

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

C12Q 1/70 G01N 33/18



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815097.7

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1451050A

[22] 申请日 2001.7.6 [21] 申请号 01815097.7

[30] 优先权

[32] 2000. 7. 6 [33] FR [31] 00/08839

[86] 国际申请 PCT/FR01/02191 2001.7.6

[87] 国际公布 WO02/02811 法 2002.1.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.3

[71] 申请人 比奥·麦利尤股份有限公司

地址 法国马西埃图瓦勒

[72] 发明人 P·雷诺 E·吉约 C·马比莱特

C·瓦雄 B·拉克鲁瓦

G·韦尔内 M·-A·阿曼德

P·拉费尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 10 页 说明书 35 页 序列表 21 页
附图 2 页

[54] 发明名称 控制水相介质的微生物质量的方法
及其试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种控制环境水相介质的微生物质量的方法，该介质被怀疑含有各种微生物，包括下列步骤：选择一个参比组，它包括至少三种微生物，联合或分别代表一种微生物质量水平；提供微生物学检测试剂盒，含有至少三种探针，它们分别特异性鉴定所述的三种微生物；在处理要分析的介质后，使所述微生物或任何从要分析的介质衍生的任何组分与所述检测试剂盒接触，从而对所述微生物进行多重检测，所述检测代表介质的微生物质量水平。本发明还涉及一种实施所述方法的合适的微生物学检测试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种控制倾向于含有各种微生物的水环境介质的微生物质量的方法，其特征在于，
- 5 -选择参照组，由至少三种微生物组成，共同或分别代表微生物质量水平，
 -提供微生物学检测试剂盒，含有至少三种鉴定性探针，它们分别特异性鉴定所述的三种微生物，
 -在处理要分析的介质后，使所述微生物或任何从所述微生物获得的组分与所述检测试剂盒接触，从而能对所述微生物进行多重检测，
- 10 -该检测代表介质的微生物质量水平。
- 2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒含有至少一种对于一种细菌特异性的鉴定性探针，至少一种对于一种寄生虫特异性的鉴定性探针，和至少一种对于一种病毒特异性的鉴定性探针。
- 3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒含有至少
15 4 种对于至少 4 种不同细菌特异性的鉴定性探针。
- 4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒含有至少 5 种对于至少 5 种不同病毒特异性的鉴定性探针。
- 5.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒含有至少 2 种对于至少 2 种寄生虫特异性的鉴定性探针。
- 20 6.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒含有至少 1 种对于 1 种细菌特异性的鉴定性探针和至少 1 种对于至少 1 种寄生虫特异性的鉴定性探针。
- 7.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自细菌：
- 25 大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌。
- 8.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自细菌：
 大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌。
- 9.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测

试剂盒的所述微生物选自细菌：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、幽门螺杆菌、粪肠球菌、尿肠球菌、
耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、表皮葡萄球
菌、金黄色葡萄球菌、大肠弯曲杆菌、空肠弯曲杆菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单
胞菌、温和气单胞菌、铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、鲍氏不动杆菌、唐菖蒲伯克霍
尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆
菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、
戈登分枝杆菌、军团菌属、侵肺军团菌、沙门氏菌属。

10. 如权利要求 1、2、3、5 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物
检测试剂盒的所述微生物选自微生物：大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、
隐孢子虫属。

11. 如权利要求 1、2、3、5 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物
检测试剂盒的所述微生物选自微生物：沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、吸吮贾第
虫、短小隐孢子虫。

12. 如权利要求 1、2、3、5 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物
检测试剂盒的所述微生物选自微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪
肠球菌、尿肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚
膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒
A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫。

13. 如权利要求 1-6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的
所述微生物选自微生物：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪肠球菌、尿肠球菌、耐久肠球菌、
小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄
球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，
短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、
豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状
病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒。

14. 如权利要求 1-6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的
所述微生物选自微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪肠球菌、尿肠

球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒，分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鲍氏不动杆菌、表皮葡萄球菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、星状病毒。

15.如权利要求 1-6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自微生物：大肠杆菌、肠病毒、隐孢子虫属。

16.如权利要求 1、2 和 4 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自病毒：

腺病毒，例如腺病毒 40 和腺病毒 41a；

星状病毒，HastV-1-2；

15 肠病毒，例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒或埃可病毒，
轮状病毒，

杯状病毒，例如诺伏克病毒，札幌病毒和甲肝病毒。

17.如权利要求 1、2 和 5、6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自寄生虫：隐孢子虫属、短小隐孢子虫、贾第虫属、吸吮贾第虫和微孢子目。

18.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自细菌：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆菌属、军团菌属、侵肺军团菌、金黄色葡萄球菌。

25 19.如权利要求 1、2 和 4 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自病毒：甲肝病毒、肠病毒和选自杯状病毒和轮状病毒的至少一种病毒。

20.如权利要求 1、2 和 4 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自病毒：

甲肝病毒、肠病毒和选自诺伏克病毒和轮状病毒的至少一种病毒。

21.如权利要求 1、2 和 5、6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自寄生虫：

隐孢子虫属，短小隐孢子虫、贾第虫属，吸吮贾第虫。

5 22.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆菌属、军团菌属、侵袭军团菌、金黄色葡萄球菌，甲肝病毒、肠病毒和选自杯状病毒和轮状病毒的至少一种病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫、贾第虫属，吸吮贾第虫。

10

23.如权利要求 1、2、3 和 6 任一所述的方法，其特征在于，所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆菌属、军团菌属、侵袭军团菌、金黄色葡萄球菌，甲肝病毒、肠病毒和选自诺伏克病毒和轮状病毒的至少一种病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫、贾第虫属，吸吮贾第虫。

15

24.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性探针具有选自 SEQ ID NO:1-104 的任一序列的序列及其任何片段，所述片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

20

25.如权利要求 2 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39，SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，所述片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；和至少一种序列，选自 SEQ ID NO:50-60 和 SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

25

26.如权利要求 3 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 4 种

鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

27.如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 5 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:50-60 和 SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

28.如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 2 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49 和 SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

29.如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列，和至少一种序列，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

30.如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:66 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

31.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

32.如权利要求 10 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID

NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

33.如权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 5 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46-49、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

34.如权利要求 16 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 10 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 15 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

35.如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 15 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:61-75 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

36.如权利要求 13 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 20 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-51、SEQ ID NO:53-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

37.如权利要求 14 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 25 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-6、SEQ ID NO:9-55-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

38.如权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID

NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23。

39.如权利要求 19 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75。

5 40.如权利要求 20 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO: 98-104、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO 56-58、SEQ ID NO 76-96。

41.如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，所述鉴定性试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65。

10 42.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，在与检测试剂盒接触前进行至少一个裂解步骤。

43.如权利要求 42 所述的方法，其特征在于，在所述裂解步骤后，进行扩增步骤。

15 44.如前任一权利要求所述的方法，其特征在于，作为要分析的介质的预处理，进行富集所述样品中微生物的步骤。

45.如权利要求 44 所述的方法，其特征在于，所述富集步骤可通过过滤进行。

46.如权利要求 45 所述的控制液体样品的方法，其特征在于，所述过滤用具具有空心纤维的过滤装置，使用前沿模式进行。

20 47.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39，SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；至少一种序列，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，所述片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少
25 70%同一性的序列；和至少一种序列，选自 SEQ ID NO:50-60、SEQ ID NO:70-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

48.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少 4 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、

SEQ ID NO:66-69 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

49.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 5 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:50-60、SEQ ID NO:70-104 及其任何
5 片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

50.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:40-49 和 SEQ ID NO:63-65 及其任何
10 片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

51.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、
SEQ ID NO:66-69 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个
15 邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列, 和至少一种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

52.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、
20 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

54.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、
25 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

55.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针, 选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、

SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

56.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
5 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

57.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
10 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:61-75 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

58.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
15 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-51、SEQ ID NO:53-56、SEQ ID NO:57-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

59.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
20 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-6、SEQ ID NO:9-55-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

60. 一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
25 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

61.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒
30 含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-96、SEQ ID NO:98 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所

包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

62.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:56-58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-96 及其任何片段，该
5 片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

63.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具
10 有显示至少 70%同一性的序列。

64.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-
15 96、SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

65.一种微生物学检测样品中微生物存在的试剂盒，其特征在于，所述试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:56-58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:76-96、SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。
20

66.如权利要求 47-64 任一所述的微生物学检测试剂盒，其特征在于，所述鉴定性探针或其片段与固相载体结合。
25

67.如权利要求 47-65 任一所述的微生物学检测试剂盒，其特征在于，所述鉴定性探针或其片段与固相载体结合并构成生物芯片。

68.一种生产和/或消毒液体的方法，其特征在于，该方法包括步骤：用权利
30 要求 47-67 任一所述的微生物学检测试剂盒分析，产生数据解释的算法，使所述生产和/或消毒方法由微生物检测试剂盒产生的所述数据伺服控制。

控制水相介质的微生物质量的方法及其试剂盒

5 本发明涉及微生物学诊断领域，鉴定和定量检测存在于液体和产品，例如水中的微生物的检测技术。

它还涉及分析试剂盒和方法，使得可以对大体积样品在一天之内进行微生物的鉴定和定量，并可任选地通过这些分析结果实现产品-监控，或甚至伺服控制纯化和生产技术。

10 微生物鉴定的常规方法需要在所选培养基上培养的步骤，一般然后根据形态、生物化学和/或免疫学特征鉴定。

这些方法对于生长缓慢的细菌时间长达一天到几周，例如对于军团菌为 10-12 天，对于分枝杆菌长达一个月，当用于复杂的多微生物样品(水、环境和食物)时特异性较差，较不灵敏。另外，不能检测由于环境因素或杀菌处理的压力能存活
15 但不可培养(VBNC)的细菌，也不适合自动化。

10 多年来，分子生物学方法，特别是那些基于体外酶扩增(PCR)和寡核苷酸探针的使用的方法，已经使得微生物学诊断发生了革命。

由于其快速、灵敏性和特异性，它们成为在水样或其它样品中检测特定指示菌或病原性微生物的常规方法的替代方法，使得能够检测这些微生物在环境中的
20 存在。

在用于检测水样或任何样品中的特定指示菌或病原性微生物的分子生物学方法中，使它有可能检测环境中存在这种微生物，特别提到的可有以下几种：

为了检测通常在水的卫生控制中寻找的粪便污染指示菌(全部耐热性大肠杆菌型，大肠杆菌)，开发了用于饮用水样品的基于用探针 PCR-杂交的迅速测定，
25 特别是[A. K. Bej 等, Appl. Environ. Microbiol, 1990, No. 56, p. 307-314] [E. J. Fricker 等, Letters in Applied Microbiology, 1994, No. 19, p. 44-46].

然而，这些粪便污染的指示菌不能预测非粪便来源的细菌污染(铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、军团菌等)或非细菌污染物(病毒和寄生虫)的存在。

因此,开发了用于特别搜索病原性微生物(细菌、病毒、寄生虫)的基于 PCR 的分子检测试验。

在细菌检测领域中,特别应注意欧洲专利 EP-A-0 438 115,它描述了一种通过在水环境样品中一步体外酶扩增,检测军团菌病原性微生物和粪便污染指示菌的方法。

几种出版物也提到了 PCR 试验,用于检测水和环境中的沙门氏菌[J.S. Way 等, Appl. Environm. Microbiol., 1993, No. 59, p. 1473-1479] [A.S. Waage, 等, Appl. Microbiol., 1999, No. 87, p. 418-428]和军团菌[A.K. Bej, Appl. Environ. Microbiol., 1991, No. 57, p. 2429-2432]。

10 US-B-5,298,392 描述了粪便污染指示菌和病原体的检测。

在病毒检测领域中,由于病毒的存在与水的卫生控制中常规查找的粪便污染指示菌无关,需要迅速和有效的分析方法,特别是控制水的病毒污染的方法。

检测水和环境中病毒的常规方法需要一个动物细胞培养步骤,这是一种冗长、费力和限制的方法,仅限于几种病毒家族。

15 为了搜索水和环境中的病原性微生物,描述了许多基于酶扩增步骤的方法。例如对于在水样中采用 RT-PCR 检测肠病毒、甲肝病毒和轮病毒[M. Abbaszadegan 等, Appl. Environ. Microbiol., 1997, No. 63(1), p. 324-328]和[M. Gilgen 等, International Journal of Food Microbiology, 1997, No. 37, p. 189-199]。

在寄生虫检测领域中,特别是检测贾第虫属和隐孢子虫属的领域中,开发了常规标准化方法(EPA 1622-1623 和 DWI)。这两种寄生虫以被囊形式(卵囊和囊)在水和环境中传播,使它们对于常规消毒处理,例如氯化具有特别抗性。这些方法包括一个过滤步骤,然后免疫磁性捕获(IMS)卵囊,用免疫荧光(IFA)分析。这些方法耗时长且苛刻,对于人病原性的物种(吸吮贾第虫(*Giardia lamblia*)和短小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)没有特异性,不能检测到病原体的存活率。

25 已描述了更迅速、灵敏和特异的,基于酶扩增步骤(PCR)的分子方法。

WO-A-94/02635, WO-A-97/02281 和 US-A-5,693,472 描述了检测水和/或生物样品中的短小隐孢子虫的引物和探针。

EP-A-0 453 290 和 US-A-5,558,989 描述了一种检测吸吮贾第虫的方法,它在人中具有病原性,该方法基于使用对应于 18S rRNA 序列的核酸(DNA 和/或 RNA) 30 探针。EP-A-0 550 883 描述了一种用搜索吸吮贾第虫的试剂的 PCR 试验,其灵敏

度是水浓缩物的 1-5 个卵囊/毫升。

描述了分子方法，它区别死寄生虫和活的和/或感染性寄生虫，从而可以获得对由于水中存在这些寄生虫，对实际卫生造成的危险有更好评估。

特别提到的是 WO-A-97/42349，它涉及活的(通过检测 hsp70 热休克蛋白 mRNA)和/或感染性(细胞培养物和酶扩增)隐孢子虫和贾第虫的检测，和 US-A-5,556,774，它涉及通过联合 PCR 步骤和体外脱囊步骤检测活隐孢子虫的方法。

虽然上述引用的，用于搜索污染指示菌和病原性微生物，包括细菌、寄生虫和病毒的主要分子方法比常规方法在快速性、灵敏性和特异性上都有效得多，它们每次试验仅针对一种类型的微生物。

10 因此，为了测定或检测几种参数，需要进行与要测定或检测的参数次数相等的特异性试验，它使得完整的微生物学分析极其费力。

描述了几种多检测方法，但其多检测的能力差，因为它们最多只能检测 3 种参数。

特别提到的是多重 PCR 技术，它包括在同一试管中进行几次 PCR 反应。

15 例如，在[A.K. Bej 等, Appl. Environ. Microbiol., 1991, No. 57, p. 597-700]中，描述了同时检测军团菌和侵肺军团菌(*L. pneumophila*)，和同时检测大肠杆菌、沙门氏菌和志贺氏菌，在[A.K. Bej 等, Appl. Environ. Microbiol., 1991, No. 57, p. 2429-2432]中，描述了全部大肠杆菌型、大肠杆菌和志贺氏菌的同时检测，在 EP-A-0 438 115 中，描述了军团菌和粪便污染指示菌的检测。

20 用两种或最多三种荧光探针进行的原位杂交(FISH)技术可以同时检测几个参数，但灵敏度比上述酶扩增方法低。

在出版物中，[M. Eggers 等, the 27th International Conference on Environmental Systems 发表, 1997]，描述了一种方法，用于在太空中同时检测水和空气中的微生物。该方法仅针对细菌，例如大肠杆菌和解蛋白弧菌(*Vibrio proteolyticus*)，通过
25 在固相载体(96 孔微量平板)上直接杂交 16S rRNA。没有酶扩增步骤，灵敏度不是很高，多重检测的能力限于几种微生物；然而，描述了用涉及生物芯片的技术检测水和空气中多重的方法。

在继续之前，为了清晰度和清楚理解起见，需要限定一些在说明书和权利要求中使用的术语。

30 “核苷酸片段”或“寡核苷酸”或“多核苷酸”是一条通过磷酸酯键装配的

核苷酸基序链，特征是天然核酸的信息序列能够在预定条件下与核苷酸片段杂交，链可能含有不同结构的单体，并从天然核酸分子和/或基因重组和/或化学合成获得。

“核苷酸基序”是单体的衍生物，它可以是核酸的天然核苷酸，其组成元件是糖、磷酸基团和含氮碱基；在 DNA 中，糖是 2-脱氧核糖，在 RNA 中，糖是核糖；取决于它是 DNA 还是 RNA，含氮碱基可来自腺嘌呤、鸟嘌呤、尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶；或单体可以是核苷酸，其上述三个组成元件的至少一个发生了改变；例如修饰可以在碱基水平，具有修饰的碱基例如次黄嘌呤核苷、5-甲基脱氧胞嘧啶核苷、脱氧尿苷、5-二甲基氨基脱氧尿苷、2,6-二氨基嘌呤、5-溴脱氧尿苷或任何其它能够杂交的修饰的碱基，或在糖水平，例如用聚酰胺替换至少一个脱氧核糖[P.E. Nielsen 等, Science, 1991, No. 254, p. 1497-1500]，或在磷酸基团水平，例如用选自二磷酸酯、烷基和芳基磷酸酯和硫代磷酸酯的酯替换。

术语“信息序列”意味着核苷酸型的基序的任何有序系列，其化学性质和其参比方向的顺序与天然核酸含有相同质量的信息。

术语“杂交”是指一种过程，其中在合适的条件下，两条具有足够互补序列的核苷酸片段能形成具有稳定的特异性氢键的双链。“能与多核苷酸杂交”的核苷酸片段是一种能与所述多核苷酸在杂交条件下杂交的片段，这种杂交条件对于多种情况能够以已知方式确定。杂交条件是由严格性决定的，即操作条件的严格程度。进行杂交的严格度越高，特异性越强。严格性特别定义为探针/靶二倍体的碱基组成的函数，也通过两条核苷酸之间错配程度确定。

严格性还依赖于反应参数，例如存在于杂交溶液中离子的浓度和类型，变性剂的性质和浓度和/或杂交温度。进行杂交反应的条件严格程度主要取决于所用的探针。所有这些数据是熟知的，可由本领域技术人员确定合适的条件。

一般视所用的探针长度而定，杂交反应的温度在约 20-65°C 之间，特别是在 35-65°C 之间，在浓度约 0.8-1M 的盐水溶液中。

“探针”是一种核苷酸片段，含有 5-100 个单体，特别是 6-35 个单体，在给定的条件下具有杂交特异性，从而与核苷酸片段形成杂交复合物，该片段具有例如：包含在核糖体 RNA 中的核苷酸序列，通过所述核糖体 RNA 反转录获得的 DNA 和通过转录产生所述核糖体 RNA 的 DNA(本文中称为核糖体 DNA 或 rDNA)；探针可用于诊断目的(特别是捕获探针或检测探针)。

捕获探针是固定的，或可通过任何合适的方法，即直接或间接，例如通过共价或吸附固定在固相载体上。

检测探针可用选自放射性同位素、酶(特别是过氧化物酶、碱性磷酸酶或能水解显色、生荧光或发光底物的酶)、生色化学化合物、显色、生荧光或发光化合物、
5 核苷酸碱基类似物和配体，例如生物素。

“引物”是一种含有 5-100，优选 10-40 个核苷酸基序的探针，它在引发酶性聚合，例如 PCR(聚合酶链式反应)等扩增技术，测序方法，反转录方法中的给定条件下具有杂交特异性。

片段和参比序列之间的同一性表明了所述片段与所述序列之间的同一性程度，该特征是通过在所述序列上将所述片段对齐，然后测定两者之间相同的单体数。
10

本发明的探针和引物选自：

(a)说明书所附序列列表中的鉴定的序列；

(b)序列(a)的任何片段，都具有至少 5 个邻接的单体，它们包含在序列(a)任
15 一中，具有显示与所述序列(a)至少 70%同一性的片段；例如，片段(b)含有 10 个核苷酸，其中 5 个邻接的核苷酸属于序列(a)，剩余的 5 个核苷酸中至少 2 个核苷酸分别与排列后参比序列中的两个对应核苷酸是相同的。

术语“鉴定序列”指如上所述的任何序列或任何片段，它们可用作检测和/或捕获探针。

20 表述“水相介质的处理”是指任何过滤和/或裂解和/或纯化步骤。

术语“裂解步骤”指能释放微生物的蛋白质和/或脂类包膜(例如影响随后反应的细胞碎片)中所含的核酸的步骤。例如可如申请人的专利申请所述使用裂解方法：

关于混合磁性和机械裂解的 WO-A-00/05338，

25 关于电裂解的 WO-A-99/53304 和

关于机械裂解的 WO-A-99/15321。

本领域技术人员可使用其它熟知的裂解方法，例如热或渗透休克，或用离液剂，例如胍盐化学裂解(US-A-5,234,809)。

术语“纯化步骤”指分离微生物的核酸和裂解步骤中释放的细胞组分。该步
30 骤一般可以浓缩核酸。例如，可以通过吸附或共价(就此，见专利 US-A-4,672,040

和 US-A-5,750,338)可任选用寡核苷酸包裹磁性颗粒, 然后通过洗涤步骤纯化与这些磁性颗粒结合的核酸。如果需要随后扩增所述核酸, 该核酸的纯化步骤特别有利。在申请人提交的专利申请, 申请号为: WO-A-97/45202 和 WO-A-99/35500 中描述了这些磁性颗粒的特别有利的实施例。

5 在这些专利申请中后者涉及热敏磁性颗粒, 各具有中间层覆盖的磁性核心。中间层本身覆盖有基于聚合物的外层, 该聚合物能与至少一种生物分子相互作用; 外层聚合物是热敏性的, 具有预定的 10-100°C 之间, 优选 20-60°C 之间的低临界溶液温度(LCST)。该外层是从阳离子单体合成的, 它产生能与核酸结合的聚合物。中间层分离核心的磁性电荷, 从而避免对扩增这些核酸的技术的抑制问题。

10 纯化核酸的另一种有利方法是使用二氧化硅, 不论是柱形式(例如 Qiagen 试剂盒)或惰性颗粒形式[R. Boom 等, J. Clin. Microbiol., 1990, No.28(3), p. 495-503]或磁性颗粒(Merck: MagPrep[®] Silica, Promega: MagneSil[™] 顺磁性颗粒)。其它非常广泛使用的方法基于柱(例如 Qiagen 试剂盒)或顺磁性颗粒形式(Whatman: DEAE-Magarose) 的离子交换树脂 [PR Levison 等, J. Chromatography, 1998, p. 337-344]。

15 其它与本发明非常相关的方法是吸附在金属氧化物载体上(Xtrana 公司: Xtra-Bind[™] 基质)。

术语“检测步骤”意味着通过物理方法的直接检测, 或用标记的检测方法。

对于检测核酸存在许多检测方法[见例如 Kricka 等, Clinical Chemistry, 1999, No. 45(4), p.453-458 或 G.H. Keller 等, DNA Probes, 第二版, Stockton Press, 1993, 5
20 和 6 部分, p.173-249]。

在本发明的第一个实施例中, 用与特定探针杂交的步骤作为检测步骤。该具体实施例包括将可扩增或不可扩增的要检测的微生物的核酸与结合在固相载体上的捕获探针接触, 该探针能与所述核酸特异性杂交; 然后根据已知方法, 特别是通过至少一种捕获探针, 揭示与固相载体结合的核酸的可能存在。

25 术语“标记”指能产生信号的示踪剂。这些示踪剂的非限制性名单包括例如通过比色、荧光或发光产生可检测的信号的酶, 例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; 发色团, 例如荧光、发光或染料化合物; 可通过电子显微镜或通过其电子性质, 例如导电率, 通过电流或电压测量法, 或通过阻抗测定检测电子稠密基团; 可通过光学方法, 例如衍射, 表面胞质基因
30 组共振或接触角变化, 或通过物理方法, 例如原子力分光光度、隧道效应等检测

基团；放射性分子例如 ^{32}P 、 ^{35}S 或 ^{125}I 。

第一，在酶扩增步骤过程中，例如可用扩增反应的标记的核苷三磷酸标记多核苷酸。标记的核苷酸在产生 DNA 的扩增系统(例如 PCR)中是脱氧核糖核苷，在产生 RNA 的扩增技术(例如 TMA 或 NASBA 技术)中是核糖核苷酸。

5 在扩增步骤后也可用例如，根据在文件 WO-A-91/19812 中所述的夹心杂交技术杂交标记的探针，来标记多核苷酸。

申请人的申请 FR-A-2 780 059 中描述了另一种标记核酸的特别优选的方法。另一种优选的检测方法使用聚合酶的 5'-3'核酸外切酶活性，如 P.M. Holland, PNAS (1991) p 7276-7280 中所述。

10 可使用信号扩增系统，如文件 WO-A-95/08000 中所述，就此，可以不需要初步的酶扩增反应。

术语“酶扩增”指用特定引物，通过至少一种酶的作用产生特定的核苷酸片段的多个拷贝的过程。因此，为了扩增核酸，还存在下列技术：

15 -PCR (聚合酶链式反应)如专利 US-A-4, 683, 195, US-A-4, 683, 202 和 US-A-4, 800, 159 所述，

-LCR (连接酶链式反应)例如专利申请 EP-A-0 201 184 中报道的，

-RCR (修复链式反应)如专利申请 WO-A-90/01069 中所述，

-3SR (自动维持序列复制)专利申请 WO-A-90/06995，

-NASBA(基于核酸序列的扩增)专利申请 WO-A-91/02818 等，

20 -TMA(转录介导的扩增)专利 US-A-5, 399, 491。

术语“扩增子”用于称酶扩增技术产生的多核苷酸。

本文所用的术语“固相载体”包括所有核酸可固定的材料。可用任选的化学修饰的合成材料或天然材料作为固相载体，特别是多糖，例如基于纤维素，例如纸，纤维素衍生物，例如乙酸纤维素和硝基纤维素或葡聚糖的材料；特别是基于
25 苯乙烯型的单体的聚合物、共聚物，天然纤维(例如棉)和合成纤维(例如尼龙)；无机材料，例如二氧化硅、石英、玻璃、陶瓷；胶乳；磁性颗粒；金属衍生物、凝胶等。固相载体可以是微量滴定板形式，如申请 WO-A-94/12670 中所述的膜，颗粒或生物芯片。

30 术语“生物芯片”是指尺寸小的固相载体，在其上的预定位置连接有多个捕获探针。

为了说明起见, 提供了这些生物芯片的例子, 例如出版物[G. Ramsay, Nature Biotechnology, 1998, No.16, p. 40-44 ; F. Ginot, Human Mutation, 1997, No.10, p.1-10 ; J. Cheng 等, Molecular diagnosis, 1996, No.1(3), p.183-200 ; T. Livache 等, Nucleic Acids Research, 1994, No. 22(15), p. 2915-2921 ; J. Cheng 等, Nature Biotechnology, 1998, No. 16, p. 541-546] 或专利 US-A-4,981,783、US-A-5,700,637、US-A-5,445,934、US-A-5,744,305 和 US-A-5,807,522。

固相载体的主要特征应该是, 保留捕获探针与核酸杂交的特征, 同时对于检测方法产生最小的背景噪声。生物芯片的优点是它们简化了使用许多捕获探针, 从而使得多重检测要检测的微生物, 同时考虑要检测的所述微生物的多形性。

10 下文描述的发明可以相等的解决先前所述的方法所提出的有关灵敏度、特异性和多重检测的能力问题, 同时迅速和方便的实施。

本发明的第一个方面是一种控制倾向于含有各种微生物的水相环境介质的微生物质量的方法, 包括下列步骤:

- 选择参照组, 由至少三种微生物组成, 共同或分别代表微生物质量水平,
- 15 -提供微生物学检测试剂盒, 含有至少三种鉴定性探针, 它们分别特异性鉴定所述的三种微生物;
- 在处理要分析的介质后, 使所述微生物或任何从要分析的介质得到的组分与所述检测试剂盒接触, 从而能对所述微生物进行多重检测,
- 该检测代表介质的微生物质量水平。

20 本发明还涉及一种微生物学检测试剂盒, 它含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物, 所述每一种鉴定性探针对于倾向于在要试验的液体样品中存在的一种细菌、病毒或寄生虫, 或至少属是特异性的。

根据本发明, 试剂盒指实施一种分析方法的任何手工、半自动化或自动化方法, 术语“分析”意味着鉴定和/或测定存活率和/或定量, 这三种参数分别依次
25 或根据该组合检测: 单独鉴定、鉴定和定量; 鉴定和存活率; 鉴定、定量和存活率。

本发明还涉及一种多重检测的方法, 该方法具体使用生物芯片技术, 来检测大量微生物学参数, 包括各种法律所要求的污染指标(美国、法国、欧洲)和病原性微生物, 包括细菌、病毒和寄生虫。

30 在一个实施例中, 可迅速的在例如, 约 4 小时中, 并利用酶扩增步骤, 以高

灵敏度，例如在 10^{-6} 目标微生物/10L-100L 数量级对样品进行完整的微生物分析。

此多重检测的方法对于利用序列搜索的物种是特异性的，称为作为探针鉴定各物种的序列，并可以通过检测存活标记，例如 rRNA 和/或 mRNA 检测微生物的存活率。

- 5 该多重检测的快速性、灵敏性和特异性使其可以相等的用于任何水环境介质，例如任何水相介质，除了任何体液。特别是，该方法用于人类要消费的任何水、工业清洁水、城市和工业残余水、农业食品工业的水和加工的水，和任何液体或产物。

10 这种在一步中对多种特异性扩增产物的同时检测可以通过使用固相载体，特别是尺寸小的固相载体形式，该载体上的预定位点连接有多种捕获探针，或“生物芯片”，这些捕获探针由要搜索的微生物的完整特异性核苷酸序列，称为鉴定性序列的组或其片段组成。

15 这些鉴定性序列或这些片段还可以用于任何已知杂交技术，例如 DOT-BLOT 技术[Maniatis 等, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1982], SOUTHERN 印迹技术[E. M. Southern, J. Mol. Biol., 1975, 98, 503], NORTHERN 印迹技术, 或夹心法技术[A.R. Dunn 等, Cell, 1977, 12, 23]。

在检索的微生物中，提到了例如下列微生物：

20 大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、耐久肠球菌(*Enterococcus durans*)、小肠肠球菌(*Enterococcus hirae*)、牛链球菌(*Streptococcus bovis*)、马链球菌(*Streptococcus equinus*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermatitis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠弯曲杆菌(*Campylobacter coli*)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)、嗜麦芽糖寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、猿分枝杆菌(*Mycobacterium simiae*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、蟾分枝杆菌

25

30

(*Mycobacterium xenopi*)、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、戈登分枝杆菌(*Mycobacterium goodii*)、军团菌属、侵肺军团菌、沙门氏菌属。

在病毒中，特别是腺病毒中，腺病毒 40 和腺病毒 41a；

星状病毒，HastV-1-2；

- 5 肠病毒，例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒或埃可病毒，
轮状病毒，
杯状病毒，例如诺伏克(Norwalk)病毒，札幌(Sapporo)病毒，
和肝炎病毒，例如甲肝病毒，

在寄生虫中：

- 10 隐孢子虫属，例如短小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)、贾第虫属，例如吸吮贾第虫和微孢子目。

可通过流行病学在所属的属水平，或在更低的分类学水平，例如种水平，或在血清型和亚型水平搜索的微生物：例如对于军团菌，测定可通过检测序列 SEQ ID NO:9 在属水平搜索，对于侵肺军团菌，用 SEQ ID NO:10 或 11，对其特异性的鉴定

- 15 定性序列进行测定。

生物芯片上产生的序列，称为对应于要搜索的物种的鉴定性序列，选自附录所附的序列表 SEQ ID NO:1-104。

下文列出了实施本发明方法的变化。

- 20 接触水相介质的微生物的微生物检测试剂盒有利地对应于任何一种下列的代
表例：

它所含的三种鉴定性探针具有至少一种选自 SEQ ID NO:1-104 任一序列或其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

- 25 它含有至少一种对于细菌特异性的鉴定性探针，至少一种对于寄生虫特异性的鉴定性探针和至少一种对于病毒特异性的鉴定性探针；优选它含有至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39, SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；和
- 30

至少一种序列，选自 SEQ ID NO:50-60 和 SEQ ID NO:70-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

5 它含有至少四种鉴定性探针，它们对于至少 4 种不同细菌具有特异性；优选它们选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

10 它含有至少 5 种鉴定性探针，它们对于至少 5 种不同病毒具有特异性，优选它们选自 SEQ ID NO:50-60 和 SEQ ID NO:70-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

15 微生物检测试剂盒含有至少 2 种鉴定性探针，它们对于至少 2 种寄生虫具有特异性；优选它们选自 SEQ ID NO:40-49 和 SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

20 微生物检测试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，对于至少 1 种细菌具有特异性，和至少 1 种鉴定性探针，对于至少 1 种寄生虫具有特异性。优选它含有至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:67-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列，和至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

25 所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列细菌：大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌。优选试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:9：66[原文如此]、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

30 所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列细菌：大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌。优选所述试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ

ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

5 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、隐孢子虫属。优选所述试剂盒的至少一种探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

10 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、吸吮贾第虫、短小隐孢子虫。优选所述试剂盒的至少一种探针选自 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:46-49、SEQ ID NO:63、SEQ ID NO:64 和 SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

15 所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、肠病毒、隐孢子虫属。优选，所述试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

20 所述微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪肠球菌、尿肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫。优选，所述试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:61-75 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

25 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪肠球菌、尿肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠

链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒。优选，试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-51、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:56-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70% 同一性的序列。

10 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒，分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鲍氏不动杆菌、表皮葡萄球菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、星状病毒。优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:1-6、SEQ ID NO:9-55、SEQ ID NO:56-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70% 同一性的序列。

25 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列细菌：大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、幽门螺杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠弯曲杆菌、空肠弯曲杆菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌、铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、鲍氏不动杆菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、军团菌属、侵肺军团菌、沙门氏菌属。

30 微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列病毒：

腺病毒，例如腺病毒 40 和腺病毒 41a；

星状病毒，HastV-1-2；

肠病毒，例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒或埃可病毒，

轮状病毒，

5 杯状病毒，例如诺伏克病毒，札幌病毒，和

和肝炎病毒，例如甲肝病毒。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列寄生虫：

隐孢子虫属，例如短小隐孢子虫、贾第虫属，例如吸吮贾第虫和微孢子目。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、大肠杆菌血清
10 型 0157:H7、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠
链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病
毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸
吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞
菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒。优选，检测试剂盒的至少一种鉴
15 定性探针选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID
NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-51、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID
NO:56-75、SEQ ID NO:97 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至
少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列微生物：大肠杆菌、粪肠球菌、屎
20 肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙
门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃
可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺
军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯
曲杆菌，甲肝病毒。优选，试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ
25 ID NO:9-11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID
NO:40-51、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:56-68、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:97
及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与
所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列细菌：

30 大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆

菌属、军团菌属、侵肺军团菌、金黄色葡萄球菌。优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，
5 并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列病毒：

甲肝病毒、肠病毒和选自诺伏克病毒和轮状病毒的至少一种病毒。优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-96、SEQ ID NO:98-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。
10

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列病毒：

甲肝病毒、肠病毒和选自杯状病毒和轮状病毒的至少一种病毒。优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:56-58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:76-96 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。
15

微生物检测试剂盒的所述微生物选自下列寄生虫：

隐孢子虫属，短小隐孢子虫、贾第虫属，吸吮贾第虫。优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。
20

微生物检测试剂盒的所述微生物选自：

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆菌属、军团菌属、侵肺军团菌、金黄色葡萄球菌、甲肝病毒、肠病毒和选自杯状病毒和轮状病毒、隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属、吸吮贾第虫；优选，检测试剂盒的至少一种鉴定性探针选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60-97、SEQ ID NO:70-96、
25
30 SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所

述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体,并与所述任何序列具有显示至少 70% 同一性的序列, 或

大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、沙门氏菌属、铜绿假单胞菌、分枝杆菌属、军团菌属、侵肺军团菌、金黄色葡萄球菌, 甲肝病毒、肠病毒和选自杯状病毒和轮状病毒的至少一种病毒, 隐孢子虫属, 短小隐孢子虫、贾第虫属, 吸吮贾第虫; 优选, 检测试剂盒的至少一种鉴定性探针[脱漏]选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:9-11、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:56-58、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:76-96、SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段, 该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体, 并与所述任何序列具有显示至少 70% 同一性的序列。

微生物检测试剂盒的所述微生物选自诺伏克病毒、甲肝病毒、肠病毒。优选, 至少一种鉴定性探针[脱漏]选自 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75。

捕获探针有利的含有至少 10、优选至少 13、或事实上至少 15, 甚至至少 17 个碱基和/或最多 35, 优选最多 25, 或事实上最多 20 个碱基。例如, 捕获探针含有 10-35 个碱基, 有利的 17-20 个碱基, 在已知序列的中央区内具有至少一个查询位置, 位于序列 3'端的第 12 位。对于大肠杆菌和粪肠球菌, 优选 17 个碱基的捕获探针, 在 10 位和 8 位具有两个查询位点。这些捕获探针长 10-25 个核苷酸, 视情况而定。查询位点随着捕获探针长度的改变而改变。

通过计算机筛选技术选择特异性序列, 称为鉴定性序列, 它们对于一物种和/或一个属的成员具有充分的特异性, 使其能够分辨分类学上相近的属和/或同一属中的物种, 并避免交叉杂交现象。

在本发明的一个实施例中, 微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物, 含有至少 4 种对至少 4 种不同细菌特异性的鉴定性探针。

在本发明的另一个实施例中, 微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物, 含有至少 5 种对至少 5 种不同病毒特异性的鉴定性探针。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，含有至少 2 种对寄生虫特异性的鉴定性探针。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，含有至少 1 种对细菌特异性的探针和至少一种对
5 寄生虫特异性的鉴定性探针。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中对细菌特异性的探针选自对下列细菌特异性的探针：

大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色链球菌。

10 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中对细菌特异性的探针选自对下列细菌特异性的探针：

大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色链球菌、产气荚膜梭菌。

15 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中对细菌特异性的探针选自对下列细菌特异性的探针：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌。

20 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中对细菌特异性的探针选自对下列细菌特异性的探针：

25 大肠杆菌、大肠杆菌血清型 0157:H7、幽门螺杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠弯曲杆菌、空肠弯曲杆菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌、铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、鲍氏不动杆菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、军团菌属、侵肺军团菌、沙门氏菌属。

30 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色链球菌、产气荚膜梭菌。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

沙门氏菌属、金黄色链球菌、吸吮贾第虫、短小隐孢子虫。

- 5 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色链球菌、肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B，埃可病毒，隐孢子虫属、短小隐孢子虫、吸吮贾第虫。

- 10 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色链球菌、肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B，埃可病毒，隐孢子虫属、短小隐孢子虫、吸吮贾第虫、

- 15 军团菌属，侵肺军团菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

- 20 大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒，铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鲍氏不动杆菌、表皮葡萄球菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、星状病毒。
- 25

- 30 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，选自下列微生物：

大肠杆菌、肠病毒、隐孢子虫属。

在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中病毒的特异性鉴定性探针对下列病毒特异性：

腺病毒，例如腺病毒 40 和腺病毒 41a；

5 星状病毒，HastV-1-2；

肠病毒，例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒或埃可病毒，

轮状病毒，

杯状病毒，例如诺伏克病毒，札幌病毒，和

和肝炎病毒，例如甲肝病毒。

10 在本发明的另一个实施例中，微生物学检测试剂盒含有细菌和/或病毒和/或寄生虫的鉴定性探针的混合物，其中寄生虫的特异性鉴定性探针对下列寄生虫特异性：

隐孢子虫属，例如短小隐孢子虫、贾第虫属，例如吸吮贾第虫和微孢子目。

15 根据本发明，在一个实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示
20 至少 70%同一性的序列；至少一种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:50-60、SEQ ID NO:70-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列；

25 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 4 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

30 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 5 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:50-60、SEQ ID NO:70-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

- 5 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-39、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列，和至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:63-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

- 15 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列，

- 20 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

- 25 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列，

- 30 根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:70-75、SEQ ID NO:40-44 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个

邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、SEQ ID NO:40-49、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:61-75
5 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种鉴定性探针，选自 SEQ ID NO:1-4、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:14-20、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25-29、
10 SEQ ID NO:40-51、SEQ ID NO:53-55、SEQ ID NO:56-59、SEQ ID NO:60-65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种序列，选自 SEQ ID NO:1-6、SEQ ID NO:9-22、和 SEQ ID
15 NO:23-55、SEQ ID NO:56-104 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种序列，选自 SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66-69、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:30、SEQ ID
20 NO:9-11、SEQ ID NO:23 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种序列，选自 SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:97、SEQ ID NO:70-75
25 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种序列，选自 SEQ ID NO:98-104、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:98、SEQ ID NO:56-58、SEQ ID NO:76-96 及其任何片段，该片段具有所述序
30 列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

根据本发明，在一个不同的实施例中，微生物学检测存在于样品中的微生物的试剂盒含有至少 1 种序列，选自 SEQ ID NO:40-45、SEQ ID NO:65 及其任何片段，该片段具有所述序列的任一所包含的至少 5 个邻接的单体，并与所述任何序列具有显示至少 70%同一性的序列。

- 5 本发明的这些核苷酸片段，称为鉴定性序列，使其可以选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，
10 吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒，铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鲍氏不动杆菌、表皮葡萄球菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德
15 氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、星状病毒。

腺病毒，例如腺病毒 40 和腺病毒 41a；

星状病毒，HastV-1-2；

肠病毒，例如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒或埃可病毒，

轮状病毒，

- 20 杯状病毒，例如诺伏克病毒，札幌病毒，和

和肝炎病毒，例如甲肝病毒，

隐孢子虫属，例如短小隐孢子虫、贾第虫属，例如吸吮贾第虫和微孢子目。

在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

- 25 大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌。

在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌。

- 30 在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌、隐孢子虫属。

在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、肠病毒和隐孢子虫属。

5 在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，

10 吸吮贾第虫。

在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，

15 吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒。

在另一个实施例中，本发明的所述鉴定性序列能够选择性测定至少 2 种其它微生物存在下的一种微生物，这些微生物选自下列微生物：

20

大肠杆菌、粪肠球菌、屎肠球菌、耐久肠球菌、小肠肠球菌、牛链球菌、马肠链球菌、产气荚膜梭菌、沙门氏菌属、金黄色葡萄球菌，肠病毒：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 和 B、埃可病毒，隐孢子虫属，短小隐孢子虫，贾第虫属，吸吮贾第虫，军团菌属，侵肺军团菌，嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌、温和气单胞菌，大肠弯曲杆菌，空肠弯曲杆菌，甲肝病毒，杯状病毒：诺伏克和札幌病毒，腺病毒、轮状病毒，铜绿假单胞菌、霍乱弧菌、分枝杆菌属、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、猿分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、蟾分枝杆菌、海分枝杆菌、戈登分枝杆菌、鲍氏不动杆菌、表皮葡萄球菌、唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、嗜麦芽糖寡养单胞菌、星状病毒。

25

30 还可设计和使用根据本发明微生物测定的试剂盒，含有在血清型和亚型水

平，通过流行病学鉴定微生物的鉴定子序列。

本发明分析倾向于含有至少一种细菌、寄生虫和/或病毒的样品的方法，使用核苷酸序列混合物作为对倾向于在样品中存在的细菌、病毒和/或寄生虫血清型、亚型、物种或至少一个属特异性的鉴定性探针。

5 该根据本发明分析样品的方法的特征是一个检测步骤，包括使用上述微生物学检测试剂盒。

在一个优选实施例中，在检测步骤前进行至少一个裂解步骤。

在另一个实施例中，在该裂解步骤后，进行扩增步骤。

10 本发明还涉及一种控制液体样品的方法，其中在任何检测步骤前，进行富集所述样品中微生物的步骤。

该富集步骤可通过过滤，特别是用含有空心纤维的过滤装置进行，并以前沿(frontal)模式使用，使其可能在一段有限的时间内，从具有大的和预定体积的起始液体样品获得具有足够小的体积的要分析的样品，同时保证微生物的存活，从而进行分析技术，特别是本发明的多重检测。

15 该过滤装置基于以前沿模式在空心纤维上进行的超滤技术。

与“切向模式”相反的术语“前沿模式”意味着起始液体样品的任何非循环通道通过过滤装置，所述过滤装置入口处至少部分相同样品没有循环。

以前沿模式使用该过滤装置使其可能获得具有小体积的浓缩液，在最多 1 小时内一次通过样品浓缩，同时保证微生物的存活，多回收，产率为 100%数量级。

20 术语“多回收”意味着在最终样品中可能回收几乎所有存在于起始样品中的微生物的不同属或物种。

这些高产率是由于不存在体积，称为死体积获得的，例如由于在其它装置上存在辅助管线，例如用于再循环，和通过空心纤维整个长度上的孔隙度的可靠性。

25 本发明控制的方法用于可任选的通过过滤获得的，具有在 1ml-100L 之间的体积的样品。

通过机械裂解或化学裂解如上所述进行微生物裂解步骤。

可任选的与磁性颗粒结合的寡核苷酸捕获技术，或用二氧化硅柱、二氧化硅颗粒(惰性或磁性)、离子交换柱或任何其它上述方法，任选进行纯化步骤。

30 可任选的进行酶扩增步骤，也优选使用转录技术，例如 TMA、NASBA，但特别是使用 PCR 和 RT-PCR 技术。

优选用荧光标记用于扩增子标记步骤。

然后优选与固相载体结合的特异性鉴定的探针或其片段，特别是用生物芯片用于杂交步骤。

使用这些特异性序列的根据本发明控制的方法和微生物检测的试剂盒能够从
5 一个预定组中，在一个最终多重检测步骤中同时检测细菌和/或微生物和/或寄生
虫。

微生物预定组可容易的定义为要分析的液体的函数。

本发明的另一个主题是一种生产和/或消毒液体的方法，特征是它包括步骤：
用权利要求 35-48 任一所述的微生物学检测试剂盒分析，产生翻译数据的算法，
10 使所述生产和/或消毒方法由微生物检测试剂盒产生的所述数据伺服控制。

非限制性实施例和附图说明了本发明的优点和技术。

图 1 代表对于大肠杆菌和鲍氏不动杆菌具有特异性的探针的基数调用(base-
call)，它是在扩增前加入的各配偶体的 rRNA 拷贝数的函数。

图中的方框区域表示大肠杆菌/鲍氏不动杆菌比例，其中大肠杆菌目标可被芯
15 片翻译。

图 2 代表对于大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌(*S. typhimurium*)和鲍氏不动杆菌具
有特异性的探针的基数调用，它是代表 3 个物种的标记的转录物拷贝数的比例的
函数。

在下述实施例中，所用的菌株是：

20 大肠杆菌 ATCC11775

粪肠球菌 19433T

鼠伤寒沙门氏菌 API 9810059

鲍氏不动杆菌 ATCC 19606

实施例 1：培养物中一个细菌细胞的检测和鉴定：就大肠杆菌(革兰氏阴性)
25 和粪肠球菌(革兰氏阳性)而论

a)培养物的制备

大肠杆菌或粪肠球菌的菌株在 37°C，在 2ml Luria Bertani 肉汤中培养。当培
养物达到 0.2 的 620 纳米光密度时，取出 1 毫升(10^8 细菌/毫升)。制备系列稀释物，
直到获得 0.1 细胞/微升。

30 b)核酸的抽提和纯化

1.微生物的裂解

从 0.1 细胞/微升悬液中取出 10 微升(1 细胞)。在该悬液中加入 100 微升裂解缓冲液, 其含有 10mM Tris、1mM EDTA(用 SIGMA, 商品号 T-9285 出售的 100 ×TE 溶液稀释)和溶菌酶(Sigma,商品号 L-6876), 其浓度视细菌的革兰氏性质不同: 对于粪肠球菌为 3mg/ml, 对于大肠杆菌为 400μg/ml。通过使含有细菌悬液的试管与裂解缓冲液在环境温度下接触 5-10 分钟, 裂解细菌。

2.核酸的提取和纯化

用 Qiagen(商品号 74104)出售的 Rneasy 小试剂盒, 根据推荐的细菌总 RNA 提取和纯化的方案进行该步骤。

10 c)RT-PCR

RT 和 PCR 的两个步骤在一个试管中用 ACCESS 试剂盒(商品号 A1250, Promega)一个接一个进行。

就此, 在 25 微升总 RNA 悬液中加入 5× AMV/Tfl 缓冲液、1mM MgSO₄、200μM dNTPs(脱氧核糖核苷酸三磷酸)、5U AMV RT 聚合酶、5U Tfl 聚合酶、5U RNAsin(Pramega, 商品号 NZIII)、0.5μM 真细菌引物 A1.1 和 S9T7:

5'gaggcagcagtgagggaat3' 5'taatacgactcactatagggaggaggattactaccagggtatctaata3' (黑体: T7 聚合酶启动子)

以获得 50 微升最终反应体积。

对于 RT 步骤, 混合物在 48°C 培养 45 分钟, 然后 94°C 5 分钟。对于 PCR 步骤, 然后进行 35 轮循环, 各由下列 3 个步骤组成: 94°C 1 分钟; 55°C 1 分钟; 68°C 1 分钟。然后进行 68°C 7 分钟的最终延伸。

d)扩增的证实

将 5 微升扩增产物(扩增子)加到 1.5%琼脂糖凝胶的 EDTA Tris 硼酸盐中。在 200V 迁移 20 分钟后, 用溴乙锭染色和紫外照射使扩增条带可见。具有预期大小(450bp)的条带存在显示扩增是阳性的。

e)在 DNA 芯片(Affymetrix, Santa Clara)上鉴定扩增子

根据美国专利 5 744 305(Affymetrix, Fodor 等), 用 WO 95/11995(Affymax, Chee 等)申请中所述采用重新测序方法, 和根据 A. Troesch 等于 J. Clin. Microbiol., 卷 37(1), p49-55, 1999 所述的方法, 在用玻璃制备的固相载体上合成生物芯片, 除了下列变化: 在芯片上合成的寡核苷酸进行鉴定性序列的重新测序。该方法可

能减少合成的寡核苷酸总数，所以在生产成本上具有可观的优点，而且对于根据这些鉴定性序列的选择对各种微生物鉴定的质量没有任何损害。寡核苷酸含有 20 个碱基，在 3'末端序列的 12 位具有一个查询位点。对于大肠杆菌和粪肠球菌，是 17 个碱基的寡核苷酸，在 10 位和 8 位具有两个查询位点。其它寡核苷酸长 10-25 5 个核苷酸。查询位点随着寡核苷酸长度的改变而改变。

分析在完整 GeneChip®系统(产品号 900228, Affymetrix, Santa Clara, CA)上进行，它包含 GeneAssay®阅读机，GeneChip®杂交锅，GeneChip®液体站和 GeneChip®分析软件。

1. 扩增子的转录和标记

10 由于反义引物 S9T7，所有扩增产物具有 T7 RNA 聚合酶启动子。这些扩增子然后用作转录反应的基质，在此过程中掺入荧光核糖核苷酸。

从 50 微升阳性扩增产物中取出等份(2-20 微升)，加入含有 Ambion(产品号 1334)的 Megascript T7 试剂盒的成分和荧光素-12-UTP(Roche, 产品号 1427857)的转录混合物中。制备的最终反应混合物为 20 微升，转录反应在 37°C 进行 2 小时。

15 2. 标记的转录物的片段化

为了改善杂交条件，将标记的转录物切割成约 20 个核苷酸的片段。对此，20 微升标记的转录物在 30mM 咪唑(SIGMA)和 30mM 氯化镁(Merck)中 65°C 反应 30 分钟。

3. 在调查芯片上杂交

20 从 20 微升标记的和片段化的转录物中取出 5 微升等份，加到 700 微升杂交缓冲液中，该缓冲液含有 6×SSPE(Eurobio)、5mM DTAB(Sigma)、0.5%Triton(Merck eurolab)。该混合物在芯片上在下列条件下杂交：45°C 40 分钟。洗涤后，扫描芯片，然后用 Genechip©软件(Affymetrix, Santa Clara)分析获得的杂交图像。杂交点可以重建扩增子的序列，然后将其与芯片的参照序列比较。选择显示与扩增子 25 序列最佳同源性百分数(基数调用，%)的序列(和对应于它的物种)用于鉴定。

4. 结果的解释

仅分析了 450 碱基的序列的一部分。它对应于生物芯片上显示的全部和部分鉴定性探针。解释阈值，即鉴定水平定为对于鉴定性序列至少 70%基数调用。在该阈值以下，不鉴定该目标。

30 结果

从一个细菌细胞(大肠杆菌或粪肠球菌)提取的 RNA 产生扩增产物, 然后在生物芯片上正确鉴定。

实施例 2: 2 种不同细菌物种的混合物的区分

在该实施例中, 真细菌 RT-PCR 用于合成性目标; 即这些目标是由扩增, 然后由 16S 核糖体 DNA 完整转录产生的。这些目标称为体外转录物。在该实施例中, 目标是代表大肠杆菌和鲍氏不动杆菌的体外转录物的混合物。当目标被加到 RT-PCR 试管中, 推理不是由于细菌数, 而是由于体外转录物的拷贝数, 然后是细菌等价物的数量, 从下列前提开始: 1 细菌对应于 16S 核糖体 RNA 的 10^4 拷贝。

对此, 转录物的滴度是 10^{11} 拷贝/微升。对于鲍氏不动杆菌, 制备 10^8 拷贝/微升。对于大肠杆菌, 制备的稀释度是 10^3 /微升、 10^4 /微升、 10^5 /微升和 10^6 /微升。RT-PCR 反应混合物的条件与实施例 1, c)段所述的相同, 除了目标体积不再是 25 微升总 RNA 悬液, 而是 2 微升混合物, 由 1 微升代表各物种的转录物稀释物以下列比例组成:

大肠杆菌/鲍氏不动杆菌等价物	0/0	$0.1/10^4$	$1/10^4$	$10/10^4$	$10^2/10^4$	$10^4/0$	$10^4/0$
大肠杆菌转录物的拷贝	0	10^3	10^4	10^5	10^6	10^8	10^8
鲍氏不动杆菌转录物的拷贝	0	10^8	10^8	10^8	10^8	0	0

然后根据实施例 1 步骤 e)处理获得的单个扩增子。

结果

图 1 显示通过使 16S rRNA 的拷贝数与细菌数相关联, 可以用 DNA 芯片检测在 10^4 鲍氏不动杆菌存在下的 1 个大肠杆菌等价物, 即比例为 0.01%。

实施例 3: 3 个不同细菌物种的混合物的分化

根据实施例 1 的 e)方法获得 3 种细菌物种(大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、鲍氏不动杆菌)的标记转录物。然后用 Rneasy 小试剂盒(Qiagen, 商品号 74104)根据适合体外转录物纯化的方法纯化。滴定标记的转录物(在分光光度计上 260nm 处阅读), 从而确定引入杂交混合物的靶(或拷贝)数。杂交混合物中的拷贝总数定为 10^{13} 拷贝。

对应于大肠杆菌的转录物拷贝数与对应于鼠伤寒沙门氏菌的转录物拷贝数相同。相对于鲍氏不动杆菌转录物以下列方式加入这些转录物:

大肠杆菌-鼠伤寒沙门氏菌/鲍氏不动杆菌的比例	0.01%	0.1%	1%	10%	20%	50%
------------------------	-------	------	----	-----	-----	-----

大肠杆菌转录物的拷贝数	5.10 ⁸	5.10 ⁹	5.10 ¹⁰	5.10 ¹¹	10 ¹²	2.5.10 ¹²
鼠伤寒沙门氏菌转录物的拷贝数	5.10 ⁸	5.10 ⁹	5.10 ¹⁰	5.10 ¹¹	10 ¹²	2.5.10 ¹²
鲍氏不动杆菌转录物的拷贝数	10 ¹³	10 ¹³	10 ¹³	10 ¹³	8.10 ¹²	5.10 ¹²

结果

图 2 显示大肠杆菌检测发生的比例(1%)比鼠伤寒沙门氏菌(10%)发生的比例要低。该结果显示它可以在芯片上检测 3 种不同的细菌物种。

5 实施例 4: 同时检测大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*)

a)细菌悬液的制备

测试的菌株:

大肠杆菌 ATCC 11775T

金黄色葡萄球菌 ATCC 12600T

10 肠炎沙门氏菌 ATCC 13076

菌株在胰蛋白酶大豆液体培养基中 37°C 培养。当培养物达到 0.2-0.3 的光密度(10⁸ 细菌/毫升)时, 制备 10-倍系列稀释物, 直到获得 100 细菌/毫升。

b)细菌的混合

15 用在 a)部分中产生的悬液混合 3 种细菌, 致使具有 100 大肠杆菌、100 金黄色葡萄球菌和 100 肠炎沙门氏菌。

c)获得总 RNA

1.微生物的裂解

20 最终体积是 100 微升。加入 1 微升 100×TE 缓冲液(Sigma 商品号 T-9285), 100mg/ml 溶菌酶(Sigma,商品号 L-6876), 具有最终浓度为 10mg/ml。然后可以用水补满体积(Sigma, 商品号 W-4502), 达到 100 微升。25°C 保温 30 分钟。

2.核酸的纯化

然后使用 Qiagen(商品号 74104)的 Rneasy 小试剂盒, 用 Qiagen 对于细菌推荐的方法。

d)RT-PCR

25 RT-PCR 用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)根据实施例 1, c)部分说明的方法进行。

e)扩增的证实

根据实施例 1, d)部分所述的方法。

f)在生物芯片上的分析

1. 扩增子的转录和标记

根据实施例 1, e)-1 部分所述的方法。

2. 标记的转录物的片段化

5 根据实施例 1, e)-2 部分所述的方法。

3. 在芯片上杂交

根据实施例 1, e)-3 部分中所述的方法。

4. 结果的解释

对应于各分类单位的鉴定性序列的基数调用必须大于 90%。在这以下, 不能

10 鉴定目标。

结果

测试的物种	对应的鉴定性序列上的基数调用
大肠杆菌	100%
金黄色葡萄球菌	100%
肠炎沙门氏菌	100%

结论

获得通过在相应的鉴定性序列上杂交同时检测 3 种细菌。

实施例 5: 大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肠炎沙门氏菌和铜绿假单胞菌的同

15 时检测

a) 细菌悬液的制备

测试的菌株:

大肠杆菌 ATCC 11775T

金黄色葡萄球菌 ATCC 12600T

20 肠炎沙门氏菌 ATCC 13076

铜绿假单胞菌 ATCC 10145T

根据实施例 4, a) 部分中所述的方法制备细菌悬液。

b) 细菌的混合

用部分 a) 中产生的悬液混合 4 种细菌, 致使具有: 100 大肠杆菌、100 金黄

25 色葡萄球菌、100 肠炎沙门氏菌和 100 铜绿假单胞菌。

c) 获得总 RNA

根据实施例 4, c) 部分所述的方法。

d) RT-PCR

RT-PCR 用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)根据实施例 1, c)部分说明的方法进行。

e)扩增的证实

5 根据实施例 1,d)部分所述的方法。

1.扩增子的转录和标记

f)在生物芯片上的分析

根据实施例 1, e)-1 部分中所述的方法。

2.标记的转录物的片段化

10 根据实施例 1, e)-2 部分所述的方法。

3.在芯片上杂交

根据实施例 1, e)-3 部分中所述的方法。

4.结果的解释

15 对应于各分类单位的鉴定性序列的基数调用必须大于 90%。在这以下, 不能鉴定目标。

结果

测试的物种	对应的鉴定性序列上的基数调用
大肠杆菌	100%
金黄色链球菌	91.9%
肠炎沙门氏菌	100%
铜绿假单胞菌	100%

结论

获得通过在相应的鉴定性序列上杂交同时检测 4 种细菌。

实施例 6 大肠杆菌、短小隐孢子虫和脊髓灰质炎病毒 Sabin3 的同时检测

20 a)悬液的制备

对于大肠杆菌, 如实施例 4, a)中所述制备稀释物。

对于短小隐孢子虫, 从 Waterborne,Inc.(St. Louis,USA)出售的滴度为 10^7 /ml 的卵囊悬液制备系列稀释物。

对于脊髓灰质炎病毒 Sabin3, 使用具有 10^9 PFU/ml 滴度的悬液。

25 b)微生物的混合

混合 3000 大肠杆菌、3000 短小隐孢子虫和 3000cfu 的脊髓灰质炎病毒, 获

得最终体积为 300 微升。

c)核酸的制备

300 微升制备成 3×100 微升，因为 RNA 的提取和纯化经过 3 种独立的过程。

1.大肠杆菌

5 根据实施例 4，c)部分所述的方法制备总 RNA。

2. 短小隐孢子虫

根据修改的方法使用 RNeasy 小试剂盒(Qiagen, 商品号 74104)。对此，在 100 微升中加入来自 RNeasy 试剂盒的 350 微升 RLT 裂解缓冲液、25 微升 19mg/ml 的蛋白酶 K(Roche, 商品号 1964372)，它减少到 1mg/ml。在 65℃反应 30 分钟。

10 然后根据细菌的 RNeasy 小试剂盒方法继续该步骤。

3.对于脊髓灰质炎病毒 Sabin3

在 100 微升中加入 40 微升水(Sigma, 商品号 W-4502)，根据厂商说明书使用 Qiang 病毒 RNA 小试剂盒(Qiagen, 商品号 52906)。

d)RT-PCR 扩增

15 1.大肠杆菌

用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)根据实施例 1，c)部分所述的方法进行 RT-PCR。

2. 短小隐孢子虫

用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)进行 RT-PCR。

20 对此，在步骤 b)2 中获得的 25 微升总 RNA 中加入 25 微升反应混合物，使最终体积 50 微升中含有：1×AMV/Tfl 缓冲液，2.5mM MgSO₄、200μM dNTP、5U Tfl、5U AMV、5U RNAsin(Promega, 商品号 N2111)和 200pM 引物 XIA2F 和 XIA2R。

XIA2F 5' GGAAGGGTTGTATTATTAGATAAAG 3'

25 XIA2R-T7 5'

taatacgactcactataggaggaggattaAAGGAGTAAGGAACAACCTCCA 3'

根据 Xiao 等, Applied and Environmental Microbiology, 1999 的出版物。

(黑体: T7 聚合酶的 T7 启动子, 用于转录)。

30 对于 RT 步骤, 混合物 48℃保温 45 分钟。对于 PCR 步骤, 在 94℃保温 5 分钟, 然后进行 30 轮循环, 各由下列 3 个步骤组成: 94℃45 分钟; 55℃45 秒钟; 68℃1 分钟。然后进行 68℃ 7 分钟的最终延伸。

3. 脊髓灰质炎病毒 Sabin3

用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)进行 RT-PCR。

对此, 在步骤 b)2 中获得的 25 微升总 RNA 中加入 25 微升反应混合物, 使最终体积 50 微升中含有: 1×AMV/Tfl 缓冲液, 2mM MgSO₄、300μM dNTP、5U Tfl、5U AMV、5U RNAsin(Promega, 商品号 N2111)和 200pM 特异性引物。

对于 RT 步骤, 混合物 48°C 保温 45 分钟。对于 PCR 步骤, 在 94°C 保温 2 分钟, 然后进行 40 轮循环, 各由下列 3 个步骤组成: 94°C 45 秒钟; 55°C 30 秒钟; 68°C 1 分钟。然后进行 68°C 7 分钟的最终延伸。

e) 扩增的证实

10 根据实施例 1, d) 部分所述的方法。

f) 生物芯片上的分析

1. 扩增子的转录和标记

根据实施例 1, e)-1 部分所述的方法。

2. 标记的转录物的片段化

15 合并含有 20 微升转录物的 3 个试管, 并用 RNeasy 小试剂盒(Qiagen, 商品号 74104), 体外转录物纯化的方法进行纯化。获得 20 微升转录物。

3. 标记的和纯化的转录物的片段化

根据实施例 1, e)-2 中说明的方法。

3. 在芯片上杂交

20 根据实施例 1, e)-3 中说明的方法。

4. 结果的解释

对于大肠杆菌和短小隐孢子虫的签名序列的基数调用必须大于 90%。对于脊髓灰质炎病毒, 由于序列多态性, 检测阈值在 85% 以上。

结果

测试的物种	对应的鉴定性序列上的基数调用
大肠杆菌	100%
短小隐孢子虫	100%
脊髓灰质炎病毒 Sabin 3	88.9%

25 结论

获得通过在相应的鉴定性序列上杂交同时检测 3 种参数。

实施例 7: 肠病毒(柯萨奇病毒 A9)和甲肝病毒株的同时检测

1.-考虑的目标:

7 TCID₅₀/微升的柯萨奇病毒株 A9(用来自 Qiagen 商品号 52904 的 Qiamp 病毒 RNA 试剂盒提取核酸-根据厂商说明书)。

17.5 DIC₅₀/微升的甲肝病毒的疫苗株(用来自 Qiagen 商品号 52904 的 Qiamp 病毒 RNA 试剂盒提取核酸-根据厂商说明书)。

2-多重 RT-PCR

用 ACCESS 试剂盒(Promega, 商品号 A1250)进行 RT-PCR。

对此, 以下述方法加入 1 微升各病毒株和 48 微升反应介质:

	最终浓度/试管
RNasin	2.5U
5X 缓冲液	1X
dNTP	0.3mM
引物 H1 + H2 ^(a)	0.5 μ M
肠病毒引物 ^(b)	0.3 μ M
MgSO ₄	2mM
T4 基因 32 蛋白	2.5 μ g
AMV	5U
Tfl	5U

(a): 出版物: Robertson 等, Virus Research, 1989, 13, 207-212。

10 (b): 设计在 5' NCR 区中。

对于反转录步骤, 将混合物在 48°C 培育 45 分钟。94°C 变性步骤 2 分钟后, 获得的互补 DNA 用下列方式扩增: 45 轮[94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 68°C 45 秒], 延伸步骤为 7 分钟。

3.-扩增的证实

15 在 1.5%琼脂糖凝胶的 EDTA-Tris 硼酸盐中加入 8 微升 RT-PCR 产物。100V 下迁移 30 分钟后, 用溴乙锭染色凝胶, UV 光照显示扩增产物。500bp(肠病毒)的条带和 249bp(HAV)的另一条条带的显现说明扩增是有效的。

在生物芯片上分析

根据专利 WO99/65926 标记扩增产物。

20 结果的解释和结论

对应于各病毒的序列的基数调用必须大于 90%。在这以下, 不能鉴定目标。

获得了下列结果:

	%基数调用
柯萨奇病毒 A9	96.7
HAV	96.9

结论

获得通过在相应的鉴定性序列上杂交同时检测 2 种病毒株。

<110> 比奥·麦利尤公司(BIOMERIEUX)	
<120> 控制水相介质的微生物质量的方法及其试剂盒	
<130> AQUAGENE B05B3650	
<140>	
<141>	
<150> FR00-08839	
<151> 200 -07-06	
<160> 104	
<170> PatentIn Ver. 2.1	
<210> 1	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 大肠弯曲杆菌(Campylobacter coli)	
<400> 1	
tttgtgaaat ctaatggctt aaccattaa ctgcttgag	39
<210> 2	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 大肠弯曲杆菌(Campylobacter coli)	
<400> 2	
atccgtagag atcaccaaga atacccatt	29
<210> 3	
<211> 54	
<212> DNA	
<213> 空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)	
<400> 3	
gtctcttgtg aaatctaag gcttaacat taaactgctt gggaaactga tagt	54
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)	
<400> 4	
ggaactcaac tgacgctaag gcgc	24

<210> 5	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
<400> 5	
gtggttcagc aagttggatg tgaa	24
<210> 6	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	
<400> 6	
aaactactga gctagagtac gtagag	27
<210> 7	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	
<400> 7	
tgttttgacg ttaccgacag aataagcacc ggcta	35
<210> 8	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	
<400> 8	
tagagtatgg tagagggtgg tggaatt	27
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 军团菌 (<i>Legionella</i>)	
<400> 9	
atactgacac tgaggcacga a	21
<210> 10	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 侵肺军团菌 (<i>Legionella pneumophila</i>)	
<400> 10	
ttactgggcg tcaagggtgc gta	23

<210> 11	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 侵肺军团菌(<i>Legionella pneumophila</i>)	
<400> 11	
ttaacctggg acggtcagat aat	23
<210> 12	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 鲍氏不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	
<400> 12	
gcgtaggcgg cttattaagt cggatgt	27
<210> 13	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 鲍氏不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>)	
<400> 13	
cattcgatac tggtagccta gagtatg	27
<210> 14	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 大肠杆菌志贺氏种(<i>Escherichia Coli Shigella Species</i>)	
<400> 14	
cggggaggaa gggagtaaag ttaatacctt tgctcattga cgttacc	47
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 沙门氏菌(<i>Salmonella</i>)	
<400> 15	
gaggaagggtg ttgtggttaa ta	22
<210> 16	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 豚鼠气单胞菌(<i>Aeromonas caviae</i>)	
<400> 16	
cagtagctaa tatctgctgg ctgtgacgtt ac	32
<210> 17	

<211> 32	
<212> DNA	
<213> 嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	
<400> 17	
acgcaggcgg ttggataagt tagatgtgaa ag	32
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 嗜水气单胞菌(<i>Aeromonas hydrophila</i>)	
<400> 18	
aattgcattt aaaactgtcc	20
<210> 19	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 温和气单胞菌(<i>Aeromonas sobria</i>)	
<400> 19	
gaaaggttgg cagctaatat ctgtcagctg tgacg	35
<210> 20	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 温和气单胞菌(<i>Aeromonas sobria</i>)	
<400> 20	
aattgctggt cagctagagt cttgta	26
<210> 21	
<211> 53	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌(<i>Vibrio cholerae</i>)	
<400> 21	
cagtagggag gaaggtggtt aagttaatac cttaatcatt tgacgttacc tac	53
<210> 22	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 霍乱弧菌(<i>Vibrio cholerae</i>)	
<400> 22	
tcaacctagg aatgcattt gaaactgaca agctagagta ctgtagag	48
<210> 23	
<211> 37	

<212> DNA	
<213> 金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)	
<400> 23	
gttattaggg aagaacatat gtgtaagtaa ctgtgca	37
<210> 24	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 表皮葡萄球菌(Staphylococcus epidermatitis)	
<400> 24	
tattagggaa gaacaaatgt gtaagtaact atgcacg	37
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 牛链球菌 马肠链球菌(streptococcus bovis streptococcus equinus)	
<400> 25	
ttggaaactg ttagacttga gtg	23
<210> 26	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 粪肠球菌(Enterococcus faecalis)	
<400> 26	
aagaacaagg acgtagtaa ctgaacgtcc cctgacggta tct	43
<210> 27	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 屎、小肠、耐久肠球菌(Enterococcus faecium, hiraе, durans)	
<400> 27	
agagtaactg ttcatccctt gacggta	27
<210> 28	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)	
<400> 28	
agcgtaggcg gatgattaag tgggatgtg	29
<210> 29	
<211> 22	
<212> DNA	

<213> 产气荚膜梭菌(<i>Clostridium perfringens</i>)	
<400> 29	
gtgctgcatt ccaaactggt ta	22
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 分枝杆菌(<i>Mycobacterium</i> sp.)	
<400> 30	
gcgtgcgggc gatacgggca gact	24
<210> 31	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 鸟、胞内分枝杆菌(<i>Mycobacterium avium</i> , <i>intracellulare</i>)	
<400> 31	
aaggtccggg ttttctcgga ttgac	25
<210> 32	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 堪萨斯分枝杆菌(<i>Mycobacterium kansasii</i>)	
<400> 32	
gtccgggttc tctcggattg acggtaggt	29
<210> 33	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 戈登分枝杆菌(<i>Mycobacterium goodnae</i>)	
<400> 33	
gttttctcgg gctgacggta gg	22
<210> 34	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 海分枝杆菌(<i>Mycobacterium marinum</i>)	
<400> 34	
aggttcgggt tttctcgat tgac	24
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 蟾分枝杆菌(<i>Mycobacterium xenopi</i>)	

<400> 35 ctttcagcct cgacgaagct	20
<210> 36 <211> 22 <212> DNA <213> 蟾分枝杆菌(<i>Mycobacterium xenopi</i>)	
<400> 36 gtgacggtag gggcagaaga ag	22
<210> 37 <211> 42 <212> DNA <213> 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(<i>Burkholderia gladioli</i>)	
<400> 37 ccggaagaa atcctgaggg ctaatattcct tcgggatga cg	42
<210> 38 <211> 25 <212> DNA <213> 洋葱伯克霍尔德氏菌(<i>Burkholderia cepacia</i>)	
<400> 38 actgcattgg tgactggcag gctag	25
<210> 39 <211> 39 <212> DNA <213> 嗜麦芽糖寡养单胞菌(<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>)	
<400> 39 gaggaacatc catggcgaag gcagctacct ggaccaaca	39
<210> 40 <211> 23 <212> DNA <213> 隐孢子虫(<i>Cryptosporidium</i>)	
<400> 40 cagttatagt ttacttgata atc	23
<210> 41 <211> 20 <212> DNA <213> 隐孢子虫(<i>Cryptosporidium</i>)	

<400> 41 ttattagata aagaaccaat	20
<210> 42 <211> 27 <212> DNA <213> 隐孢子虫(Cryptosporidium)	
<400> 42 acctatcagc tttagacggt agggtat	27
<210> 43 <211> 27 <212> DNA <213> 隐孢子虫(Cryptosporidium)	
<400> 43 tgccttgaat actccagcat ggaataa	27
<210> 44 <211> 37 <212> DNA <213> 隐孢子虫(Cryptosporidium)	
<400> 44 agagattgga ggttgcttct tactccttca gcacett	37
<210> 45 <211> 35 <212> DNA <213> 短小隐孢子虫(Cryptosporidium parvum)	
<400> 45 tcattataac agttatagtt tacttgataa tcttt	35
<210> 46 <211> 43 <212> DNA <213> 短小隐孢子虫(Cryptosporidium parvum)	
<400> 46 attggaatga gttaagtata aacccttita caagtatcaa ttg	43
<210> 47 <211> 29 <212> DNA <213> 短小隐孢子虫(Cryptosporidium parvum)	
<400> 47	

tagttggatt tctgttaata atttatata	29
<210> 48	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 短小隐孢子虫(Cryptosporidium parvum)	
<400> 48	
atatttatat aatattaaca taattcatat tactat	36
<210> 49	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 短小隐孢子虫(Cryptosporidium parvum)	
<400> 49	
tttcgaagga aatgggtaat cttttgaata tgcatcgtga t	41
<210> 50	
<211> 382	
<212> DNA	
<213> 腺病毒 40 L19443 (Adenovirus 40 L19443)	
<400> 50	
ctaaagggaa ctgccagtgt aaagcataac atgatttgtg gcggtggtca ctctcagctg 60	
ctaacctgtg cagatggaaa ctgtcagget ctgagagtgt ttcacgtagt atctcatccc 120	
cgccgcccct ggccctgtttt tgagcacaac atgcttatgc gctgtactgt gcatttggga 180	
gctcgtcgtg gcatgttttc tccataccag agtaactttt gccacactaa agttttaatg 240	
gaaactgatg ctttttctcg ggtatggtgg aacgggggtat ttgatttaac catggagcta 300	
tttaaagtgg tgaggtatga tgagtcaaag gttcgttgtc gccctgtga gtgtggagct 360	
aatcatatta ggttatatcc ag 382	
<210> 51	
<211> 382	
<212> DNA	
<213> 腺病毒 41 bis M18289 (Adenovirus 41 bis M18289)	
<400> 51	
ctgaagggaa ctgccagtgt taagcataat atgatttgtg gcaactgtca ctctcagctg 60	
ctaacttgcg cagatggaaa ctgtcagact ctaaaagtga ttcattgtgt ttccatcag 120	
cgccgcccct ggccctgtttt tgagcacaac atgcttatgc gttgtaccat gcatttgggg 180	
gctcgtcgtg gcatgttttc tccatatacag agtaattttt gccatactaa agttttaatg 240	
gaaactgatg ctttttctcg ggtgtggtgg agcgggggtgt ttgatttgac catagagctg 300	
tataaagtgg tgagatatga tgagttaaag gctcgttgtc gccctgtga gtgtggagcc 360	
aatcacatca ggttatatcc ag 382	
<210> 52	
<211> 67	
<212> DNA	

<213> 星状病毒 HAstV-1-2 L23513 (Astrovirus HAstV-1-2 L23513)

<400> 52

agggtacagc ttccttcttt tctgtctctg tttagattat ttaatcacc atttaaaatt 60
gatttaa 67

<210> 53

<211> 521

<212> DNA

<213> 脊髓灰质炎病毒 X00595 (Poliovirus X00595)

<400> 53

cggtaccttt gtgcgcctgt tttatactcc cctcccgcaa cttagaagca cgaaaccaag 60
ttcaatagaa ggggtacaa accagtacca ctacgaacaa gcacttctgt tccccggtg 120
acattgcata gactgctcac gcggttgaaa gtgatcgatc cgttaccgc ttgtgtactt 180
cgaaaagcct agtatcgct tggaaatctt gacgcgttgc gctcagcacc cgaccccggtg 240
gtgtggctta ggctgatgag tctggacatt cctcaccggt gacggtggtc taggtgcgt 300
tggcggccta cctatggcta acgcatagg acgttagatg tgaacaaggt gtgaagagcc 360
tattgagcta cataagagtc ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac cacggaacag 420
gcggtcgcga accagtgact ggcttgcgt aacgcgcaag tctgtggcgg aaccgactac 480
tttgggtgtc cgtgttctt gttattttta tcatggctgc t 521

<210> 54

<211> 520

<212> DNA

<213> 柯萨奇病毒 D00538 (Coxsackievirus D00538)

<400> 54

aggtaccttt gtacgcctgt tttatataccc tcccccgta actttagaag cttatcaaaa 60
gttcaatagc aggggtacaa gccagtacct ctacgaacaa gcacttctgt tccccggtg 120
aaatcatata gactgtaccc acggtcaaaa gtgattgatc cgttatccgc ttgagtactt 180
cgagaagcct agtatcgct tggaaatctt gacgcgttgc gctcaacact ctgccccgag 240
tgtagcttag gctgatgagt ctgggcactc cccaccggcg acggtggccc aggtgcgtt 300
ggcggcctac ccatggctga tgccgtggga cgtagttgt gaacaagggtg tgaagagcct 360
attgagctac tcaagagtcc tccggcccct gaatgcggct aatcctaacc acggagcaat 420
cgctcacgac ccagtgagta gttgtcgta atgcgtaagt ctgtggcgga accgactact 480
ttgggtgtcc gtgtttccct ttatattcat actggetgct 520

<210> 55

<211> 525

<212> DNA

<213> 埃可病毒 X77708 (Echovirus X77708)

<400> 55

cggtaccttt gtgcgcctgt tttatataacc ctcccctcag taacctagaa gttcatcaca 60
aatgatcaat agttagctca acaaaccagt tgagcctaga tcaagcactt ctgttacc 120
gggctgagta tcaataagct gttgacacgg ctgaaggaga aaacgcccggt taccgacca 180
gctacttcgg agaacctagt atccatag aggttgcgta gcgtttcgt cgcacaacc 240
ccagttaga tcaggtcgat gagtcaccgc gttcccaca ggcgactgtg gcggtgctg 300

cgttggcggc ctgcccatgg ggttaccat gggacgcttc aatactgaca tgggtgtgaag 360
 agttgactga gctagctggt agtcctccgg ccctgaatg cggctaatacc taactgtgga 420
 gcaagtgcc acaaccagtg gggtggttg tcgtaatggg caactctgca gcggaaccga 480
 ctactttggg tgaccgtgtt tctctttatt cttatattgg ctgct 525

<210> 56

<211> 981

<212> DNA

<213> 轮状病毒 U36242 (Rotavirus U36242)

<400> 56

atgtatggta ttgaatatac cacaattctg accatthttga tatttatcat attattgaat 60
 tatatattaa aaactataac taatacgatg gactatatag ttttaaatt tttgctacta 120
 atcgcctcga tgcaccatt tgtaaggacg caaaattatg gcatgtattt accaataaca 180
 ggatcactag acgctgtata cacaaattca actagtggag aatcatttct aacttcaacg 240
 ctatgtttat actatccaac agaagctaaa aatgagattt cagataatga atgggaaaat 300
 actctatcag aattatthtt aactaaagga tggccggctg gatcagttta ttttaaagac 360
 tacaatgata ttactacatt ttctatgaat ccacaactgt attgtgatta taatgtagta 420
 ttgatgagat atgataatac atctgaatta gatgcatcgg agttagcaga tcttatattg 480
 aacgaatggc tgtgcaatcc tatggatata tcactttact attatcaaca aaatagcga 540
 tcaaacaaat ggatatcaat cggaacagac tgtacggtaa aagtttgctc actcaataca 600
 caaactctag gaattggatg caaaactacg gacgtggata catttgagat tgttgctcgcg 660
 tctgaaaaat tggtaattac tgatgttgta aatgggtgaa accataaaat aaatatttca 720
 ataagtacat gtactatacg taattgtaat aaactaggac cacgagaaaa tgttgctata 780
 attcaagtgt gtggaccgaa cgcactagat atcactgctg atccaacaac agttccacag 840
 gttcaaagaa ttatgtagt aaattggaaa aaatgggtggc aagtgtttta tacagtagtt 900
 gactatatta accaaattat acaagttatg tccaaacggt caagatcatt agacacagct 960
 gctthttatt atagaattta g 981

<210> 57

<211> 981

<212> DNA

<213> 轮状病毒 M86834 (Rotavirus M86834)

<400> 57

atgtatggta ttgaatatac cacagttcta ttttatttga tatcgttcgt tcttgtgagt 60
 tacattttaa aaaccataac gaaaatgatg gactatatta tttatagagt aacttttata 120
 attgtgtgat tatcagtact gtctaattcg caaaattatg gaataaattt gccattact 180
 ggatctatgg atacagcgta cgctaattcg acgcaaatg gaaatttctt gtcttcaact 240
 ctatgtctat attatccatc tgaggctcca actcaaatga gtgataacga atggaaagat 300
 acattatctc agttgttttt gactaaggga tggccaacag gttcagttta ttttaatgaa 360
 tattcgaatg ttctggattt ttcaattgac ccaaaattat actgtgatta taatattgta 420
 ttaattaaat ttgcttctgg agaggagtgt gatatatctg aactagctga tctgatacta 480
 aatgaatggg tgtgtaatcc aatggatata acgctatatg attatcaaca aactggagaa 540
 gcaaataaat ggatatcaat gggatcatct tgtactgtca aagtgtgccc attaaatcgc 600
 caaactttag gaattggctg ccaacaacg aatgtagcta cttttgaaat ggtggctgac 660
 agtgaaaaac tagcgatagt tgatgttgtt gataatgtaa atcataaatt agatattaca 720
 tctacaacgt gtacaatcgc aaattgtaag aaattagtc caagagaaaa tgtggctata 780
 atacaggttg gtggttctaa tatactagat ataacggctg atcccacgac ttcaccgcaa 840

acggaacgaa tgatgcgtgt taattggaag aaatgggtggc aagtatttta cactgtagtt 900
 gattatatta atcagatagt acaaatgatg tccaaaagat cgaggtcgct agattcatcc 960
 tctttttatt atagagtata g 981

<210> 58

<211> 981

<212> DNA

<213> 轮状病毒 U26395 (Rotavirus U26395)

<400> 58

atgtatggta ttgaatatac cacaattcta atctttctga tatcaatcat cctactcaac 60
 tatatattaa aatcagtgac ccgaataatg gactacatta tatatagatt tttattaatt 120
 tctgtagcat tatttgcctt aactaaagct cagaactatg gacttaatat accaataaca 180
 ggatcaatgg acactgttta ctccaactct actcaagaag gaatatttct aacatccaca 240
 ttatgtttgt attatccaac tgaagcaagt actcaaatca gtgatgggtga ttggaaagac 300
 tcattatcac aaatgtttct taaaaaggt tggccaacag gatcagtcta ttttaaagag 360
 tactcaaata ttgttgactt ttccgttgat ccacaattat attgtgatta taacttagta 420
 ctaatgaagt atgatcaaaa tcttgaacta gatatgtag aattagctga tttgatattg 480
 aatgaatggc tatgtaatcc aatggatata acattatatt attatcaaca atcgggagaa 540
 tcaataaagt ggatatcaat gggatcatca tgtactgtga aagtgtgtcc actgaataca 600
 caaacgtag gaatagggtg tcaaacacag aatgtagact catttgaac ggttgctgaa 660
 aatgaaaaat tagctatagt ggatgtcgtt gatgggatca atcataaaat aaatttgaca 720
 actacgacat gtactattcg aaattgtaag aagtaggtc caagagagta tntagctatc 780
 atacaagttg gtggctctaa tatattagac ataacagcgg atccagcgac taatccacaa 840
 attgagagaa tgatgagagt gaattggaaa agatgggtggc aagtatttta taccatagta 900
 gattatatta atcagattgt acaggtgatg tccaaaagat caagatcatt aaattctgca 960
 gctttttatt atagagtata g 981

<210> 59

<211> 398

<212> DNA

<213> 诺伏克病毒 M87661 (Norwalk virus M87661)

<400> 59

ataaaagttg gcatgaacac aatagaagat ggccccctca tctatgctga gcatgctaaa 60
 tataagaatc attttgatgc agattataca gcatgggact caacacaaaa tagacaaatt 120
 atgacagaat ccttctccat tatgtcgcgc ctacgcct caccagaatt ggccgaggtt 180
 gtggcccaag atttgctagc accatctgag atggatgtag gtgattatgt catcagggtc 240
 aaagaggggc tgccatctgg attcccatgt acttcccagg tgaacagcat aatcactgg 300
 ataattactc tctgtgact gtctgaggcc actggtttat cacctgatgt ggtgcaatcc 360
 atgtcatatt tctcatttta tggatgatg gagattgt 398

<210> 60

<211> 247

<212> DNA

<213> 甲肝病毒 M14707 (Hepatitis A M14707)

<400> 60

gttttgetcc tctttatcat gctatggatg ttactacaca agttggagat gattctggag 60

gtttttcaac aacagtttct acagaacaga atgttccaga tccccaagtt ggtataacaa 120
 ccatgaaaga ttigaaagga aaagctaaca gagggaaaat ggatgtttca ggagtacaag 180
 cacctgtggg agctatcaca acaattgagg atccagtttt agcaaagaaa gtacctgaga 240
 catttcc 247

<210> 61
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> 粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)

<400> 61
 tctcaatcac tggacgtggt actgttgcta caggacgtgt tgaacgtggt gaag 54

<210> 62
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

<400> 62
 tetccatctc cggtcgtggt accgttgta cggtcgtgt agaacgcggt atc 53

<210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 短小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)

<400> 63
 tcctacgtct aacttcacgt g 21

<210> 64
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 短小隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)

<400> 64
 tgtgattggt aaaaagtata g 21

<210> 65
 <211> 164
 <212> DNA
 <213> 吸吮贾第虫(*Giardia lamblia*)

<400> 65
 ggaatgtctt gtaggcgccc gccccaccg cgcgccgat gcgtccctgc ccctgtaca 60
 caccgccgt cgctctacc gactgggcgc ggccggcgcg gccccggacg cgcgaagggc 120
 cgcgagcccc cgcgcctgga ggaaggagaa gtcgtaacaa ggta 164

<210> 66
 <211> 23

<212> DNA	
<213> 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	
<400> 66	
tacctttgct cattgacggt acc	23
<210> 67	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 粪肠球菌(<i>Enterococcus faecalis</i>)	
<400> 67	
actgaacgtc ccctgacggt atct	24
<210> 68	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>) 0157:H7	
<400> 68	
tggatcgcga aaactgtgga attgagcagc gttggtggga aagcgcgta c	51
<210> 69	
<211> 81	
<212> DNA	
<213> 大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	
<400> 69	
tgtgggcatt cagtctggat cgcgaaaact gtggaattga gcagcgttgg tgggaaagcg 60	
cgttacaaga aagccgggca a	81
<210> 70	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 脊髓灰质炎病毒2型 (<i>Poliovirus type 2</i>)	
<400> 70	
ctccggcccc tgaatgcggc taatcctaac	30
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 脊髓灰质炎病毒2型 (<i>Poliovirus type 2</i>)	
<400> 71	
accagtgact ggcttgtcgt	20
<210> 72	
<211> 30	

<212> DNA	
<213> 柯萨奇病毒 A21 (Coxsackievirus A21)	
<400> 72	
tccggcccct gaatgcggt aatcctaacc	30
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 柯萨奇病毒 A21 (Coxsackievirus A21)	
<400> 73	
ccagtgagta ggttgtcgta	20
<210> 74	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 埃可病毒 12 (Echovirus 12)	
<400> 74	
agtctccgg ccctgaatg cgctaacc	30
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 埃可病毒 12 (Echovirus 12)	
<400> 75	
acaaccagt ggggtgcttg	20
<210> 76	
<211> 1061	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 76	
ggctttaaaa gagagaattt cgtttggct agcggttagc tccttttaat gtatggtatt 60	
gaatatacca caattctaac ctttctgata tcaatagttt tattgaacta tatattaaaa 120	
tcactaacta gtgcatgga ctttataatt tatagatttc tttacttat tgttattgca 180	
tcaccttttg ttaaacaca aaattatgga attaatttac cgatcactgg ctccatggat 240	
acagcatatg caaattcatc acagcaagaa acatttttga cttcaacgct atgcttatat 300	
tatctacag aagcgtcaac tcaaattgga gatacagaat ggaaggatac tctgtcccaa 360	
ttattcttga ctaaagggtg gccaaactgga tcagtctatt ttaaagaata caccgatatc 420	
gcttcattct caattgatcc gcaactttat tgggattata atgttgact gatgaagtat 480	
gattcaacgt tagagctaga tatgtctgaa ttagctgatt taattctaaa tgaatggtta 540	
tgtaaccaa tggatataac attatattat taccagcaa cagatgaagc gaataaatgg 600	
atatcgatgg gacagtcttg taccataaaa gtatgtccat tgaatacga gactttagga 660	
ataggttga ttaccacaaa tacagcgaca tttgaagagg tggctacaag tgaaaaatta 720	
gtaataaccg atgttggtga tgggtgtgaa cataaacttg atgtgactac aaataacctg 780	

acaattagga attgtaagaa gttgggacca agagaaaatg tagcgattat acaagtcggt 840
 ggctcagatg tgttagatat tacagcggat ccaactactg caccacaaac tgaacgtatg 900
 atgcgagtaa attggaagaa atgggtggcaa gttttctata cagtagtaga ttatattaat 960
 cagattgtgc aagttatgtc caaaagatca cggtcattaa attcagcagc tttttactat 1020
 agggtttgat atatcttaga ttagaattgt atgatgtgac c 1061

<210> 77

<211> 30

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)

<400> 77

tttttaaatt tttgctacta atcgctctga 30

<210> 78

<211> 21

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)

<400> 78

aatacatctg aattagatgc a 21

<210> 79

<211> 19

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)

<400> 79

caaacaaatg gatatcaat 19

<210> 80

<211> 45

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)

<400> 80

ggttcaaaga attatgcgag taaattggaa aaaatggtgg caagt 45

<210> 81

<211> 20

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)

<400> 81

ctttttatta tagaatttag 20

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 82	
tttatagagt aacttttata attgttgiat	30
<210> 83	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 83	
tctggagagg agttggatat a	21
<210> 84	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 84	
caaataaatg gatatacaat	19
<210> 85	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 85	
aacggaacga atgatgcgtg ttaattggaa gaaatggtgg caagt	45
<210> 86	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 86	
ctttttatta tagagtatag	20
<210> 87	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 87	
tatatagatt tttattaatt tctgtagcat	30
<210> 88	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	

<400> 88 caaaatcttg aactagatat g	21
<210> 89 <211> 19 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 89 caaataagtg gatatcaat	19
<210> 90 <211> 45 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 90 aattgagaga atgatgagag tgaattggaa aagatggtgg caagt	45
<210> 91 <211> 20 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 91 ctttttatta tagagtatag	20
<210> 92 <211> 30 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 92 tttatagatt tcttttactt attgttattg	30
<210> 93 <211> 21 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 93 tcaacgttag agctagatat g	21
<210> 94 <211> 19 <212> DNA <213> 轮状病毒 (Rotavirus)	

<400> 94	
cgaataaatg gatatcgat	19
<210> 95	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 95	
aactgaacgt atgatgcgag taaattggaa gaaatggtgg caagt	45
<210> 96	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 轮状病毒 (Rotavirus)	
<400> 96	
ctttttacta tagggtttga	20
<210> 97	
<211> 64	
<212> DNA	
<213> 甲肝病毒 (Hepatitis A virus)	
<400> 97	
atggatgttt caggagtaca agcacctgtg ggagctatca caacaattga ggatccagtt	60
ttag	64
<210> 98	
<211> 551	
<212> DNA	
<213> 札幌病毒 (Sapporo Virus)	
<400> 98	
tgtgatgctg ccaccacgct tatagccacc gcggtttta aggccgtggc taccaggcta	60
cagtggtga caccaatgac accagttgct gttggcatta acatggactc tgttcagatg	120
caagtgatga atgactcttt aaaggggggt gttctttact gtttggatta ttccaatgg	180
gattccacac aaaaccctgc agtgacagca gcctccctgg caatattgga gagatttgct	240
gagccccatc caattgtgtc ttgtgccatt gaggctcttt cctcccctgc agagggctat	300
gtcaatgata tcaaatgtgt gacacgcggc ggcctacat ctgggatgcc atttacatct	360
gtcgtcaatt ctatcaacca tatgatatac gtggcggcag ccatcctgca ggcatacga	420
agccacaatg tccatatac tggaaacgtc ttccaagtgg agaccgttca cacgtatggt	480
gatgattgca tgtacagcgt gtgccctgcc actgcatcaa tttccacac tgtgcttgca	540
aacctaacgt c	551
<210> 99	
<211> 382	
<212> DNA	
<213> 索萨普顿病毒 (Southampton Virus)	

<400> 99

tcaaagttgg aatgaattca attgaggatg ggccactgat ctatgcagaa cattcaaaat 60
 ataagtacca ctttgatgca gattacacag cttgggactc aactcaaaat aggcaaatca 120
 tgacagagtc attttcaatc atgtgicggc taactgcatc acccgaacta gcttcggtgg 180
 tggctcaaga cttgctcgca ccctcagaga tggatgttgg cgactacgic ataagagtga 240
 aggaaggcct cccatctggt ttcccatgca catcacaagt taatagtata aaccattggt 300
 taataactct gtgcgccctt tctgaagtga ctggcctgic gccagacggt atccaatcca 360
 tgtcatattt ctctttctat gg 382

<210> 100

<211> 312

<212> DNA

<213> 沙漠屏病毒 (Desert Shield Virus)

<400> 100

tttgatgctg attacacggc ctgggattcc actcaaaaca gggaaatcat gatggagtcc 60
 tttaacatca tgtgtaaact cactgccaac cttccctgg ctgicggtagt ggcacaagac 120
 ttactttctc cttctgaaat ggatgttggg gattatgtaa tcagtgtgaa agacggcctg 180
 ccatcaggct tcccgtgtac ctcaacaagtc aacagcataa atcactggat tctcacctg 240
 tgtgcattgt cagaagtcac cgggctctcc ccagatgtgt tgcagtcaca gtcgtatttt 300
 tccttctatg gg 312

<210> 101

<211> 362

<212> DNA

<213> 多伦多病毒 (Toronto Virus)

<400> 101

aatgaagatg gtcccataat atttgagaaa cattccagat acagatacca ctatgatgca 60
 gattactccc gctgggactc cacgcagcag cgggcagtgc tggcagcagc acttgaaatc 120
 atggtgaggt tctctgctga accacagcta gcacaaatag tagctgaaga cctgctagca 180
 ccaagtgtgg ttgatgtggg tgacttcaag atcaccatta atgaaggcct accttctggt 240
 gtgccttgea cctcacagtg gaactccatt gccactggt tgcttactct gtgtgccctt 300
 tctgaagtta caggactagg ccccagatc atacaagcta attctatgta ctctttctat 360
 gg 362

<210> 102

<211> 364

<212> DNA

<213> 雪山病毒 (Snow Mountain Virus)

<400> 102

tgaatgagga tggaccata atttttgaaa agcactccag gttctcatac cactatgatg 60
 cagattactc acgctgggac tcaacceaac agagggcagt gctagctgca gccttggaaa 120
 tcatggtaaa attctacca gaaccacatt tggcccaaat tgttgcagag gatctcctag 180
 cccccagtgt gatggatgta ggtgatttca aaataacaat taatgaggga ctgccctcgg 240
 gagtaccctg cacatcacag tgggaattcca tcgccactg gtcctcaca ctctgtgcac 300
 tatctgaagt cacaaacctg gctcctgaca tcatacaagc taactccttg ttctctttct 360

atgg 364

<210> 103

<211> 376

<212> DNA

<213> 夏威夷病毒(Hawaii virus)

<400> 103

```
tcagagttgg tatgaacatg aatgaggatg gccccattat ctttgagaaa cactccaggt 60
ataaatatca ttaagattat tctcgatggg actcaacaca gcagagagcc gtactagctg 120
cagccctaga gatcatggtc aaattctccc cagagccaca cttggcccag gtagttgcag 180
aagaccttct tccccccagt gtgatggatg tgggtgactt caagatatca atcaacgagg 240
gtcttccctc tggggtgcc tgcacctgc aatggaactc catcaccac tggctcctca 300
ctctttgtgc actctctgaa gtcacggacc tgtcccctga catcattcaa gccaattcct 360
tattctcttt ctatgg 376
```

<210> 104

<211> 382

<212> DNA

<213> 布里斯托病毒(Bristol Virus)

<400> 104

```
tcagagttgg catgaatag aatgaggatg gccccatcat cttcgagaga cactccagat 60
acaagtatca ctatgatgct gactactctc ggtgggattc aacacaacaa agggccgtgt 120
tagcagcagc cctagaaatc atggttaaat tctcccaga accgcatttg gccagatag 180
ttgcagaaga cttctatct cctagtgtga tggatgtggg tgacttcaaa atatcaatca 240
atgagggcct tccctctggt gtgccctgca cctctcaatg gaattccatc gccactggc 300
tcctcactct ctgtgcactc tctgaagtta caaacctgtc ccctgacatc atacaggcta 360
attccctctt ttccttctat gg 382
```

各特异性探针的百分数(BC)

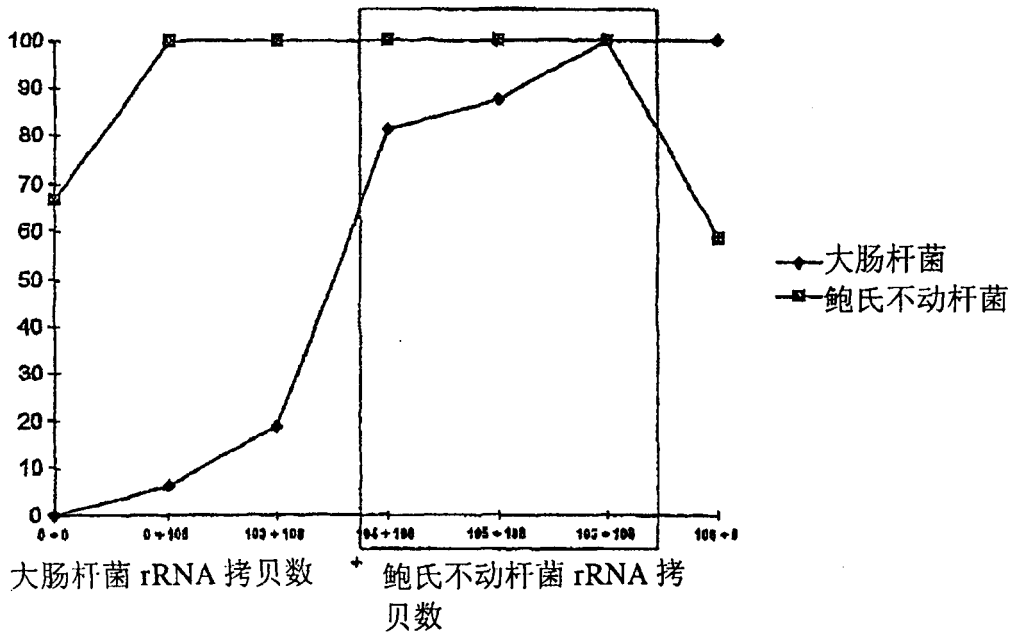


图 1

作为大肠杆菌 - 鼠伤寒沙门氏菌/鲍氏不动杆菌比例函数、
鼠伤寒沙门氏菌和鲍氏不动杆菌特异性的探针基数调用 (BC) 百分数

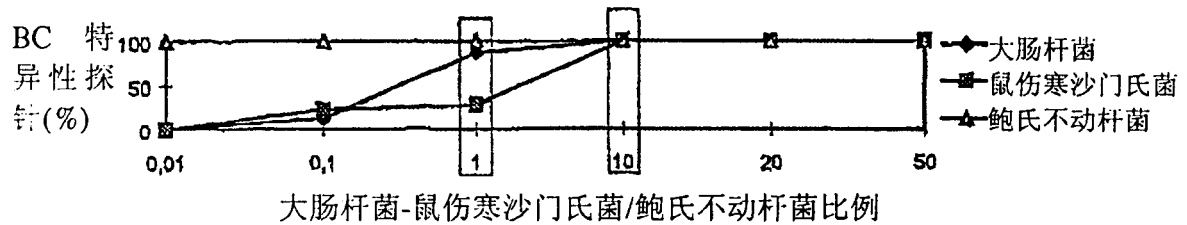


图 2

专利名称(译)	控制水相介质的微生物质量的方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN1451050A	公开(公告)日	2003-10-22
申请号	CN01815097.7	申请日	2001-07-06
[标]申请(专利权)人(译)	比奥· 麦利尤股份有限公司		
[标]发明人	P雷诺 E吉约 C马比莱特 C瓦雄 B拉克鲁瓦 G韦尔内 M A阿曼德 P拉费尔		
发明人	P·雷诺 E·吉约 C·马比莱特 C·瓦雄 B·拉克鲁瓦 G·韦尔内 M· - A·阿曼德 P·拉费尔		
IPC分类号	G01N33/53 C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/689 C12Q1/6893 C12Q1/70 C12R1/19 G01N33/18 G01N33/569 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/689 C12Q1/6893 C12Q1/701		
代理人(译)	徐迅		
优先权	2000008839 2000-07-06 FR		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种控制环境水相介质的微生物质量的方法，该介质被怀疑含有各种微生物，包括下列步骤：选择一个参比组，它包括至少三种微生物，联合或分别代表一种微生物质量水平；提供微生物学检测试剂盒，含有至少三种探针，它们分别特异性鉴定所述的三种微生物；在处理要分析的介质后，使所述微生物或任何从要分析的介质衍生的任何组分与所述检测试剂盒接触，从而对所述微生物进行多重检测，所述检测代表介质的微生物质量水平。本发明还涉及一种实施所述方法的合适的微生物学检测试剂盒。

各特异性探针的百分数(BC)

