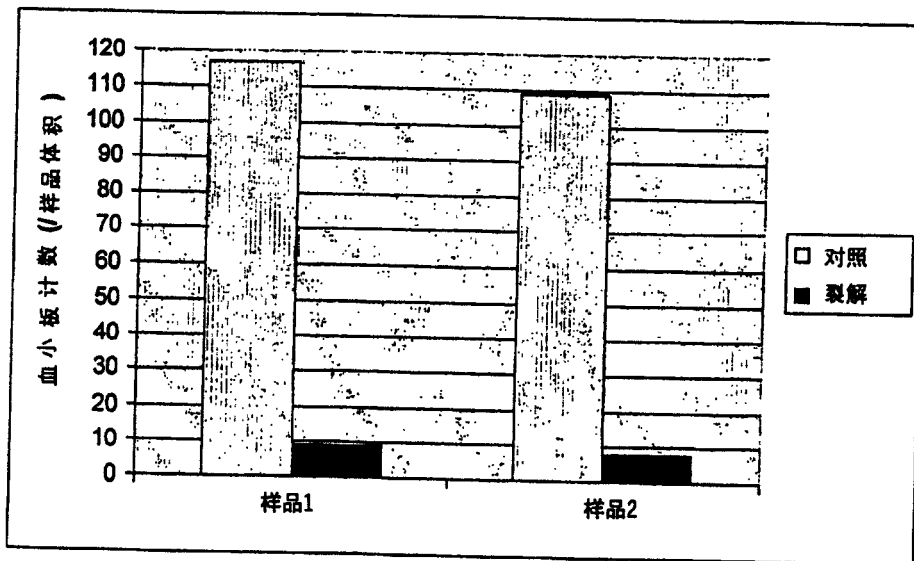


图8

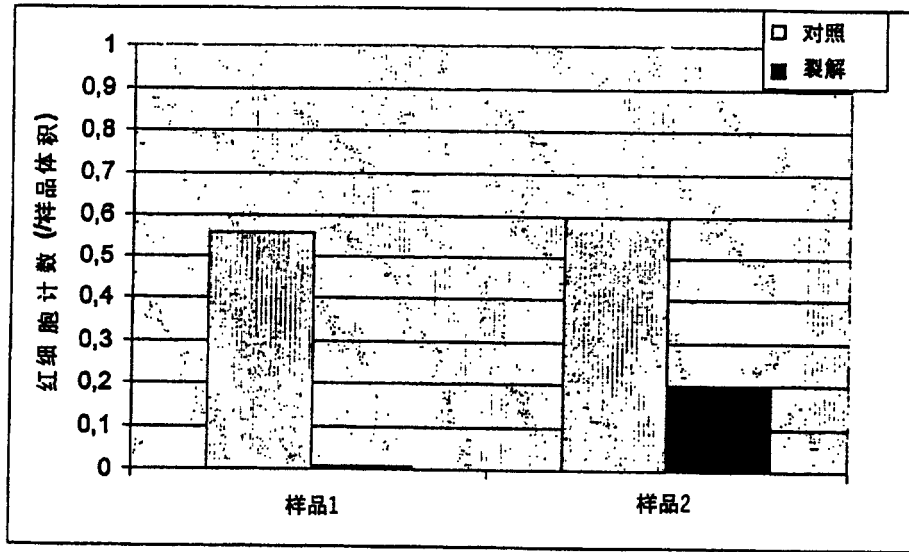


图9

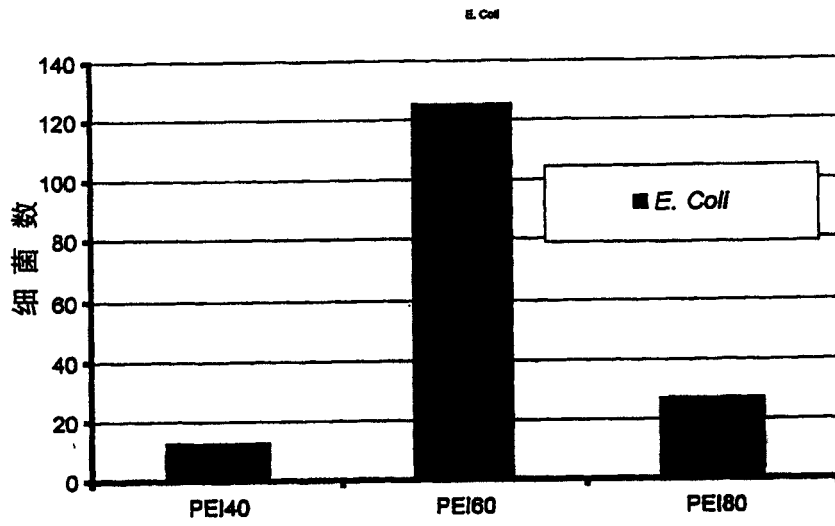


图10

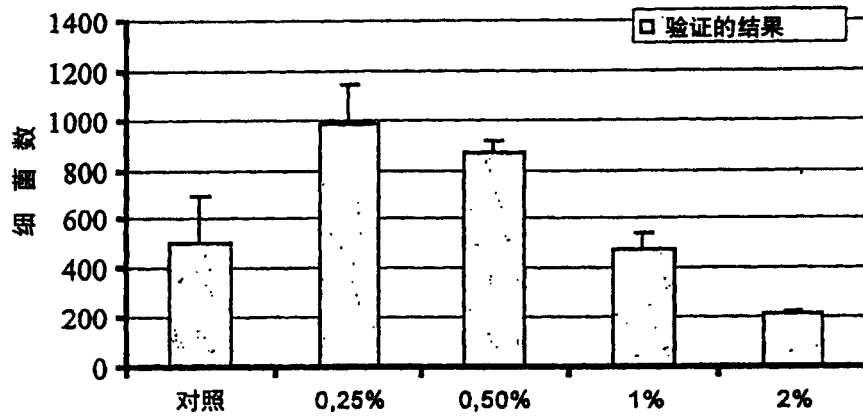


图11

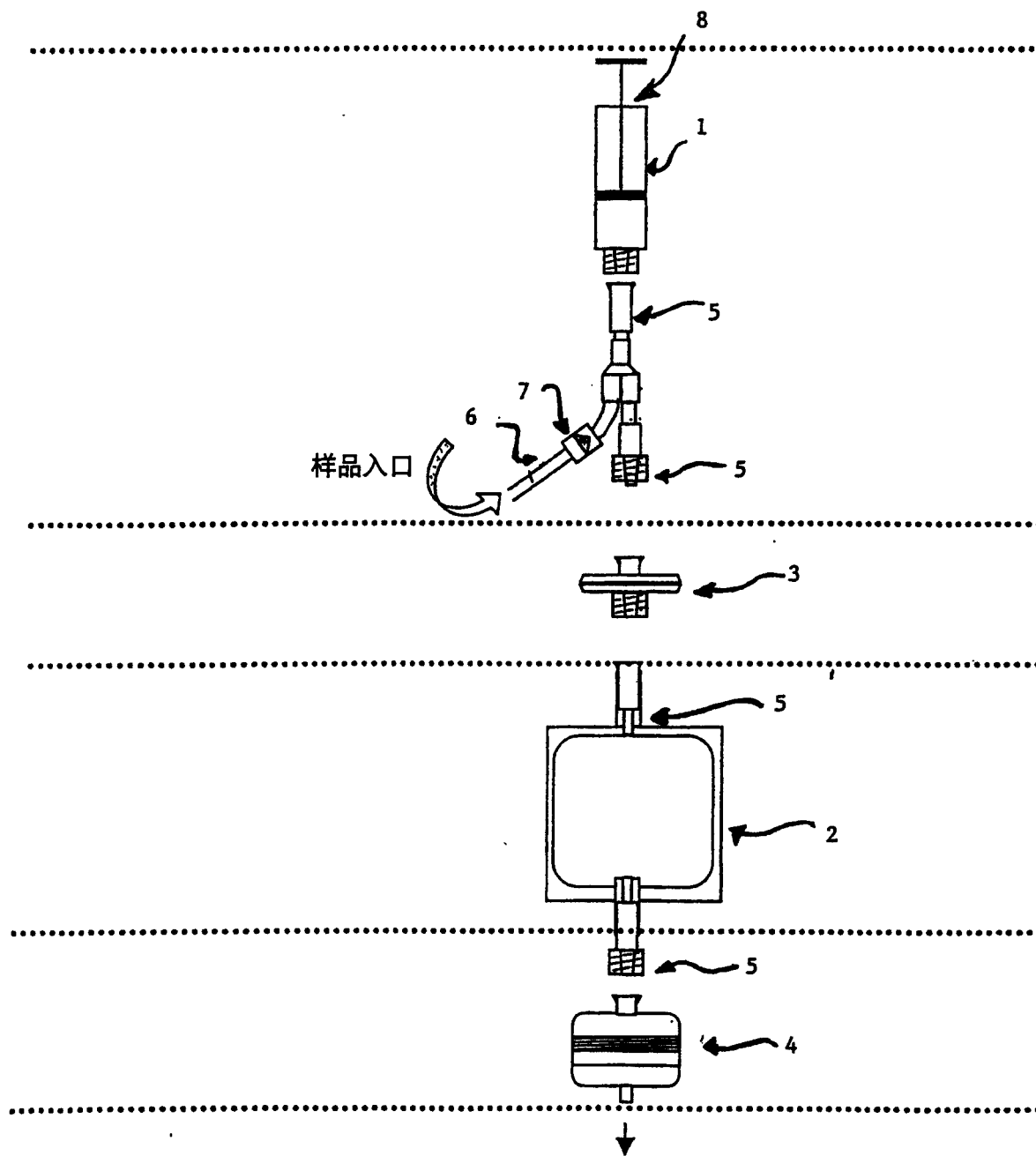


图12

专利名称(译)	从血液制品和/或其衍生物中浓缩和检测致病微生物的装置和方法		
公开(公告)号	CN1555418A	公开(公告)日	2004-12-15
申请号	CN02818041.0	申请日	2002-09-13
[标]发明人	让皮埃尔·埃尔梅 伊莎贝尔·贝松·福尔 塞巴斯蒂安·里博 扬·戈德弗兰 安妮·莫诺·德·安格莱斯		
发明人	让 - 皮埃尔·埃尔梅 伊莎贝尔·贝松 - 福尔 塞巴斯蒂安·里博 扬·戈德弗兰 安妮·莫诺·德·安格莱斯		
IPC分类号	G01N33/48 C12M1/12 C12M1/34 C12N1/02 C12Q C12Q1/04 C12Q1/22 C12Q1/24 C12Q1/70 G01N1/28 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/86		
CPC分类号	G01N1/4077 G01N33/569 G01N33/86		
代理人(译)	林晓红		
优先权	2001011873 2001-09-13 FR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种浓缩血液制品或其衍生物中可能存在的致病微生物以及检测浓缩的所述微生物的方法。所述方法包括如下步骤：(a)将所述血液制品的样品进行血细胞聚集处理，(b)将步骤(a)中形成的聚集物通过将处理的样品经过第一个过滤器而消除，所述过滤器允许污染微生物通过但不允许细胞聚集物通过，(c)将步骤(b)中获得的滤液中的残余细胞选择性裂解，(d)通过将步骤(c)的裂解物通过第二个过滤器回收污染微生物，从而检测可能被捕获的污染微生物。

