

98年11月9日(更正)更換頁

公告本

發明專利說明書

※申請案號：96129626

C120 1/04

※申請日期：96.8.10

※IPC 分類：

C120 1/68

C12R 1/22

一、發明名稱：(中文/英文)

克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 快速檢測劑 / RAPID SEROTYPES
K1/K2 TEST FOR KLEBSIELLA PNEUMONIAE VIRULENT STRAINS

二、申請人：(共1人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立陽明大學/ NATIONAL YANG-MING UNIVERSITY

代表人：(中文/英文) 吳妍華 / LEE WU, YAN-HWA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

11221 台北市北投區立農街二段 155 號/NO.155, SEC.2, LINONG
ST., BEITOU DISTRICT, TAIPEI CITY 11221, TAIWAN (R.O.C.)

國籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

三、發明人：(共5人)

姓名：(中文/英文)

1. 馮長風/Fung, Chang-Phone ID : F104203272
2. 蕭樑基/Siao, Liang-Ji ID : F131085806
3. 張峰義/Chang, Feng-Yee ID : W100154228
4. 林永崇/Lin, Jung-Chung ID : R120879220
5. 陳德禮/Chen, Te-Li ID : I100442529

國籍：(中文/英文)

1-5 中華民國/R.O.C.

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供一種克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 的快速檢驗試劑及其檢測方法。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to a test kit for detecting *Klebsiella pneumoniae* virulent strain K1/K2 and use thereof.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(一)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

1 硝酸纖維膜

2 吸水墊片

3 膠體金墊片

4 檢體墊片

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 快速檢驗劑。

【先前技術】

克雷伯氏肺炎桿菌是革蘭氏陰性的桿菌，隸屬於腸內菌科，為一重要的伺機性感染的病原菌。近 20 年來，一種新型的侵襲性克雷伯氏肺炎桿菌感染逐漸躍升為一個全球性的新興重要社區感染症。克雷伯氏肺炎桿菌引起的化膿性感染症、菌血症以及相當比率的院內感染，在台灣它在革蘭氏陰性桿菌中居第二位。台灣的肝膿瘍百分之八十由克雷伯氏肺炎桿菌引起，以社區感染為主，非一般之院內感染，病程發展急速並可能併發眼內炎而導致失明。流行病學分析最常發生在台灣的血清型 K1 及 K2 二型，該二型菌株毒性最強，最容易轉移到眼球造成嚴重的眼內炎，須將眼球摘除方能保命。目前台灣已有超過 70 例因克氏菌肝膿瘍造成終身眼盲的病例。國內外的文獻皆指出嚴重的併發症如眼內炎等之發生皆在克氏菌化膿性肝膿瘍形成後 48-72 小時之內發生，因此臨床上若能及早鑑定出此二種毒性株，即刻更改治療方針，施打較昂貴的第三帶頭孢子菌素可預防眼內炎的悲劇發生。

克氏菌所引起的化膿性肝膿瘍為一新興的感染症，目前除了盛行於亞洲國家及地區之外，歐美等國亦陸續有相關的文獻報導。而相關的研究重點集中在以分子生物學的方法找尋致病因子，在以致病因子來做聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，以作為快速診斷

的方法，目前台灣大學的研究團隊雖找到 magA 基因用來做 PCR，但僅能測出 K1 菌株，對 K2 毒性菌株則無法測到，且 PCR 的方法最快需要準備一天的時間，同時需要具備昂貴的儀器及純熟的技術，且工作煩瑣，必須請專人操作。

【發明內容】

本發明之目的主要是亟欲解決早期能快速鑑定克氏菌K1 及K2 型之毒性菌株以便能即

時提供臨床醫師一個準確的答案以便及時治療化膿性肝膿瘍所帶來的併發症的問題。國內外的文獻皆指出嚴重的併發症如眼內炎等之發生皆在克氏菌化膿性肝膿瘍形成後48-72 小時之內發生，因此如能在極短的時間內利用克氏菌毒性菌株k1/k2 快速檢驗劑，於5 分鐘內即可測知該菌是否為毒性菌株，在臨床診斷及治療上將會得到重大突破。

本發明為利用免疫色層分析(immunochromatographic test, ICT)之方法研發克雷伯氏菌K1及K2型之毒性菌株之快速檢驗。

是以，本發明係關於一種克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 的檢驗試劑，其特徵包括一載體其上固定抗克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 抗體。

本發明檢驗試劑中載體包括但不限於係硝酸纖維膜。為有利檢體流動，載體可黏附於吸水墊片。

本發明檢驗試劑中標記物可顯示抗體與檢體之反應，該標記物包括但不限於膠體金。

本發明檢驗試劑中抗體為任何動物對克雷伯氏菌K1及K2型毒性菌株之抗體，其可與膠體金共軛產生共軛物，於較佳具體實施例為小鼠-a-kp1膠體金共軛物(CGC)或小鼠-a-kp2膠體金共軛物。

本發明檢驗試劑中膠體金與抗體已結合並塗附於一體可擴散載體，形成一膠體墊片。該膠體金墊片一面可黏附於載體，其另一面可黏附於檢體墊片。

本發明係關於一種檢測克雷伯氏肺炎桿菌毒性株K1/K2之方法，包括(a)提供一檢體，及(b)將該檢體加入本發明之檢測試劑，及(c)觀察抗體與檢體是否有聚集反應。

於本發明方法中，檢體係克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株K1或K2，會於遇到抗體處形成一條實線。

於本發明方法中，檢驗試劑包括一控制線，用以表示試劑運作正常。

本發明方法，可用於任何包括檢體，但不限於臨床肝膿瘍檢體、腦脊

髓液或尿液檢測。

【實施方式】

實例1:

本發明為利用免疫色層分析(immunochromatographic test, ICT)之方法研發克雷伯氏菌K1及K2型之毒性菌株之快速檢驗，其步驟如下：

(一)、克雷伯氏菌K1及K2型之毒性菌株之抗血清的製備：以低劑量之K1及K2型之毒性菌株在小鼠身上發免疫反應，同時加入二級抗體：山羊- α -小鼠-IgG-HRP(Goat- α -mouse-IgG-HRP)以酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)測定其效價，並將所得之抗體以蛋白質A 色層分析純化。

(二)、噴膜及乾燥：將純化後的抗血清(小鼠-a-kp1及小鼠-a-kp2)稀釋以噴膜機後噴量固定至硝酸纖維膜(NC膜，長度為30cm)，固定後將置於恆溫恆濕無塵室內乾燥24小時後進行阻斷(blocking)製程作業。

(三)、膠體金的製備：取適量之抗血清抗體和膠體金(25nm)進行反應結合及濃縮。將製備好的小鼠-a-kp1 CGC 及小鼠-a-kp2 CGC，以噴量3.0 μ l/cm以噴膜機固定在材質為玻璃纖維膠體金墊片上，恆溫恆濕箱內以TEMP=37 $^{\circ}$ C、RH=5%、乾燥30分鐘。

(四)、試劑組裝作業：將硝酸纖維膜保護層撕下(圖一)，黏貼硝酸纖維膜(位置1)，用手指指腹將硝酸纖維膜確實壓合，確保硝酸纖維膜黏貼牢固。再將吸水墊片保護層撕下，黏貼吸水墊片(位置2)，用手指指腹將Top pad 壓合，確保Top pad 黏貼牢固。確認Top pad 上緣與

塑膠底卡上緣切齊。將膠體金墊片黏貼處(位置3)表面的保護層撕下，將裁切好的膠體金墊片沿著檢體墊片黏貼處之保護層上緣黏貼。用手指指腹將膠體金墊片壓合，確保膠體金墊片黏貼牢固。確認膠體金墊片與硝酸纖維膜有重疊 $2\pm 1\text{mm}$ 。最後撕下檢體墊片保護層，將裁好的檢體墊片沿塑膠底卡下緣對齊貼合(位置4)，再用手指指腹確實壓合。確認檢體墊片與膠體金墊片有重疊 $5\pm 2\text{mm}$ 。

將上述組裝好的試紙卡，以試紙裁切機裁切成每條 $3.85\text{mm}/\text{strip}$ 的寬度， $\text{speed}=60$ 進行裁切，裁切好後組裝試紙條至試劑卡內，最後以鋁箔袋以臥式包裝機包裝。

實例2：

1、將肝膿瘍檢體以生理食鹽水稀釋拌勻作為待測之標本，(標本若為腦脊髓液、尿液或其他體液則可不必稀釋，標本若為已培養好之克氏菌，則先挑取2-3 個菌落用生理食鹽水拌勻即可)。

2、將試劑之包裝紙打開置於桌上，將待測之標本以微量吸管吸取1 滴待測之標本滴入標本測試區(S-well)。

3、再以微量吸管吸取本試劑所附的顯示性溶液(developing solution) 3 滴待測之標本滴入標本測試區(S-well)，3-5 分鐘內即可判讀。

4、判讀的準則如下：

(1) . 若只有一條紫紅色的線條出現在C 區(Procedural control line)，表示本試劑運作正常，但所測試之標本並不是克氏菌，即使為克氏菌亦非為毒性最強之K1 或K2 型菌株。

(2). 若試劑上出現二條紫紅色的線條，一條出現在C 區(C-line)，另外一條出現在1 區(K1-line) 或2 區(K2-line)，即可判定該菌株為K1 或K2 型菌株。

實例3:

挑取三種不同血清型(包括K1, K2 及non-K1/K2)的菌株測試結果：第二圖中左側之試劑顯示為non-K1/K2 型菌株，中側之試劑顯示為K1 型菌株，右側之試劑顯示為K2 型菌株。本試劑已用傳統之血清分型法作對照檢驗，結果並未發現與其他75 種不同血清型的菌株發生交叉反應(cross reaction)，顯示本試劑之特異性(specificity)極高。

【圖式簡單說明】

圖一顯示試劑組裝之順序。

圖二顯示三種不同血清型(包括K1, K2 及non-K1/K2)的菌株測試結果。

【主要元件符號說明】

- 1 硝酸纖維膜
- 2 吸水墊片
- 3 膠體金墊片
- 4 檢體墊片

年 月 101. 日 修(更)⁰² 正本

101年11月02日 替換頁

公告本

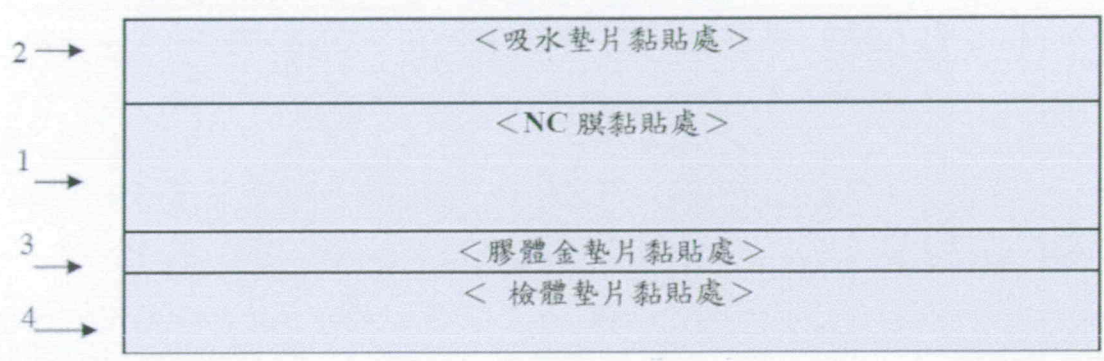
十、申請專利範圍：

1. 一種克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 之檢驗試劑，其包含：一載體，包含抗克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 抗體；一檢體墊片；一膠體金墊片；及一吸水墊片，其中該檢驗試劑之底層為前述之載體，而檢體墊片、膠體金墊片及吸水墊片依序置於載體上。
2. 如申請專利範圍第1項所述之檢驗試劑，其中該載體係硝酸纖維膜。
3. 如申請專利範圍第1項所述之檢驗試劑，其中該膠體金墊片係玻璃纖維。
4. 如申請專利範圍第1項所述之檢驗試劑，其中該膠體金墊片包含經膠體金標記之抗克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 抗體。
5. 如申請專利範圍第4項所述之檢驗試劑，其中該經膠體金標記之抗克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 抗體為小鼠-a-kp1 膠體金共軛物。
6. 如申請專利範圍第4項所述之檢驗試劑，其中該經膠體金標記之抗克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株 K1/K2 抗體為小鼠-a-kp2 膠體金共軛物。
7. 一種檢測克雷伯氏肺炎桿菌毒性株 K1/K2 之方法，包括：

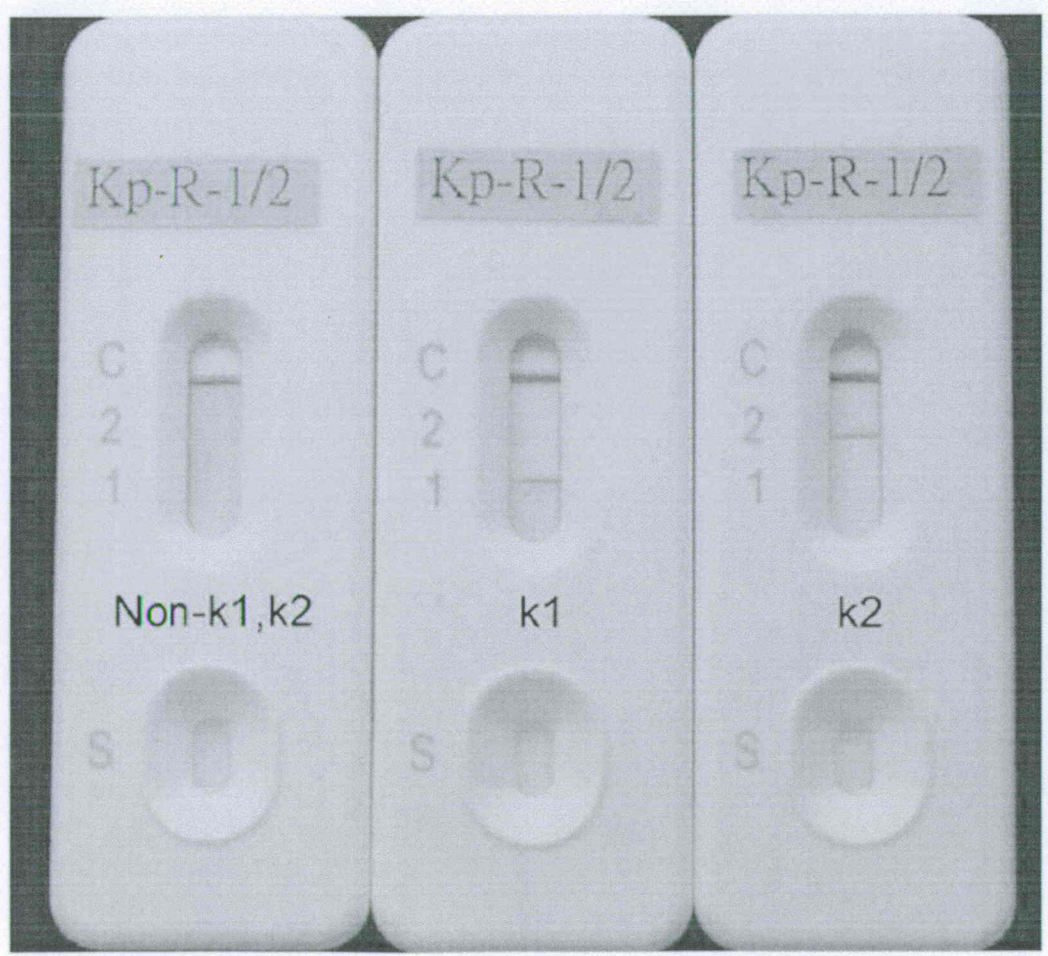
- a. 提供一檢體；
 - b. 將該檢體加入如申請專利範圍第1項之檢驗試劑；及
 - c. 觀察抗體與檢體是否有聚集反應。
8. 如申請專利範圍第7項所述之方法，其中檢體係克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株K1，會於遇到抗體處形成一條實線。
 9. 如申請專利範圍第7項所述之方法，其中檢體係克雷伯氏肺炎桿菌毒性菌株K2，會於遇到抗體處形成一條實線。
 10. 如申請專利範圍第7項所述之方法，其中檢驗試劑包括一控制線，用以表示試劑運作是否正常。
 11. 如申請專利範圍第7項所述之方法，其用於臨床肝膿瘍檢體、腦脊髓液或尿液檢測。

公告本

十一、圖式：



圖一



圖二