

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)

公告本

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：97119896

C12N 15/31 (2006.01)

※申請日期：97.5.29

※IPC 分類：C12R 1/68 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

G01N 33/569 (2006.01)

眼睛與中樞神經系統之細菌、黴菌、寄生蟲及病毒感染之新穎同步檢
測及鑑別方法

A NOVEL METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION AND
DISCRIMINATION OF BACTERIAL, FUNGAL, PARASITIC AND
VIRAL INFECTIONS OF EYE AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM

二、申請人：(共 1 人)

印度科學與工業研究理事會

COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL RESEARCH

☐ 指定 為應受送達人

代表人：(中文/英文)(簽章)

羅傑得 苛雪 蓋普坦/ GUPTA, RAJENDRA KISHORE

住居所或營業所地址：(中文/英文)

印度新德里 110001, 阿露山旦 巴溫區熱西 瑪 2 號

ANUSANDHAN BHAWAN, 2, RAFI MARG, NEW DELHI -110001,
INDIA

國 籍：(中文/英文) 印度/INDIA

電話/傳真/手機：

E-MAIL：

三、發明人：(共 7 人)

1. 姓 名：(中文/英文)

千大拉古律 毛漢 洛/ CHINTALAGIRI, MOHAN RAO

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

2. 姓 名：(中文/英文)

昆柴拉 飛大 洛/ KUNCHALA, SRIDHAR RAO

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

3. 姓 名：(中文/英文)

普芝拉 溫卡倉德/ PUPPALA VENKAT RAMCHANDER

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

4. 姓 名：(中文/英文)

哈巨 那哇哈律洛 瑪德溫/ HAJIB, NARAHARIRAO MADHAVAN

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

5. 姓 名：(中文/英文)

沙瑪 沙威律/ SHARMA, SAVITRI

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

6. 姓 名：(中文/英文)

沙巴坦 蓋坦/ SATPATHY, GITA

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

7. 姓 名：(中文/英文)

瑞威 庫瑪 文克坦 巴達/ RAVI, KUMAR VENKATA BANDA

國 籍：(中文/英文)

印度/INDIA

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：

印度 IN、西元 2007 年 6 月 1 日、1178/DEL/2007

☐ 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。

膜或角膜取得之抹片或紗布中暴露於環境汙染特定病原體(細菌及黴菌)之檢測，結膜及角膜蓄留許多非病原性細菌及黴菌的“過客”。在化膿或有膿之潰瘍存在下，臨床醫師會暫時診斷為細菌感染並以廣效性抗生素局部施用治療病患。然而，難以診斷但極易治療的重要感染症為：

單純疱疹(引起角膜炎)

- 腺病毒角膜-結膜炎(多次引起流行病的比例)
- 砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)(引起濾泡性結膜炎，導致砂眼及成人包涵體結膜炎)
- 水痘結膜炎(亦稱為帶狀疱疹結膜炎)
- 快速生長分枝桿菌，例如龜型分枝桿菌(*M. chelonae*)及兩棲類分枝桿菌(*M. fortuitum*)(引起 LASIK 後感染，LASIK 為降低折射誤差所實施之外科手術)

感染性眼內炎一般可由以下引起：

- 格蘭氏陽性菌
- 格蘭氏陰性菌
- 厭氧性微生物，即痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*)
- 黴菌

通常感染為術後且發展快速而導致失明。治療所需要之最重要訊息為病原體究竟為細菌或黴菌，若為細菌，究竟其為需氧性或厭氧性。經血行傳佈之內源性感染較為罕見。

葡萄膜炎通常由以下引起：

- 結核分枝桿菌(*Mycobacterium tuberculosis*)
- 龜型分枝桿菌
- 兩棲類分枝桿菌
- 弓蟲(*Toxoplasma gondii*)

5 視網膜炎常見於免疫功能不足之個體，且由以下引起：

- 細胞巨大病毒
- 單純疱疹病毒
- 水痘帶狀疱疹病毒

顯著的視覺喪失發生在所有此類病患中，且對於這些
10 微生物早期及即時診斷在預防眼球全面性失明上是重要
因素。在開發中國家這些感染之實際影響相對較高，許多
用於診斷眼睛感染之診斷技術詳述於先前技術。

中樞神經系統感染可分成以下種類：

急性化膿性腦膜炎：常見於孩童，且由以下微生物引起，
15 例如

- 流行性感嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)
- 腦膜炎奈瑟氏球菌(*Neisseria meningitides*)及
- 肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)

腦脊髓液(CSF)沉澱物之細菌培養或抹片鏡檢欠缺敏
20 感性，其他複雜因素為病患以抗生素早期治療可導致格蘭
氏染色及 CSF 培養之偽陰性結果。由於這些理由，醫師對
於培養結果遲疑，並選擇完成全部 10-14 日靜脈內抗生素
療程，大部份這些情況是不必要的。一旦部份治療，情況

膜結膜炎、眼內炎、葡萄膜炎、視網膜炎、腦膜炎及腦炎。在這些情況中，感染被高度侷限，因而被限制於眼睛或 CNS。例如血液、血漿或血清之體液並不含傳染性病原。外眼感染需要例如角膜抹片或結膜擦試片之樣本，然而感染性眼內炎需要在眼科醫院吸出玻璃體吸出液，或較佳為玻璃體手術之樣本，在此情況，於手術房中取漢克斯平衡鹽類溶液(Hank's Balanced Salt solution)作 20 ml 玻璃體清洗。簡單之玻璃體吸出液通常不適於經由塗抹檢查及培養診斷黴菌及細菌性眼內炎。在葡萄膜炎及視網膜炎之情況，較佳的樣本為 27 號(gauge)注射針所收集之 0.2 至 0.3 mL 玻璃狀液。用於診斷中樞神經系統感染之最佳生物體液為腦脊髓液，在本發明之一具體實施例中，在眼內炎之情況，為了檢測及區別感染性病原，水樣液或玻璃狀液已足夠，此排除了在手術房進行例如玻璃體切除術之外科手術的必要性。

基於 DNA 之病原體鑑定方法提供了簡單、健全及簡易的方法以代替費時且需要具有專門訓練及技巧的傳統方法。當進行傳統方法時，所產生的錯誤有時可能導致籠統的病原鑑定，因而造成錯誤的診斷/治療。另一方面，基於 DNA 之病原體鑑定提供在極早階段鑑定病原的優點，有時早於所見到之臨床症狀(無徵狀期；sub-clinical stage)。一旦條件標準化，病原鑑定就極為簡易，並可經半技術人員處理。基於 DNA 之程序亦可用於評估醫療介入之結果(預後值)。對人類病原體臨床樣本篩選，使用基於

DNA 之方法(例如 PCR)提供了敏感及可靠的診斷並開始有效的治療，甚至可由每一樣本含非常少量(約 20-50 個)病原體的少量體積之臨床樣本(水樣液、玻璃狀液、眼淚、唾液、血液、腦脊髓液、黏膜或上皮抹片，例如角膜抹片、結膜擦布、組織樣本等等)中篩選。

使用聚合酶連鎖反應(PCR)技術之潛在優點在於相當短的時間內鑑定特定細菌或病毒病原體，當病患仍在急診室時，活體基於 PCR 之分析潛在性地影響臨床醫師判斷如何開始治療，因為基於 PCR 之檢測方法並不以活的生物體存在為依據，反而是依賴基因材料，基於 PCR 之技術應用於所有病患情況，甚至當投與抗生素早於臨床樣本收集。然而，基於 PCR 之方法涉及一些難題，例如因核酸污染之偽陽性結果及因複雜樣本之 PCR 反應抑制。下列 PCR 分析揭示引發眼睛及 CNS 感染之微生物。

單純疱疹 1 及 2：HSV 之基於 PCR 的 DNA 檢測顯示高於病毒培養 4 至 5 倍之敏感性，且對於運輸條件並不敏感，此敘述於 Wald A., et al. "Polymerase chain reaction for detection of Herpes simplex virus (HSV) on mucosal surface : Comparison with HSV isolation in cell culture". J. Inf. Dis.188 : 1345-1351 (2003)。PCR 用於檢測眼睛樣本中 HSV，例如水樣體液、角膜抹片、晶體吸出液、晶體囊狀物及玻璃狀液與其他例如 CSF、生殖道檢體及子宮頸檢體之臨床樣本，Madhavan HN et al. "Detection of Herpes simplex virus (HSV) using polymerase chain reaction (PCR)

in clinical samples : Comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV". J. Clin. Virol. 14 : 145-151 (1999)。於此，PCR 可檢測臨床樣本中 1 至 3 個 HSV 顆粒。合併 PCR 及增幅子(amplicon)之限制性片段長度多樣性(Restriction length polymorphisms)，PCR 亦有效用於鑑定疱疹病毒血清型，如敘述於發明者之一的一篇刊物，其之揭示一併作為參考，Madhavan HN et al. "Phenotypic and Genotypic methods for the detection of Herpes simplex virus serotypes". J. Virol. Methods, 108 : 97-102 (2003)。

水痘帶狀疱疹病毒：PCR 用於檢測水痘感染(Burke DG, et al. "Polymerase chain reaction detection and clinical significance of varicella zoster in cerebrospinal fluid in human immunodeficiency virus infected patients". J. Inf. Dis, 176 : 1080 (1996))。檢測中樞神經系統之 HSV 及 VZV 亦可使用 PCR 達成(Sauerbrei A and Wutzler P. "Laboratory diagnosis of central nervous system infection caused by herpes viruses". J. Clin. Virol, 25 s45-s51, (2002))，其中之結論為 PCR 是檢測 VZV 之最佳標準，該揭示於本文一併作為參考。

細胞巨大病毒 A：商業上可獲得之 PCR 試驗稱為 COBAS Amplicor CMV Monitor of Roche Molecular 診斷法(Pleasanton, CA, USA)，使用 CMV 之 DNA 聚合酶基因的 365 鹼基對區域經由增幅來檢測。為了檢測 CMV 在各種體

液中的存在，使用最早期抗原基因及 DNA 聚合酶的許多分析已被揭示 (Stanier P, et al. "Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR". Mol. Cell Probes, 6 : 51-58 (1992)及
5 Gerna G, et al. "Monitoring human cytomegalovirus infection and gancyclovir treatment in heart transplant recipients by determination of viraemia, antigenemia and DNAemia". J. Inf. Dis., 164, 488-498 (1991))，該揭示於本文一併作為參考。病患之 CMV 感染亦可經由巢式 PCR 檢
10 測各種樣本，例如血液、羊膜液、鼻抽出物、支氣管-肺泡灌洗液、尿液、胎盤物質及支氣管抽出物。

由 HSV、VZV 及 CMV 三種疱疹病毒引起之眼睛感染以 PCR 檢測，如本發明之一發明人於以下刊物中所揭示，
Priya K et al. "Association of herpes viruses in aqueous
15 humour of patients with serpigenous choroiditis : a polymerase chain reaction based study". Ocular Immunology and Inflammation 9 : 1-9 (2003)，該揭示於本文一併作為參考。在此研究中，為了獲得必要的敏感性而進行巢式 PCR
● 檢測 VZV。然而，在實驗室中，當第一輪增幅之 PCR 產
20 物必須被移轉至第二 PCR 試管時，該試管含有第二組引子以擴大在 PCR 第一輪中所增幅之基因的較小區域，此巢式 PCR 具有引入增幅子污染的伴隨問題。

以 PCR 檢測結核分枝桿菌為二個 FDA 公認試驗架構，其為 The Amplified Mycobacterium tuberculosis Direct

test Gen-Probe San Deigo, USA 及 Amplicor M. tuberculosis test of Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland。在此項技術領域中已知有許多其他試驗，然而，Madhavan HN 等人揭示使用 PCR 檢測眼結核病，“Polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in epiretinal membrane in Eales’”. Disease. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 41 : 822-825 (2000)。

Black CM, “Current methods of laboratory diagnosis of Chlamydia trachomatis infection”. Clin. Microbiol. Rev. 10 : 160-184 (1997) 詳細敘述以核酸增幅之砂眼披衣菌檢測已使用於臨床環境。Malathi. Jet al. “A hospital based study on prevalence of conjunctivitis due to Chlamydia trachomatis”. Ind. J. Med. Res., 117 : 71-75 (2003) 詳細敘述在結膜擦試片上使用 PCR 檢測披衣菌結膜炎，且檢測 30 個少量微生物的臨床樣本。

如先前之敘述，於結膜擦試片上以巢式 PCR 診斷腺病毒結膜炎，Dalapathy S et al. “Development and use of nested polymerase chain reaction (PCR) for the detection of Adenoviruses from conjunctivitis specimen”. J. Clin. Virol. 11 : 77-84 (1998)。

在具有免疫不全之病患情況，弓蟲引起嚴重之腦炎及葡萄膜炎，許多 PCR 試驗計劃已使用於研究各種體液及組織，且所有 PCR 試驗依賴 B1 基因之增幅 (Danise A, et al. “Use of polymerase chain reaction assays of aqueous humor

in diagnosis of in the differential diagnosis of retinitis in patients infected with human immunodeficiency virus". Clin. Infect. Dis 24 : 1100- 1106 (1997)、Montoyo. et al. "Use of polymerase chain reaction in diagnosis of ocular toxoplasmosis. Ophthalmology", 106 : 1554-1563 (1999))。

使用 PCR 反應於真細菌(eubacteria)基因並以探針區別格蘭氏陽性菌及格蘭氏陰性菌，以研究眼睛術後感染所造成之感染性眼內炎，其詳細揭示於 Anand AR et al. "Use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA probe hybridization to determine the gram reaction of the interacting bacterium in the intraocular fluids of patients with endophthalmitis". J. Infection, 41 : 221-226 (2000)。此研究能於一個臨床樣本中檢測低至六個細菌。使用 PCR 快速檢測例如痤瘡桿菌之厭氧微生物所引起之眼感染，其詳細敘述於 Therese KL et al. "Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis", Brit. J. Opthal. 82 : 1078-1082 (1998)。黴菌性眼內炎亦可使用 PCR 快速檢測，其詳細揭示於 Anand AR et al. "Polymerase chain reaction in the diagnosis of Asperigillus endophthalmitis". Ind. J. Med. Res. 114 : 133-140 (2001)及 Anand AR et al. "Use of polymerase chain reaction in fungal endophthalmitis". Ophthalmology 108 : 326-330 (2001)。在這二項研究中，可檢測約~0.4 pgs 之黴菌 DNA。

當各別 PCR 中之引子組及待測基因不相同時，本文所

述不同的 PCR 分析使用不同的反應溫度輪廓。此外，為了最佳化 PCR 對於本文所述該組反應物之最佳敏感度，調整上述各 PCR 試劑濃度。理想的反應條件根據欲增幅其大小之核苷酸鏈序列及待測微生物或病原體之整體靶 DNA 的複雜性而變化。

然而，對於基於 PCR 之分析仍有需求，即，可在引起細菌、黴菌、寄生蟲及病毒之眼睛及中樞神經系統感染的病原體之間同步檢測及區別，除快速外，不易污染，且比其他方法更增加敏感度及特異性，應該易於使用在臨床環境，因為於 24 至 48 小時內鑑定感染病原對於拯救生命十分重要。準確診斷眼睛及大腦之感染的關鍵問題可總結為：

- 眼睛及大腦之感染為高度侷限性，在例如血液、血清、血漿、唾液或膿汁或外部傷口或潰瘍之化膿液體等容易取得之體液中並無微量病原體。
- 任何公認的急性感染生物標記，例如 C 反應蛋白，對於侵襲人體之感染而言是通常性且普遍的，因此並非特異性。
- 為了鑑定特異性病原體，需要取自眼睛或 CSF 之樣本，可獲得之樣本為角膜感染之角膜抹片；結膜炎之結膜擦試片；眼內炎之水樣液；葡萄膜炎及視網膜炎之玻璃狀液。在大腦感染之情況，較佳之樣本經常為 CSF。在這些全部之樣本中，單一次可由病患獲得之樣本數量有所限制。一般而言，在角膜抹片或擦試片

中可得幾千個細胞，可能為二至三毫克之樣本。在任何時間可由病患眼睛取出之水樣液約為 100 μ L，而玻璃體切除之樣本可多至 200 μ L。可取出多至 5 ml 的 CSF 樣本，但 PCR 所需之 CSF 樣本體積少於 0.5 ml。

- 因樣本體積受限的結果限制了存在於樣本中的細菌/病毒/寄生蟲數量。此外，感染性病原量少於許多身體其他部位(例如血液)中觀察到之數量。
- 存在於樣本之感染性粒子的總數與檢測成功直接成正比，臨界質量以下，感染性病原細菌及黴菌不易生長於培養基，因此難以診斷。眼睛樣本中病毒顆粒之數量一般低於螢光抗體檢測試驗之檢測極限，因此病毒培養使得檢測敏感性低於 25%。對於例如弓蟲之寄生蟲並無簡易之檢測系統，且對於檢測而言，寄生蟲數量亦太少。例如對於 HSV、CMV、VZV、腺病毒、披衣菌及弓蟲之 IgM 或 IgG 檢測之試驗極不具特異性且並無診斷上之重要性。
- 其他在診斷上主要之困難為上述所有眼睛之困擾皆為急性，且需要立即、精確的診斷以建立適當療法。在感染性眼內炎的情況，延遲 48 小時將造成失明，而因病毒感染之壞死性視網膜炎必須在第一徵狀呈現後 96 小時內加以治療。

多重引子 PCR(multiplex PCR)亦已在一定的臨床狀況中被使用於一些病原體，且經由質譜儀確定分子量以鑑定

增幅之產物，其詳細敘述於 Detection and identification of pathogens by mass spectrometric determination of the base composition of PCR products。 (Ecker, David J. : Griffey Richard H. : Sampath, Rangarajan ; Hofstandler, Steven A. : Meneil, John ; Crooke, Stanley T. (USA). U.S. Pat. Appl. Publ. (2004), 168 pp. Cont.-in-part of U.S. Ser. No. 323,233. Application : US 2003-660122 20030911. Priority : US 2001-798007 20010302 ; US 2002-431319 20021206 ; US 2002-323233 20021218 ; US 2002-326051 20021218 ; US 2002-325526 20021218 ; US 2002-325527 20021218 ; US 2003-443443 20030129 ; US 2003-443788 20030130 ; US 2003-447529 20030214)。

多重引子 PCR 分析之後以膠體電泳鑑定產物被嘗試於中樞神經系統感染，其敘述於 Read, S.J. and Kurtz, J.B. “Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay”. J. Clin. Microbiol. 37 : 1352-1355 (1999)。

多重引子 PCR 之後以微陣列檢測病原體被描述於檢測引起呼吸道疾病之病原體 (Wang D et al. “Microarray based detection and genotyping of viral pathogens”. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99 : 15687-15692 (2002))。增幅子之檢測亦嘗試使用微滴定皿比色分析系統，其中增幅子以洋地黃毒(digoxigenin)-dUTP 標示，且使用經生物素標記之探

針在微滴定皿上捕捉增幅子，使用抗洋地黃毒標示酵素呈現產物 (Smalling TW et al. “Molecular approaches to detecting herpes virus and enteroviruses in the central nervous system”. J. Clin. Microbiol. 40 : 2317-2322 (2002))。

5 為了定量臨床樣本中之病毒，成功嘗試以相同微生物之三種不同基因(即，細胞具大病毒之形態轉化區 II、UL 83 及糖蛋白 O 基因)的多重引子 PCR 分析，其詳述於 Madhavan HN et al., “Development and application of a novel multiplex polymerase chain reaction for
10 semiquantitation of human cytomegalovirus in clinical specimen”, J Virol Methods. 141 : 166-72 (2007)。

以多重引子 PCR 分析以增幅所有 19 個乳突腫瘤病毒之高風險基因型 L1 區域後，亦使用線性探針分析 (Line probe assay) 檢測並區別女性子宮頸樣本中乳突腫瘤病毒
15 之基因型 (Bauer HM et al. “Detection of human papilloma viruses by polymerase chain reaction” US Patent No 5639871)。

例如質譜儀之方法並不實用，甚至在先進的第三級醫學加護中心，且臨床設施上，依據昂貴掃描機的微陣列檢
20 測並不易獲得。線性探針分析易有增幅子污染。

吸出液，或腦部膿瘡所收集之膿汁，或視網膜前膜；

ii) 經由單管 PCR 技術，使用標示增幅引子於各引起 CNS 及眼睛感染的已知病原體，由各病原體特有之基因增幅 DNA 特定區域；

5 iii) 使用 DNA 雜交檢測及區別病原體，其中對於各病原體特異性之固定化靶序列與經 PCR 反應所產生之增幅 DNA 探針反應，並經由使用特定試劑套組呈色以監測雜交。

定義

10 "核苷酸"意指 DNA 或 RNA 之構成要素，由一含氮鹼基、一磷酸根分子及一糖分子(在 DNA 為去氧核糖，在 RNA 為核糖)所組成。

"寡核苷酸"意指短鏈核苷酸。寡核苷酸通常使用作為探針，以尋找 DNA 或 RNA 之配對序列，並可以各種標記
15 標示，例如放射性同位素及螢光與化學發光部分。

"引子"意指互補於 DNA 特定靶序列的短股寡核苷酸，其用於最初 DNA 合成。

"單一引子(uniplex)"意指在增幅單一病原體特定 DNA 序列的各反應中，使用單套引子之基於 PCR 分析。

20 "多重引子"意指於單一反應中使用多套引子之基於 PCR 分析，其中各引子可增幅單一病原體特定 DNA 序列。

"探針"一詞意指由基於 PCR 增幅靶 DNA 所產生的 DNA 產物(增幅子)。

"靶"一詞意指，個別病原體特有之 DNA 序列，其被

固定於惰性基質上，例如尼龍。

"雜交"意指結合 DNA 之二個互補股以形成雙股分子之方法；更明確而言，本文所述係為"探針"與"靶"DNA 序列之間的結合。

5 本文中所使用"檢測系統"一詞意指一種能將 PCR 增幅 DNA 產物可視化之方法，適當的檢測系統之實例包括根據顏色、放射性、螢光或化學發光之檢測的系統。

"泛黴菌(pan fungal)"意指發現於所有病原性黴菌之一般基因序列，例如在隱球菌(Cryptococcus)、念珠菌
10 (Candida)、白黴菌(Mucormycosis)、曲黴菌(Asperigillus)及根黴菌(Rhizopus)等，且用於鑑定任何/所有黴菌種類。

發明之詳細說明

由罹患眼睛感染之病患的臨床樣本中，設計適於病原
15 體 DNA 多重引子 PCR 之獨特 PCR 引子。

根據文獻獲得的已知資料，選擇下列引起眼睛感染之各種已知病原體的基因。

1. 單純疱疹病毒 1 及 2 糖蛋白 D
2. 單純疱疹病毒 1 及 2 UL44 基因
- 20 3. 單純疱疹病毒 1 及 2 DNA 聚合酶基因
4. 細胞巨大病毒糖蛋白 O 基因
5. 細胞巨大病毒形態轉化基因
6. 細胞巨大病毒 UL 88 基因
7. 水痘帶狀疱疹 ORF 29

-)增幅，即，一微生物/基因之引子不應與反應混合物中其他任何微生物/基因之基因反應。

所有引子一般而言以配對病原體基因之所有核苷酸鹼基的方法設計。然而，若在一些品系或種別中錯誤配對，例如在設計於增幅格蘭氏陽性、格蘭氏陰性菌及黴菌引子之情況，錯誤配對被限制在引子中間最多二個核苷酸。須保證在所有診斷之種別品系中，各引子之3'端一直具有較理想之配對。

除了技術中所述之選擇引子序列的標準準則外，所述準則經參考文獻詳細揭示於本文，Molecular cloning: A laboratory manual, Vol 2, Sambrook. J, Russell DW (Eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press NY (2001)，這些準則為3'端為G或C，避免串聯GC重複，且通常不以T中止任何引子等等。

設計後，各別使用引子，並使用所有列出之病原體的標準DNA序列(基因)，以多重引子形式核對敏感性及特異性。無論是在辨識一些微生物或病毒顆粒之敏感性未達先前技術所報告者，即 Madhavan HN, et al, Detection of herpes simplex(HSV) using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples Comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV, J. Clin. Virol. 14: 145-151 (1999); Malathi. Jet al. A hospital based study on prevalence of conjunctivitis due to *Chlamydia trachomatis* Ind. J. Medical research, 117: 71-75 (2003);

4. 細胞巨大病毒糖蛋白 O 基因，經含 SEQ ID No 7 及 8 之引子組 4 增幅，FP: 5' ttccggctcatggcgtaacc 3'(SEQ ID No.7)及 RP: 5' cgccctgcttttacgttacgc 3'(SEQ ID No.8)。
5. 細胞巨大病毒形態轉化基因，經含 SEQ ID No 9 及 10 之引子組 5 增幅，FP: 5' cggcgacgacgacgataaag 3'(SEQ ID No.9)及 RP: 5' caatctggtcgcgtaatcctctg 3'(SEQ ID No.10)。
6. 細胞巨大病毒 UL 88 基因，經含 SEQ ID No 11 及 12 之引子組 6 增幅，FP: 5' gggcacgtcctcgcagaag 3'(SEQ ID No.11)及 RP: 5' ccaagatgcaggtgataggtgac 3' (SEQ ID No.12)。
7. 水痘帶狀疱疹 ORF 29，經含 SEQ ID No 13 及 14 之引子組 7 增幅，FP: 5' ggtcttgccggagctggtattac 3'(SEQ ID No.13)及 RP: 5' tgccctccgtgaaagacaaagaca 3'(SEQ ID No.14)。
8. 水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶基因，經含 SEQ ID No 16 及 16 之引子組 8 增幅，FP: 5' tccatttaacgttgcatcattttgtg 3'(SEQ ID No.15)及 RP: 5' acgttccggtagcgagttatctg 3'(SEQ ID No.16)。
9. 腺病毒 Hexon 基因，經含 SEQ ID No 17 及 18 之引子組 9 增幅，FP: 5' cgccgccaacatgctctacc 3'(SEQ ID No.17)及 RP: 5' gttgcgggaggggatggata 3'(SEQ ID No.18)。
10. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 I，經含 SEQ ID No 19 及 20 之引子組 10 增幅，FP: 5' tgggctacacacgtgctacaatgg

3' (SEQ ID No.19)及 RP : 5' cggactacgatcgggtttgtgaga
3'(SEQ ID No.20)。

11. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II, 經含 SEQ ID No 21
及 22 之引子組 11 增幅, FP: 5' ggcctaacacatgcaagtcgagc
3(SEQ ID No.21)及 RP : 5' ggcagattcctaggcattactcacc
3(SEQ ID No.22)。

12. 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分, 經含
SEQ ID No 23 及 24 之引子組 12 增幅, FP : 5'
acgtcaaatacatcatgcccccttat 3'(SEQ ID No.23)及 RP : 5'
tgcagccctttgtaccgtccat 3'(SEQ ID No.24)。

13. 結核分枝桿菌 MPB 64 基因, 經含 SEQ ID No 25 及
26 之引子組 13 增幅, FP : 5' gcggaacgtgggaccaatac
3'(SEQ ID No.25)及 RP : 5' cgacggggtgattttcttcttc
3' (SEQ ID No.26)。

14. 兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因, 經含 SEQ ID No
27 及 28 之引子組 14 增幅, FP : 5'
aacttttttgactgccagacacactattg 3'(SEQ ID No.27)及 RP :
5' ggatgccaccccccaaaag 3'(SEQ ID No.28)。

15. 龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因, 經含 SEQ ID No 29
及 30 之引子組 15 增幅, FP: 5' tggttactcgcttggtgaatatgt
3'(SEQ ID No.29)及 RP : 5' gacgttttgccgactacctatcc
3(SEQ ID No.30)。

16. 弓蟲 B1 基因，經含 SEQ ID No 31 及 32 之引子組 17 增幅，FP：5' cccctctgctggcgaaaagtg 3'(SEQ ID No.31) 及 RP：5' ggcgaccaatctgcgaatacac 3'(SEQ ID No.32)。
17. 砂眼披衣菌多形性蛋白 II，經含 SEQ ID No 33 及 34 之引子組 18 增幅，FP：5' aatcgtatctcgggttaatgttgc 3'(SEQ ID No.33)及 RP：5' tcgaggaaaaccgtatgagaaac 3'(SEQ ID No.34)。
18. 黴菌 28s 核糖體 RNA 基因特異性部分，經含 SEQ ID No 35 及 36 之引子組 19 增幅，FP：5' gctgggactgaggactgcgac 3'(SEQ ID No.35)及 RP：5' ttcaagacgggcgcatataac 3'(SEQ ID No.36)。
19. 瘰癧桿菌 16s-23s 核糖體 RNA 基因特異性部分，經含 SEQ ID No 37 及 38 之引子組 20 增幅，FP：5' tggcgaacgggtgagtaaca 3'(SEQ ID No.37)及 RP：5' ccggtattagccccagtttcc 3'(SEQ ID No.38)。
20. 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因特異性部分，經含 SEQ ID No 39 及 40 之引子組 21 增幅，FP：5' cggcggcaagttcgacgac 3'(SEQ ID No.39)及 RP：5' ccaccgagacgcccacacc 3'(SEQ ID No.40)。
21. 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因，經含 SEQ ID No 41 及 42 之引子組 22 增幅，FP：5' ccaggtcggcggagaagc 3'(SEQ ID No.41)及 RP：5' ccaccggcccgatgacc 3'(SEQ ID No.42)。

22. 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 1 基因，經含 SEQ ID No 43 及 44 之引子組 23 增幅，FP：5' gccgccctgaccaccttc 3'(SEQ ID No.43)及 RP：5' gcgggttggttcggcatcag 3'(SEQ ID No.44)。

5 在本發明另一具體實施例中，以用於設計引子以鑑定所述病原體特有之特定基因片段的電腦程式獲得 SEQID 45-67 之探針序列。探針序列在 66-90 個核苷酸長度間變化。探針本身並不形成髮夾環，其與其他任何增幅子並無同源性，探針可由病原體 DNA 之任一股增幅。

10 探針序列詳述如下：

1. 單純疱疹病毒 1 及 2 糖蛋白 D 基因之探針 DNA 序列
“cgcttggtttcggatgggaggcaactgtgctatccccatcacgggtcatggagt
acaccgaatgctcctacaacaagtctctgggggc”(SEQ ID No.
45)(經引子組 1 增幅，該引子包含 FP：5'
15 cgcttggtttcggatgggag 3'(SEQ ID No.1) 及 RP：5'
gccccagagacttgtagg 3'(SEQ ID No.2))。

2. 單純疱疹病毒 1 及 2 UL 44 基因之探針 DNA 序列
“ggcaatcgtgtacgtcgtccgcacatcacagtcgcggcagcgtcatcggc
ggtaacgcaagaccccccg”(SEQ ID No. 46)(經引子組 2 增
20 幅，該引子包含 FP：5' ggcaatcgtgtacgtcgtccg 3'(SEQ ID
No.3)及 RP：5' cgggggggtcttgcttac 3'(SEQ ID No.4)。

3. 單純疱疹病毒 1 及 2 DNA 聚合酶基因之探針 DNA 序列

“caagctgacggacatttacaaggtccccctggacgggtacggccgcatga

acggccggggcgtgtttcgcgtgtgggac" (SEQ ID No. 47)(經引子組 3 增幅，該引子包含 FP: 5' caagctgacggacatttacaagg 3'(SEQ ID No.5)及 RP: 5' gtcccacacgcgaaacacg 3'(SEQ ID No.6))。

4. 細胞巨大病毒 糖蛋白 O 基因之探針 DNA 序列

"ttccggctcatggcggttaaccaggtagaaactgtgtgtacagttgcgttgtagtaacgtaaaagcagggcg" (SEQ ID No. 48)(經引子組 4 增幅，該引子包含 FP: 5' ttccggctcatggcggttaacc 3'(SEQ ID No.7) 及 RP: 5' cgccctgcttttacgttacgc 3'(SEQ ID No.8))。

5. 細胞巨大病毒形態轉化區 II 基因之探針 DNA 序列

"cggcgacgacgacgataaagaatacaaagccgcagtgctcgtccagagga ttacgcgaccagattg" (SEQ ID No.49)，經引子組 5 增幅，該引子包含 FP: 5' cggcgacgacgacgataaag 3'(SEQ ID No.9)及 RP: 5' caatctggctgcgtaatcctctg 3'(SEQ ID No.10)。

6. 細胞巨大病毒 UL 88 基因之探針 DNA 序列

"gggcacgtcctcgcagaaggactccaggtacaccttgacgtactggtcac ctatcacctgcatcttgg" (SEQ ID No.50)(經引子組 6 增幅，該引子包含 FP: 5' gggcacgtcctcgcagaag 3'(SEQ ID No.11)及 RP: 5' ccaagatgcaggtgataggtgac 3'(SEQ ID No.12))。

7. 水痘帶狀疱疹 ORF 29 之探針 DNA 序列

"ggtcttgccggagctggtattaccttaaaactcactaccagtcatttctatcc

atctgtctttgtctttcacggaggca" (SEQ ID No. 51)(經增幅
the 引子組 7，該引子包含 FP：5'
ggctttgccggagctggtattac 3'(SEQ ID No.13)及 RP：5'
tgcctccgtgaaagacaaagaca 3'(SEQ ID No.14))。

- 5 8. 水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶基因之探針 DNA 序列

"tccatttaacgttgcattctttgtgttatcatagaactgcgtaaactcggc
aagtaatacagataactcgctaccggaacgt" (SEQ ID No. 52)(經
引子組 8 增幅，該引子包含 FP：5'
tccatttaacgttgcattctttgtg 3'(SEQ ID No.15)及 RP：5'
10 acgttccggttagcgagttatctg 3'(SEQ ID No.16))。

9. 腺病毒 Hexon 基因之探針 DNA 序列

"cgccgccaacatgctctaccctatacccgccaacgctaccaacgtgcca
tatccatccccctcccgcaac" (SEQ ID No. 53)(經引子組 9 增
幅，該引子包含 FP：5' cgccgccaacatgctctacc 3'(SEQ ID
15 No.17)及 RP：5' gttgcgggaggggatggata 3'(SEQ ID
No.18))。

10. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 I 之探針 DNA 序列

"tgggctacacacgtgctacaatgggtcggtacagagggtcgccaaaccgc
gaggtggagctaattctcaciaaacgatcgtagtccg" (SEQ ID No.
20 54)(經引子組 10 增幅，該引子包含 FP：5'
tgggctacacacgtgctacaatgg 3'(SEQ ID No.19)及 RP：5'
cggactacgatcggtttgtgaga 3'(SEQ ID No.20))。

11. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II 之探針 DNA 序列

"ggcctaacacatgcaagtcgagcggtatgaaaggagcttgctcctggattc

agcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcc" (SEQ ID No. 55)(經引子組 11 增幅，該引子包含 FP：5' ggcctaacacatgcaagtcgagc 3'(SEQ ID No.21)及 RP：5' ggcagattcctaggcattactcacc 3'(SEQ ID No.22))。

- 5 12. 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因之特異性部分之探針 DNA 序列

"acgtcaaatacatcatgcccccttatgacctgggctacacacgtgctacaatg gacgggtacaaagggctgca" (SEQ ID No. 56)(經引子組 12 增幅，該引子包含 FP：5' acgtcaaatacatcatgcccccttat 3'(SEQ ID No.23)及 RP：5' tgcagccctttgtaccgtccat 3'(SEQ ID No.24))。

13. 結核分枝桿菌 MPB 64 基因之探針 DNA 序列

"gcggaacgtgggaccaataacctgggttgggccggctgcttcgggcagca actccccgggttgaagaagaaaatcaccccgctcg" (SEQ ID No. 57)(經引子組 13 增幅，該引子包含 FP：5' gcggaacgtgggaccaatac 3'(SEQ ID No.25)及 RP：5' cgacgggggtgattttcttcttc 3'(SEQ ID No.26))。

14. 兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因之探針 DNA 序列

"aacttttttgactgccagacacactattgggctttgagacaacaggcccgtg ccccttttgggggtggcatcc" (SEQ ID No. 58)(經引子組 14 增幅，該引子包含 FP：5' aacttttttgactgccagacacactattg 3'(SEQ ID No.27)及 RP：5' ggatgccaccccccaaaag 3'(SEQ ID No.28))。

15. 龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因之探針 DNA 序列

“tggttactcgcttggtgaatatgtttataaatcctgtccaccccgtagtag
gtagtcggcaaaacgtc” (SEQ ID No. 59)(經引子組 15 增
幅，該引子包含 FP：5' tggttactcgcttggtgaatatgt 3'(SEQ
ID No.29)及 RP：5' gacgttttgccgactacctatcc 3'(SEQ ID
No.30))。

16. 弓蟲 B 1 基因之探針 DNA 序列

“cccctctgctggcgaaaagtgaattcatgagtatctgtgcaactttggtgt
attcgagattggtcgcc” (SEQ ID No. 60)(經引子組 16 增
幅，該引子包含 FP：5' cccctctgctggcgaaaagtg 3'(SEQ ID
No.31)及 RP：5' ggcgaccaatctgcaatacac 3'(SEQ ID
No.32))。

17. 砂眼披衣菌多形性蛋白 II 之探針 DNA 序列

“aatcgtatctcgggttaatgttgcatgatgctttatcaaatgacaagcttagat
ccgtttctcatacgggttttctcga” (SEQ ID No. 61)(經引子組
17 增幅，該引子包含 FP：5' aatcgtatctcgggttaatgttgc
3'(SEQ ID No.33)及 RP：5' tcgaggaaaaccgtatgagaaac
3'(SEQ ID No.34))。

18. 黴菌 28s 核糖體 RNA 基因之特異性部分之探針 DNA
序 列

“gctgggactgaggactgcgacgtaagtcaaggatgctggcataatggttat
atgccgcccgtcttgaa” (SEQ ID No. 62)(經引子組 18 增
幅，該引子包含 FP：5' gctgggactgaggactgcgac 3'(SEQ

ID No.35)及 RP : 5' ttcaagacgggcggcatataac 3'(SEQ ID No.36))。

19. 瘰癧桿菌 16s-23s 核糖體 RNA 基因之特異性部分之探針 DNA 序列

“tggcgaacgggtgagtaacacgtgagtaacctgcccttgactttgggataa
cttcaggaaactggggctaataaccgg” (SEQ ID No. 63)(經引子組 19 增幅，該引子包含 FP : 5' tggcgaacgggtgagtaaca 3'(SEQ ID No.37)及 RP: 5' ccggtattagccccagtttcc 3'(SEQ ID No.38))。

20. 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因之特異性部分之探針 DNA 序列

“cggcggcaagttcgacgacaacacctacaaggtgtccggcggcttgac
ggtgtgggcgtctcggtgg” (SEQ ID No. 64)(經引子組 20 增幅，該引子包含 FP : 5' cggcggcaagttcgacgac 3'(SEQ ID No.39) 及 RP : 5' ccaccgagacgcccacacc 3'(SEQ ID No.40))。

21. 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因之探針 DNA 序列

“ccaggtcggcgggagaagccgaggcaggcaggcaggccttcagttcgtcg
ggtcatcgggcccgttg” (SEQ ID No. 65)(經引子組 21 增幅，該引子包含 FP : 5' ccaggtcggcgggagaagc 3'(SEQ ID No.41)及 RP : 5' ccaccggcccgatgacc 3'(SEQ ID No.42))

22. 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 1 之探針 DNA 序列

“gccgccctgaccaccttcacagcctggccggccgttacctggtgctgatg
ccgaacaaccgc” (SEQ ID No. 66)(基因經引子組 22 增

幅，該引子包含 FP：5' gccgccctgaccaccttc 3'(SEQ ID No.43) 及 RP：5' gcgggttggtcggcatcag 3'(SEQ ID No.44))。

在本發明另一具體實施例中，使用電腦程式由探針序列產生 SEQID 67-88 之靶序列。這些靶用於固定在例如尼龍之惰性基質上，並使用 UV-輻射交聯或化學固定。該靶根據下列準則選擇：

1. 所有靶序列為病原體特異的，並不與他種病原體之其他任何序列重疊。
2. 所有靶序列的長度大小範圍為 23 至 38 鹼基。
3. 所有靶具有 58.9°C-88°C 之相同的融化溫度範圍。
4. 該靶序列存在於增幅子區，且並不含正向或反向引子序列，因而標記探針(具有 SEQ ID Nos 67-91)不會非特異性結合至這些靶。
5. 一般而言，所有之靶以配對所有核苷酸鹼基之方式設計，然而，若在一些探針中有錯誤配對，則該錯誤配對被限制於在探針當中間最大為二個核苷酸，以便保證雜交。

該靶序列詳述如下：

1. 5'gcaactgtgctatcccatcacgggtcatggagtacaccgaatgct 3'(SEQ ID No. 67)用於 HSV 糖蛋白 D 之靶，經引子組 1 增幅。
2. 5'cacatcacagtcgcggcagcgtcatcggcg 3'(SEQ ID No. 68)用於 HSV UL 44 之靶，經引子組 2 增幅。

3. 5'tccccctggacgggtacggccgcatgaacggccgggg 3'(SEQ ID No. 69)用於 HSV 聚合酶基因之靶，經引子組 3 增幅。
4. 5'aggtagaaactgtgtgtacagttgcgttgtg 3'(SEQ ID No. 70)用於 CMV 糖蛋白 O 之靶，經引子組 4 增幅。
5. 5'aatacaaagccgcagtgctcgtc 3'(SEQ ID No. 71)用於細胞巨大病毒形態轉化基因 II 之靶，經引子組 5 增幅
6. 5'gactccaggtacaccttgacgtactg 3'(SEQ ID No. 72)用於細胞巨大病毒之 UL 88 基因之靶，經引子組 6 增幅。
7. 5'cttaaaactcactaccagtcatttctatccatc 3'(SEQ ID No. 73)用於水痘帶狀疱疹病毒 ORF 29 基因之靶，經引子組 7 增幅。
8. 5'ttatcatagaactgcgtaaacactcggcaagtaata 3'(SEQ ID No. 74)用於水痘帶狀疱疹病毒之 DNA 聚合酶基因之靶，經引子組 8 增幅。
9. 5' ctatacccgccaacgctaccaacgtgcccc 3'(SEQ ID No. 75)用於腺病毒 Hexon 基因之靶，經引子組 9 增幅。
10. 5'tcggtacagagggtcgccaaaccgcgaggtggagctaa 3'(SEQ ID No. 76)用於真細菌 16s 核糖體基因區 I 之靶，經引子組 10 增幅。
11. 5'ggatgaaaggagcttgctcctggattcagcggcggacg 3'(SEQ ID No. 77)用於真細菌 16s 核糖體基因區 II 之靶，經引子組 11 增幅。

12. 5' gacctgggctacacacgtgctaca 3'(SEQ ID No. 78)用於格蘭氏陽性微生物 16s 核糖體基因之靶，經引子組 12 增幅。
13. 5'ctgggttgggccggctgcttcgggcagcaactcccccggtt 3'(SEQ ID No. 79)用於結核分枝桿菌 MPB 64 基因之靶，經引子組 13 增幅。
14. 5' ggctttgagacaacaggccccgtgccc 3'(SEQ ID No. 80)用於兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因之靶，經引子組 14 增幅。
15. 5' ttataaatcctgtccacccccgt 3'(SEQ ID No. 81)用於龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因之靶，經引子組 15 增幅。
16. 5' aaattcatgagtatctgtgcaactttg 3'(SEQ ID No. 82)用於弓蟲 B1 基因之靶，經引子組 16 增幅。
17. 5' atgatgctttatcaaatgacaagcttagatcc 3'(SEQ ID No. 83)用於砂眼披衣菌多形性蛋白 II 之靶，經引子組 17 增幅。
18. 5' gtaagtcaaggatgctggcataatg 3'(SEQ ID No. 84)用於所有黴菌 28s 核糖體 RNA 基因之靶，經引子組 18 增幅。
19. 5' gcttcagcgccgctcagcgaggataac 3'(SEQ ID No. 85)用於瘡癤桿菌 16s 核糖體 RNA 基因之靶，經引子組 19 增幅。
20. 5' aacacctacaaggtgtccggcggttgac 3'(SEQ ID No. 86)用於格蘭氏陰性微生物促旋酶(gyrase)基因之靶，經引子組 20 增幅。

21. 5' cgaggcaggcggaggtccttcagttcgtcg 3'(SEQ ID No. 87)

用於格蘭氏陰性微生物烏頭酸水合酶基因之靶，經引子組 21 增幅。

22. 5' atcagcctggccggccgttacctggtg 3'(SEQ ID No. 88)用於

格蘭氏陰性微生物核糖核酸酶基因之靶，經引子組 22 增幅。

上述報告及用於固定在惰性基質上的這些寡核苷酸使用由標準 DNA 及臨床樣本所產生之產物確認(經序列分析)，這些序列為獨特的，且並非多重引子或單一引子 PCR 所已知或敘述。

在本發明另一具體實施例中，提供使用上述所有或一些引子組之多重引子 PCR 分析，其中該所有引子可一起用於相同熱循環條件之單一試管，該條件包含 94°C 5 分鐘之變性步驟、之後於 60-64°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒 40 個循環，之後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。

在另一具體實施例中，引子組在 5'端使用生物素標示之部分可呈色檢測。

在另一具體實施例中，該引子經螢光標誌標示，例如有機螢光標誌，如螢光異硫氰酸鹽 (Fluoresceine isothiocyanate; FITC)，或無機螢光奈米顆粒，例如 Quantum DotsTM 或 Cy3 或 Cy5，可經由任何螢光掃描裝置或顯微鏡檢測。

在另一具體實施例中，本發明提供該引子及探針庫之用途，其中該分析為病原體檢測之即時 PCR。

外眼感染、眼內炎、或葡萄膜炎、或視網膜炎或腦膜腦炎之所有病原體之方法，包含：

- [a] 由罹患該感染之病患獲得臨床樣本；
- [b] 由步驟[a]所獲得之部分或全部樣本中萃取出 DNA；
- [c] 使用申請專利範圍第 1 項所主張之引子庫、以生物素或螢光示踪元素標示及 PCR 標準試劑，將步驟[b]所獲得之 DNA 進行多重引子 PCR；
- [d] 將步驟[c]所獲得之 PCR 產物變性；
- [e] 將步驟[d]所獲得之 PCR 產物與固定於固體基質上之靶雜交；及
- [f] 以酵素或螢光法在步驟[e]所獲得之固體基質上檢測 DNA 雜交物。

在另一具體實施例中，本發明提供一種套組，用於同步檢測引起外眼感染、眼內炎、或葡萄膜炎、或視網膜炎、或腦膜腦炎之所有病原體，其包含：

- a) 一前述之正向及反向引子庫；
- b) 一前述 DNA 靶之基質，其固定於一適當固體載體上；
- c) 增幅 DNA 之聚合酶連鎖反應所需之標準試劑；
- d) PCR 增幅產物與 DNA 探針之固定基質雜交所需之標準試劑；
- e) 檢測最終雜交產物所需之標準試劑，用以檢測及區別特定致病病原體。

在另一具體實施例中，本發明提供一種用於同步檢測引起外眼感染、眼內炎、或葡萄膜炎、或視網膜炎、或腦膜腦炎之所有病原體的方法，其包含：

[a] 由罹患該感染之病患獲得臨床樣本；

[b] 由步驟[a]所獲得之部分或全部樣本中萃取出 DNA；

[c] 使用前述引子庫、以生物素或螢光示踪元素標示及 PCR 標準試劑，將步驟[b]所獲得之 DNA 進行多重引子 PCR；

[d] 將步驟[c]所獲得之 PCR 產物變性；

[e] 將步驟[d]所獲得之 PCR 產物與前述固定於固體基質上之靶雜交；

[f] 以酵素或螢光法在固體基質上檢測步驟[e]所獲得之 DNA 雜交物。

【實施方式】

下列實施例提供作為說明本發明，因此不應被解釋為限制本發明之範圍。

實施例 1：

以分別可增幅腺病毒六鄰體(hexon)基因及砂眼披衣菌多形性蛋白 II 基因之引子組 9 及 18 進行多重引子 PCR，PCR 混合物含有正向及反向引子各 10 至 20 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 與 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 10 mM Tris-HCl pH 9.0、1.5 mM $MgCl_2$ 、5 mM

KCl、0.01%明膠、1 mM EDTA 及含 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子污染物，於 50°C 2 分鐘，於 94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。產物以 6% 洋菜膠分析，如第 1 圖所見，兩組基因被增幅，腺病毒之 1 pg 標準 DNA 及 10 fg 披衣菌 DNA 被用於增幅。

實施例 2：

以引子組 1、2 及 3 進行多重引子 PCR，其可分別增幅糖蛋白 D、UL 44 及 DNA 聚合酶基因。PCR 混合物含正向及反向引子各 10 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)、1.5 mM MgCl₂、5mM KCl、0.01%明膠、1mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子污染物，於 50°C 2 分鐘，於 94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。產物以 6%洋菜膠分析，如第 2 圖所見，三組基因全被增幅。

實施例 3

以引子組 1、2、3、9 及 17 進行多重引子 PCR，其分別可增幅 HSV 之糖蛋白 D 基因、UL 44 基因、DNA 聚合

酶基因、腺病毒六鄰體基因與砂眼披衣菌多形性蛋白 II 基因。PCR 混合物含正向及反向引子各 10 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 10 mM Tris-HCl(pH 9.0)、1.5 mM $MgCl_2$ 、5mM KCl、0.01%明膠、1mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子汙染物，50°C 2 分種，及 94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。上述 5 支 PCR 混合物試管與以下 DNA 製劑培養，其中管 NC 並不含任何 DNA，管 1 內含 1 皮克(pictogram)HSV DNA，管 2 內含 4 毫沙克(femtograms)砂眼披衣菌，管 3 內含 10 皮克腺病毒 DNA，而管 4 內含所有三種前述數量之 DNA。產物以 6%洋菜膠分析，如第 3 圖所見，三組基因全被增幅。

含 100 p mole SEQ ID No. 67、68、69、75 及 83 靶之 0.26 N NaOH 各點上 Nylon 膜(第 4 圖)。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE 將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶(Streptavidin peroxidase)結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二

氨基聯苯胺(Diaminobenzidine HCl)之磷酸鹽緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

實施例 4：

5 以引子組 13、14、15 及 16 進行多重引子 PCR，其可增幅結核分枝桿菌 MPB 64 基因、兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因、龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因與弓蟲 B1 基因，PCR 混合物含各正向及反向引子各 10 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶
10 之 50 mM Tris-HCl(pH 9.0)、1.5 mM $MgCl_2$ 、5mM KCl、0.01%明膠、1mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子汙染物，50°C 2 分種，及 94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，
15 然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。上述 5 支 PCR 混合物試管與以下 DNA 製劑培養，其中管 NC 並不含任何 DNA，管 1 內含 1 毫沙克結核分支桿菌 DNA，管 2 內含 100 毫沙克兩棲類分枝桿菌 DNA，管 3 內含 100 毫沙克龜型分枝桿菌 DNA，管 4 內含 1 毫沙克弓蟲 DNA。第 5 圖顯示五個尼龍
20 膜，其各點上含 100 p mole SEQ ID No 79、80、81 及 82 靶之 0.26 N NaOH。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE 將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 1 ml 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清

洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二氨基聯苯胺之磷酸鹽緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

實施例 5

以引子組 1、2、3、4、5、6、7 及 8 進行多重引子 PCR，其各可增幅 HSV 之糖蛋白 D 基因、UL 44 基因及 DNA 聚合酶基因、CMV 之糖蛋白 O 基因、形態轉化及 UL 88 基因、與 VZV 之 ORF 29 基因及 DNA 聚合酶基因。PCR 混合物含各正向及反向引子各 10 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 10 mM Tris-HCl(pH 9.0)、1.5 mM $MgCl_2$ 、5mM KCl、0.01%明膠、1mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子污染物，50°C 2 分鐘，及 94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。

上述 4 支 PCR 混合物試管與以下 DNA 製劑培養，其中管 NC 並不含任何 DNA，管 1 內含 1 皮克 HSV DNA，管 2 內含 10 皮克 CMV DNA 且管 3 內含 1 皮克 VZV DNA。第 6 圖顯示四個尼龍膜，其各點上含 100 p mole SEQ ID No

67、68、69、70、71、72、73 及 74 靶之 0.26 N NaOH。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE，將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於
 5 含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二氨基聯苯胺之磷酸鹽
 10 緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

實施例 6

以引子組 10、11、12、18、19、20、21 及 22 進行多
 15 重引子 PCR，其各可增幅真細菌基因組之 16s 核糖體 RNA 基因組 I 及 II、格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因、所有
 黴菌之 28s RNA 基因、瘰癧桿菌之 16s 核糖體 RNA 基因、格蘭氏陰性菌之 gyr B 基因、烏頭酸水合酶基因及核糖核
 酸酶基因。PCR 混合物含各正向及反向引子各 10 至 20
 20 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)、5 mM MgCl₂、5mM KCl、1%牛血清白蛋白、1 mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染。循環條件起始為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子汙染物，於 94°C 5 分鐘之

變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及於 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。上述 5 支 PCR 混合物試管與以下 DNA 製劑培養，其中管 NC 並不
 5 含任何 DNA，管 1 內含 5 fg E.coli 之 DNA，管 2 內含 10 fg 金黃色葡萄球菌 DNA、管 3 內含 10 fg 瘰癧桿菌 DNA，且管 4 內含 10 fg 白色念珠菌 DNA。第 7 圖顯示 5 張尼龍膜，其各點上含 100 p mole SEQ ID No 76、77、78、84、85、86、87 及 88 靶之 0.26 N NaOH。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE，將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅
 10 子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜
 15 以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二氨基聯苯胺之磷酸鹽緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

實施例 7

20 由屍體解剖 11 位死前罹患葡萄膜炎/視網膜炎的 AIDS 病患，收集之玻璃狀液接受多重引子 PCR 測試，之後在宏陣列上以增幅子鑑定。使用 QIAGEN DNA 純化套組由 100μl 之各玻璃體樣本萃取 DNA，於 50 μl 洗提緩衝液中重建 DNA。以引子組 1 至 23 進行多重引子 PCR，該引子

組可增幅單純疱疹病毒 1 及 2 糖蛋白 D、單純疱疹病毒 1 及 2 UL 44 基因、單純疱疹病毒 1 及 2 DNA 聚合酶基因、細胞巨大病毒糖蛋白 O 基因、細胞巨大病毒形態轉化基因、細胞巨大病毒 UL 88 基因、水痘帶狀疱疹 ORF 29、水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶基因、腺病毒六鄰體基因、真細菌 16s 核糖體 RNA 基因 I、真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II、格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分、結核分枝桿菌 MPB 64 基因、兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因、龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因、弓蟲 B 1 基因、砂眼披衣菌多形性蛋白 II、黴菌 28s 核糖體 RNA 基因特異性部分、瘰癧桿菌 16s-23s 核糖體 RNA 基因特異性部分、格蘭氏陰性菌 *gyr B* 基因特異性部分、格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因、格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 I 基因所有 23 組基因。

PCR 混合物含各正向及反向引子各 10 至 20 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 50 mM Tris-HCl(pH 9.0)、1.5 mM $MgCl_2$ 、5mM KCl、0.01%明膠、1mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染，與 10 μ l 由樣本萃取之 DNA。循環條件起始為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子汙染物，50°C 2 分鐘，94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。

以 23 組含序列 ID No 1-46 之引子，於 10-20 p moles/50

5 μ l 反應混合物之濃度，依上所述進行 PCR。在點上 SEQ ID No. 47-71 探針之尼龍膜上，將所有樣本之 PCR 產物雜交，尼龍膜各點上 100 p moles 含 SEQ ID No. 67-88 靶之 0.26 N NaOH。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE，將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二氨基聯苯胺之磷酸鹽緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

15 所獲得之結果簡述於表 1，所有 11 個樣本被鑑定為 HSV 視網膜炎及結核分枝桿菌葡萄膜炎，同時其中 10 名病患玻璃體內另有弓蟲。多重引子 PCR 及 DNA 宏陣列精確地鑑定所有樣本。

20 表 1: 由 AIDS 病患屍體解剖所收集之 11 個玻璃狀液樣本，使用多重引子 PCR 及於宏陣列上雜交進行同步檢測及區別病原體之結果

樣本鑑定編號	陽性反應微生物
A / 39 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 40 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲

A / 05 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 12 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 36 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 38 / 05	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 14 / 06	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 42 / 05	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 43 / 05	HSV、結核分枝桿菌、弓蟲
A / 49 / 05	HSV、TB

實施例 8

由屍體解剖 AIDS 病患所收集之 6 個 CSF 樣本於多重引子 PCR 測試，之後在宏陣列上測試。死亡原因確認為中樞神經系統感染，使用商業上可獲得之 QIAGEN DNA 純化套組，由 200 μ l 之樣本萃取 DNA，於 50 μ l 洗提緩衝液中重建 DNA。以引子組 1 至 23 進行多重引子 PCR，該引子組可增幅單純疱疹病毒 1 及 2 糖蛋白 D、單純疱疹病毒 1 及 2 UL 44 基因、單純疱疹病毒 1 及 2 DNA 聚合酶基因、細胞巨大病毒糖蛋白 O 基因、細胞巨大病毒形態轉化基因、細胞巨大病毒 UL 88 基因、水痘帶狀疱疹 ORF 29、水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶基因、腺病毒六鄰體基因、真細菌 16s 核糖體 RNA 基因 I、真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II、格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分、結核分枝桿菌 MPB 64 基因、兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因、龜型分枝桿菌 16s-23s RNA 基因、弓蟲 B 1 基因、

砂眼披衣菌多形性蛋白 II、黴菌 28s 核糖體 RNA 基因特異性部分、瘰癧桿菌 16s-23s 核糖體 RNA 基因特異性部分、格蘭氏陰性菌 gyr B 基因特異性部分、格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因、格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 I 基因所有 23 組基因。

PCR 混合物含各正向及反向引子各 10 至 20 pmole、d-ATP、d-UTP、d-CTP 及 d-GTP 各 200 μ M、含 2 單位 Taq 聚合酶之 50 mM Tris-HCl(pH 9.0)、1.5 mM $MgCl_2$ 、5 mM KCl、0.01%明膠、1 mM EDTA 及 1 單位 UDP 糖基化酶，以防止增幅子污染，與 10 μ l 由樣本萃取之 DNA。循環條件起始為 37°C 培養 30 分鐘以完全消化任何增幅子污染物，50°C 2 分鐘，94°C 5 分鐘之變性步驟，之後以 60°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒共 40 個循環，然後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。以 23 組含序列 ID No 1-46 之引子，於 10-20 p moles/50 μ l 反應混合物之濃度，依上所述進行 PCR。於點上 100 p moles 含 SEQ ID No. 67-88 靶之 0.26 N NaOH 的尼龍膜上，將所有樣本之 PCR 產物雜交。然後使用含 0.1% SDS 及 1% BSA 之 2X SSPE，將膜於 37°C 阻斷 1 小時。加熱增幅子至 95°C 10 分鐘，並混合於含 0.1% SDS 之 2X SSPE，且於 52°C 雜交 2 小時。雜交後，將膜於含 0.1% SDS 之 1X SSPE 清洗 5 次，每次各 3 分鐘。將膜與鏈黴抗生物素過氧化酶結合物培養於 0.1 M Tris-HCl(pH 7.4；含 1% BSA、150mM NaCl 及 0.3% tween-20)。於 37°C 30 分鐘後，將膜以相同緩衝液清洗 5 次，每次各 3 分鐘。為了

呈色，以每毫升含 0.5 mg 鹽酸二氨基聯苯胺之磷酸鹽緩衝液，將膜於 37°C 培養 10 分鐘，出現棕色點表示存在特定病原體。

5 表 2：由 AIDS 病患屍體解剖所收集之 6 個 CSF 樣本，使用多重引子 PCR 及於宏陣列上雜交進行同步檢測及區別病原體之結果

樣本診斷	試驗編號	陽性結果編號
HSV 腦炎	4	4
CMV 腦炎	2	2
VZV 腦炎	2	2
弓蟲腦炎	3	3
結核病腦膜炎	3	3

● 實施例 9

10 取得不同臨床診斷之 19 個水樣液或玻璃狀液之眼睛樣本，使用商業上可獲得之 DNA 萃取套組，由約 50-100 μ l 樣本萃取 DNA，並於 50 μ l 水中重建 DNA，並將 10 μ l 用於多重引子 PCR，包含 10 p 20 p moles 含 SEQ ID No 1-46 之各引子組 1-23。PCR 試劑組成物及熱循環條件與上述實
 15 施例 6 及 7 相同，增幅子與上述實施例所述之具有 SEQ ID No 67-88 之靶雜交。結果簡述於下，其可證實引子組及探

針之臨床應用。

表 3：由病患收集之水樣液或玻璃狀液之眼睛樣本，使用多重引子 PCR 及於宏陣列上雜交進行同步檢測及區別病原體之結果

樣本編號	臨床診斷	結果
1	病毒性視網膜炎	CMV
2	病毒性視網膜炎及葡萄膜炎	結核分枝桿菌、龜型分枝桿菌及 VZV
3	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
4	病毒性視網膜炎	HSV
5	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
6	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
7	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
8	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
9	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
10	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
11	感染性眼內炎及葡萄膜炎	黴菌感染
12	感染性眼內炎及葡萄膜炎	陰性
13	感染性眼內炎	瘰癧桿菌

14	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
15	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
16	感染性眼內炎及葡萄膜炎	真細菌及結核分枝桿菌
17	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌
18	感染性眼內炎	陰性
19	感染性眼內炎	真細菌及格蘭氏陽性菌

優點：

1. 高效能及省時套組。
2. 在非常早期感染的特定病原體鑑定將有助於醫師對於疾病擴展選擇適當之治療方法及照護。
3. 由相同樣本鑑定多重感染亦有助於使用藥物組合處理來有效治療。

【圖式簡單說明】

第 1 圖為 6% 洋菜膠電泳，顯示腺病毒六鄰體基因及砂眼披衣菌基因組之單一引子及多重引子 PCR 增幅產物。其中第 1 圖之欄位(lane)分別為：NC-陰性對照組；1-陽性對照組-腺病毒；2-陽性對照組-砂眼披衣菌；3-陽性對照組-多重引子 PCR(腺病毒及砂眼披衣菌)；MW-100 bp DNA 梯形條帶(ladder)。

第 2 圖為 4% 洋菜膠電泳，顯示單純疱疹病毒(HSV)之糖蛋白 D、DNA 聚合酶、UL-44 區的增幅產物。其中第

2 圖之欄位各為：NC-陰性對照組；1-陽性對照組-糖蛋白 D 區；2-陽性對照組-DNA 聚合酶區；3-陽性對照組-UL-44 區；MW-100 bp DNA 梯形條帶。

第 3 圖為 6% 洋菜膠電泳，顯示外眼感染之多重引子 PCR 增幅產物。其中第 3 圖之欄位各為：NC-陰性對照組；1-陽性對照組(HSV)；2-陽性對照組(砂眼披衣菌)；3-陽性對照組(腺病毒)；4-陽性對照組(所有三種基因組)；MW- ϕ X 174 DNA 之 *Hinf*I 消化物。

第 4 圖為與多重引子 PCR 之增幅子雜交，在尼龍膜上產生斑點之宏陣列照片，用以鑑定外眼感染，特別是鑑定 HSV、砂眼披衣菌、腺病毒之基因組。第 4 圖之 DNA 陣列，其由左至右為：以 DNA 探針噴點於尼龍膜上之模板。HSV-單純疱疹病毒顯示之點標示為 HGD = HSV 糖蛋白 D；HDP = HSV DNA 聚合酶；HUL = UL 44 基因；1st Comp. = HGD 互補股探針。CT-砂眼披衣菌；AV-腺病毒。NC-陰性對照組、HSV-與管 1 之增幅子雜交之膜，CT-與管 2 之增幅子雜交之膜；AV-與管 3 之增幅子雜交之膜。

第 5 圖為與多重引子 PCR 之增幅子雜交，在尼龍膜上產生斑點之宏陣列照片，用以檢測葡萄膜炎及其他受懷疑之分枝桿菌感染，特別是鑑定弓蟲、結核分枝桿菌、兩棲類分枝桿菌及龜型分枝桿菌之基因組。第 5 圖由左至右先為顯示於膜上點上靶之模板，MBT-結核分支桿菌，MBF-兩棲類分枝桿菌，MBC-龜型分枝桿菌，TG-弓蟲。其次，與陰性對照組試管雜交之 NC 標示為 NC，與管 1、2、3

及 4 所獲得之增幅子雜交之尼龍膜分別標示為 MBT、MBF、MBC 及 TG。

第 6 圖為與多重引子 PCR 之增幅子雜交，在尼龍膜上產生斑點之宏陣列照片，用以鑑定病毒性視網膜炎，特別是鑑定 HSV、CMV 及 VZV 之基因組。第 6 圖由左至右為顯示各尼龍膜上點上靶的模板，HSV-單純疱疹病毒顯示出 HGD = HSV 糖蛋白 D，HDP = HS DNA 聚合酶，HUL = UL 44 基因，1st Comp. = HGD 互補股探針；CMV-細胞巨大病毒顯示出 CMT = 形態轉化基因 II，CGO = 細胞巨大病毒糖蛋白 O，CUL = UL 83 基因，5th Comp = CMT 互補股探針；VZV-水痘帶狀疱疹病毒顯示出 VO = 水痘帶狀疱疹 ORF 29 基因，VDP = 水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶；與試管內容物雜交之 NC 膜標示為 NC，HSV-與獲自管 1 增幅子雜交之尼龍膜；CMV-與獲自管 2 增幅子雜交之尼龍膜，與 VZV-與獲自管 3 增幅子雜交之尼龍膜。

第 7 圖為與多重引子 PCR 之增幅子雜交，在尼龍膜上產生斑點之宏陣列照片，用以鑑定感染性眼內炎，特別是鑑定真細菌、格蘭氏陽性菌、格蘭氏陰性菌、痤瘡桿菌及黴菌之基因組。第 7 圖中，NC = 陰性控制組。GN 顯示出 ERR = 真細菌組 I 之 16s 核糖體 RNA 基因、ERW = 真細菌組 II 之 16s 核糖體 RNA 基因、GN 31 = 格蘭氏陰性 gyrB 基因、GN 67 = 格蘭氏陰性鳥頭酸水合酶基因、GN 87 = 格蘭氏陰性核糖核酸酶基因、GP = 格蘭氏陽性 16s 核糖體 RNA 基因、PA = 痤瘡桿菌 16s 核糖體 RNA 基因、PF = 黴菌

28s 核糖體 RNA 基因。左上角為用於點上探針之模板，NC 為與陰性控制組試管雜交之尼龍膜，GN、GP、PA 及 PF 為各與管 1、2、3 及 4 之增幅子雜交之膜。

5 【主要元件符號說明】

無

公告本

序列表

- <110> 印度科學與工業研究理事會
(COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH)
- <120> 眼睛與中樞神經系統之細菌、黴菌、寄生蟲及病毒感染之新穎同步檢測及鑑別方法
A NOVEL METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION AND DISCRIMINATION OF BACTERIAL, FUNGAL, PARASITIC AND VIRAL INFECTIONS OF EYE AND CENTRAL NERVOUS SYSTEM
- <130> LLS073 (210NF2006)
- <160> 88
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒(Herpes simplex virus)
- <400> 1
cgcttggtt cgcatggag 20
- <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒
- <400> 2
gccccagag acttgttga gg 22
- <210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒
- <400> 3
ggcaatcgtg tacgtgtcc g 21
- <210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒

<400> 4
cggggggggtc ttgcgttac 19

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒

<400> 5
caagctgacg gacattaca agg 23

<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒

<400> 6
gtcccacacg cgaaacacg 19

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒(Cytomegalovirus)

<400> 7
ttcgggtca tggcgtaac c 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 8
cgccctgctt ttacgttacg c 21

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒形態轉化基因
(Cytomegalovirus Morphological transformation gene)

<400> 9
cggcgacgac gacgataaag 20

<210> 10
<211> 23
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 10
caatctggtc gcgtaatcct ctg 23

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 11
gggcacgtcc tcgcagaag 19

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 12
ccaagatgca ggtgataggt gac 23

<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹 ORF 29(Varicella zoster ORF 29)

<400> 13
ggtcttgccg gagctggtat tac 23

<210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹 ORF 29

<400> 14
tgcctccgtg aaagacaaag aca 23

<210> 15
<211> 26

<212>	DNA	
<213>	水痘帶狀疱疹	
<400>	15	
	tccatttaac gttgcatcat ttgtg	26
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	水痘帶狀疱疹	
<400>	16	
	acgttccggt agcgagttat ctg	23
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	腺病毒	
<400>	17	
	cgccgccaac atgctctacc	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	腺病毒六鄰體(Hexon)基因	
<400>	18	
	gttgcgggag gggatggata	20
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	真細菌(eubacteria)16s 核糖體 RNA 基因區 I	
<400>	19	
	tgggctacac acgtgctaca atgg	24
<210>	20	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 I	
<400>	20	

cggactacga tcggtttgt gaga 24

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II

<400> 21
ggcctaacac atgcaagtcg agc 23

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II

<400> 22
ggcagattcc taggcattac tcacc 25

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分

<400> 23
acgtcaaate atcatgcccc cttat 25

<210> 24
<211> 22
<212> DNA
<213> 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分

<400> 24
tgcagccett tgtaccgtcc at 22

<210> 25
<211> 20
<212> DNA
<213> 結核分枝桿菌(Mycobacterium tuberculosis)

<400> 25
gcggaacgtg ggaccaatac 20

<210> 26

<211> 22
<212> DNA
<213> 結核分枝桿菌

<400> 26
cgacggggtg attttcttct tc 22

<210> 27
<211> 29
<212> DNA
<213> 兩棲類分枝桿菌(Mycobacterium fortuitum)

<400> 27
aacttttttg actgccagac acactattg 29

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 兩棲類分枝桿菌

<400> 28
ggatgccacc ccccaaaag 19

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 龜型分枝桿菌(Mycobacterium chelonae)

<400> 29
tggttactcg cttggtgaat atgt 24

<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> 龜型分枝桿菌

<400> 30
gacgttttgc cgactaccta tcc 23

<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> 弓蟲(Toxoplasma gondii)

<400> 31
cccctctgct ggcgaaaagt g 21

<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 弓蟲

<400> 32
ggcgaccaat ctgcgaatac ac 22

<210> 33
<211> 24
<212> DNA
<213> 砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)

<400> 33
aatcgatatc cggttaatg ttgc 24

<210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> 砂眼披衣菌

<400> 34
tcgaggaaaa ccgtatgaga aac 23

<210> 35
<211> 21
<212> DNA
<213> 28s 核糖體 RNA 基因

<400> 35
gctgggactg aggactgcga c 21

<210> 36
<211> 22
<212> DNA
<213> 28s 核糖體 RNA 基因

<400> 36
ttcaagacgg gcggcatata ac 22

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 痤瘡桿菌(*Propionibacterium acnes*)

<400> 37
 tggcgaacgg gtgagtaaca 20

<210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 痤瘡桿菌

<400> 38
 ccggtattag cccagtttc c 21

<210> 39
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因特異性部分

<400> 39
 cggcggcaag ttcgacgac 19

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因特異性部分

<400> 40
 ccaccgagac gcccacacc 19

<210> 41
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶(aconitate hydratase)基因

<400> 41
 ccaggtcggc ggagaagc 18

<210> 42
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因

<400> 42		
ccaccggccc gatgacc		17
<210> 43		
<211> 18		
<212> DNA		
<213> 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 1 基因		
<400> 43		
gccgccctga ccaccttc		18
<210> 44		
<211> 19		
<212> DNA		
<213> 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 1 基因		
<400> 44		
gcgggttggt cggcacacag		19
<210> 45		
<211> 87		
<212> DNA		
<213> 單純疱疹病毒		
<400> 45		
cgcttggttt cggatgggag gcaactgtgc tatccccatc acggtcatgg agtacaccga	60	
atgctcctac aacaagtctc tgggggc		87
<210> 46		
<211> 70		
<212> DNA		
<213> 單純疱疹病毒		
<400> 46		
ggcaatcgtg tacgtcgtcc gcacatcaca gtcgcggcag cgtcatcggc ggtaacgcaa	60	
gacccccccg		70
<210> 47		
<211> 79		
<212> DNA		
<213> 單純疱疹病毒		

<400> 47
caagctgacg gacattaca aggtccccct ggacgggtac ggccgcatga acggccgggg 60
cgtgtttcgc gtgtgggac 79

<210> 48
<211> 72
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 48
ttccggctca tggcgtaac caggtagaaa ctgtgtgtac agttgcgttg tgcgtaacgt 60
aaaagcaggg cg 72

<210> 49
<211> 65
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 49
cggcgacgac gacgataaag aatacaaagc cgcagtgtcg tccagaggat tacgcgacca 60
gattg 65

<210> 50
<211> 68
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 50
gggcacgtcc tcgcagaagg actccaggta caccttgacg tactggtcac ctatcacctg 60
catcttgg 68

<210> 51
<211> 79
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹

<400> 51
ggtcttgccg gagctggtat taccttaaaa ctactacca gtcatttcta tccatctgtc 60
tttgtcttc acggaggca 79

<210> 52
<211> 85
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹

<400> 52
tccatttaac gttgcatcat ttgtgttat catagaactg cgtaaact cggcaagtaa 60
tacagataac tcgtaccgg aacgt 85

<210> 53
<211> 70
<212> DNA
<213> 腺病毒
<400> 53
cgccgccaac atgctctacc ctataccgc caacgctacc aacgtgcca tatccatccc 60
ctcccgcaac 70

<210> 54
<211> 86
<212> DNA
<213> 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 I
<400> 54
tgggctacac acgtgctaca atggtcggtta cagagggctg ccaaaccgag aggtggagct 60
aatctcaca aaccgatcgt agtccg 86

<210> 55
<211> 86
<212> DNA
<213> 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II
<400> 55
ggcctaacac atgcaagtcg agcggatgaa aggagcttgc tcctggattc agcggcggac 60
gggtgagtaa tgcctaggaa tctgcc 86

<210> 56
<211> 71
<212> DNA
<213> 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因特異性部分

<400> 56

acgtcaaadc atcatgcccc cttatgacct gggctacaca cgtgctacaa tggacggtac 60

aaagggctgc a

71

<210> 57

<211> 84

<212> DNA

<213> 結核分枝桿菌

<400> 57

gcggaacgtg ggaccaatac ctgggttggg ccggctgctt cgggcagcaa ctccccggg 60

ttgaagaaga aaatcacccc gtcg

84

<210> 58

<211> 74

<212> DNA

<213> 兩棲類分枝桿菌

<400> 58

aactttttg actgccagac acactattgg gctttgagac aacaggcccc tgcccccttt 60

gggggggtggc atcc

74

<210> 59

<211> 70

<212> DNA

<213> 龜型分枝桿菌

<400> 59

tggttactcg ctgggtgaat atgtttata aatcctgtcc acccgtgga taggtagtcg 60

gcaaaacgtc

70

<210> 60

<211> 70

<212> DNA

<213> 弓蟲

<400> 60

cccctctgct ggcgaaaagt gaaattcatg agtatctgtg caactttggt gtattcgag 60

attggtcgcc

70

<210> 61

<211> 79

<212> DNA

<213> 砂眼披衣菌

<400> 61

aatcgtatct cgggtaatg ttgcatgatg ctttatcaaa tgacaagctt agatccgttt 60

ctcatacggg tttcctcga 79

<210> 62

<211> 68

<212> DNA

<213> 徵菌 28s 核糖體 RNA 基因之特異性部分

<400> 62

gctgggactg aggactgcga cgtaagtcaa ggatgctggc ataatggta tatgccgccc 60

gtcttgaa 68

<210> 63

<211> 77

<212> DNA

<213> 瘰癧桿菌

<400> 63

tggcgaacgg gtgagtaaca cgtgagtaac ctgccctga ctttgggata acttcaggaa 60

actggggcta ataccgg 77

<210> 64

<211> 68

<212> DNA

<213> 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因特異性部分

<400> 64

cggcggcaag ttgcagaca acacctacaa ggtgtccggc ggcttgcacg gtgtgggcgt 60

ctcgggtgg 68

<210> 65

<211> 66

<212> DNA

<213> 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶基因

<400> 65

ccaggtcggc ggagaagccg aggcaggcga ggtccttcag ttgtcgcgg gtcacgggc 60

cggtgg 66

<210> 66
<211> 64
<212> DNA
<213> 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶 1

<400> 66
gccgccctga ccaccttcat cagcctggcc ggccgttacc tgggtctgat gccgaacaac 60

ccgc 64

<210> 67
<211> 45
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒
<400> 67

gcaactgtgc tatcccatc acggtcatgg agtacaccga atgct 45

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒

<400> 68
cacatcacag tcgcggcagc gtcacggcg 30

<210> 69
<211> 37
<212> DNA
<213> 單純疱疹病毒
<400> 69

tccccctgga cgggtacggc cgcataaac gccgggg 37

<210> 70
<211> 31
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 70
aggtagaaac tgtgtgtaca gttgcgttgt g 31

<210> 71
<211> 22
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 71
aatacaaagc cgcagtgtcg tc 22

<210> 72
<211> 26
<212> DNA
<213> 細胞巨大病毒

<400> 72
gactccaggt acaccttgac gtactg 26

<210> 73
<211> 33
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹

<400> 73
cttaaaactc actaccagtc atttctatcc atc 33

<210> 74
<211> 36
<212> DNA
<213> 水痘帶狀疱疹

<400> 74
ttatcataga actgcgtaaa cactcggcaa gtaata 36

<210> 75
<211> 30
<212> DNA
<213> 腺病毒

<400> 75
ctataccgcg caacgtacc aacgtgccca 30

<210> 76
<211> 38
<212> DNA
<213> 真細菌 16s 核糖體基因區 I

<400> 76	
tcggtacaga gggtcgcca accgcgaggt ggagctaa	38
<210> 77	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 真細菌 16s 核糖體基因區 II	
<400> 77	
ggatgaaagg agcttgctcc tggattcagc ggcggacg	38
<210> 78	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 格蘭氏陽性微生物 16s 核糖體基因	
<400> 78	
gacctgggct acacacgtgc taca	24
<210> 79	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 結核分枝桿菌	
<400> 79	
ctgggttggg ccggtgctt cgggcagcaa ctccccggg tt	42
<210> 80	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 兩棲類分枝桿菌	
<400> 80	
ggctttgaga caacaggccc gtgccc	26
<210> 81	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 龜型分枝桿菌	
<400> 81	
tttataaatc ctgtccacc cgt	23

<210> 82
<211> 27
<212> DNA
<213> 弓蟲

<400> 82
aaattcatga gtatctgtgc aactttg

27

<210> 83
<211> 32
<212> DNA
<213> 砂眼披衣菌

<400> 83
atgatgcttt atcaaatgac aagcttagat cc

32

<210> 84
<211> 25
<212> DNA
<213> 徽菌 28s 核糖體 RNA 基因

<400> 84
gtaagtcaag gatgctggca taatg

25

<210> 85
<211> 26
<212> DNA
<213> 瘰癧桿菌

<400> 85
gcttcagcgc cgtcagcgag gataac

26

<210> 86
<211> 30
<212> DNA
<213> 格蘭氏陰性微生物促旋酶(gyrase)基因

<400> 86
aacacctaca aggtgtccgg cggettgcac

30

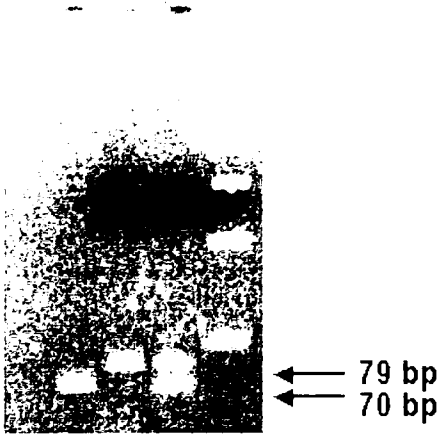
<210> 87
<211> 31
<212> DNA

<213> 格蘭氏陰性微生物烏頭酸水合酶基因

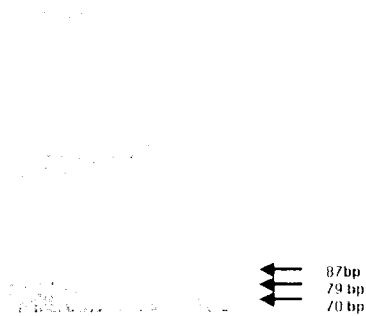
<400> 87
cgaggcaggc gaggtccttc agttcgtcgc g 31

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> 格蘭氏陰性微生物核糖核酸酶基因

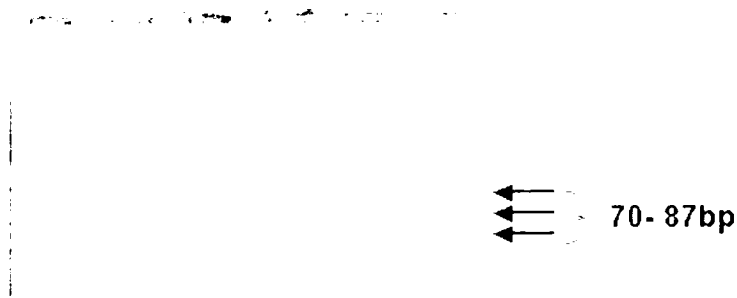
<400> 88
atcagcctgg ccggccgtta cctggtg 27



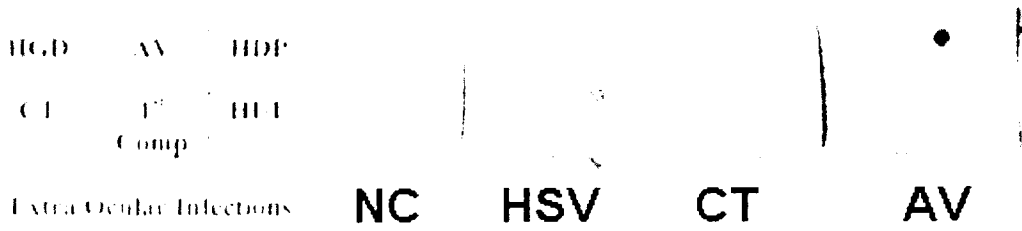
第 1 圖



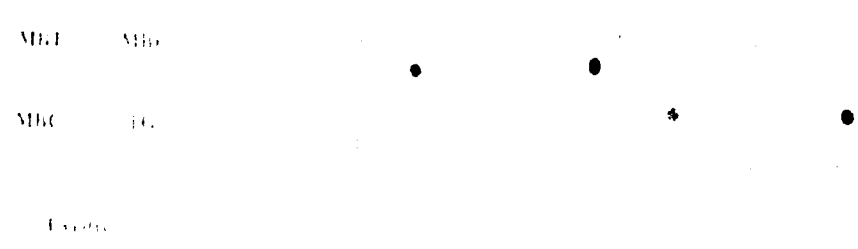
第 2 圖



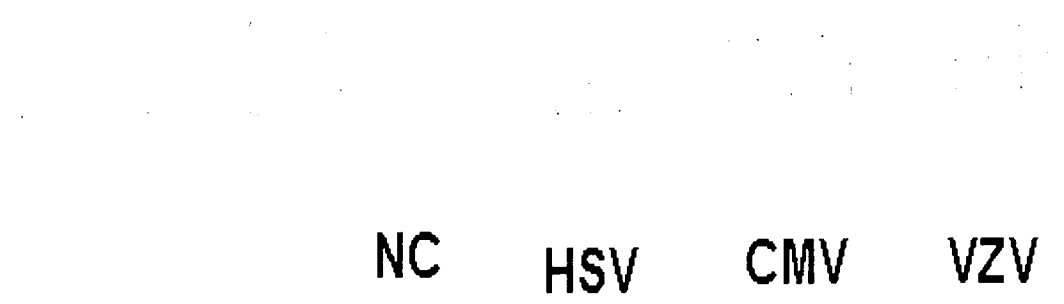
第 3 圖



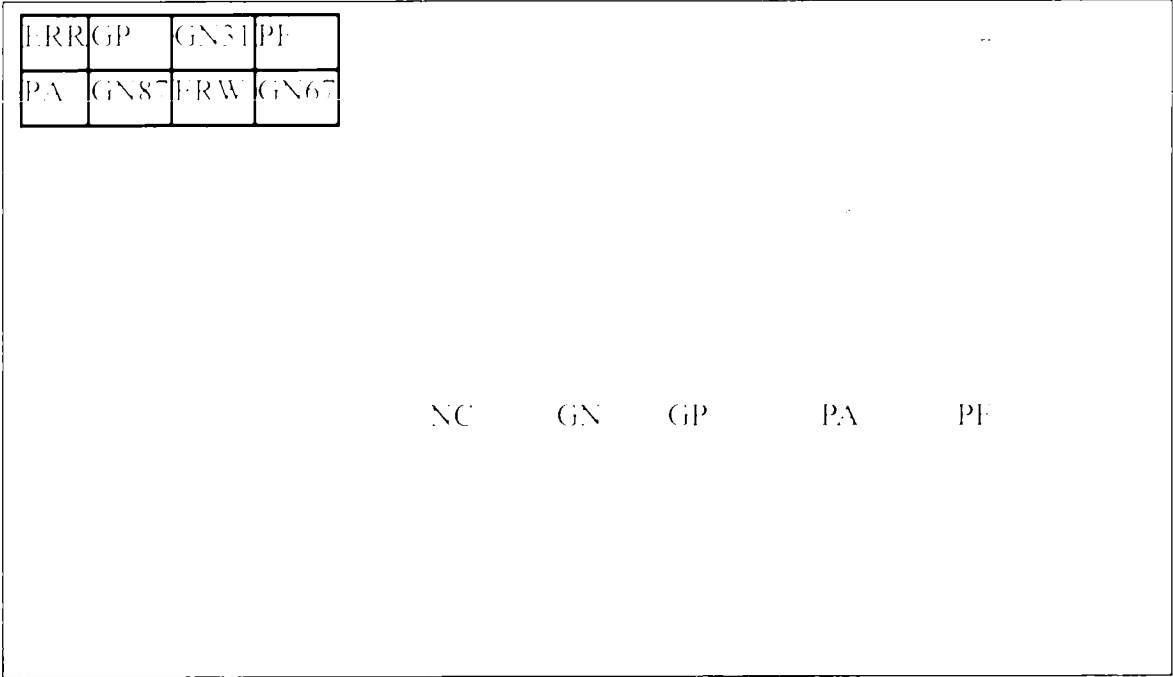
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

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】

本發明係關於一種診斷方法，用於在許多可能引起感染之病原體間，鑑定眼與神經系統感染之單一病原體或一種以上之病原體。所有侵襲眼睛或神經系統之個別區域的病原體一般都會引起相同的臨床徵狀或症候群。本發明係關於可在一組可能之病原體間，不需依賴一系列各別針對檢測單一病原體之試驗，於單一試驗中檢測及區別病原體。本發明之目的在於以症候群基礎診斷取代依個別病原體檢測之診斷。

【先前技術】

根據解剖學上腔室的蓄留及因此所造成之感染可將眼睛感染臨床分類，許多可引起眼感染的病原體被詳細敘述於“Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th Edition, Gerald Mandell et al (Eds) Elsevier Churchill Livingston, pp 1387-1418 (2005)”，該揭示於本文中一併作為參考。

眼睛感染可根據臨床初步診斷分類成以下種類：

1. 外眼感染，例如角膜炎及結膜炎
2. 感染性眼內炎
3. 葡萄膜炎
4. 視網膜炎

許多外眼感染由數種細菌及黴菌引起，事實上，由結

難以和以下所引起之慢性腦膜炎區別，

- 結核分枝桿菌
- 各種黴菌
- 由一系列治療性馴化病毒引起之病毒性腦炎，即
5 HSV、CMV 及 VZV

腦炎一般由各種地區性及流行性病毒引起。然而，單純疱疹、細胞巨大病毒及水痘帶狀疱疹可使用特定抗病毒療法，其他可治療之腦炎病原為弓蟲。

在臨床樣本中檢測病原體(細菌、酵母菌與其他黴菌、
10 寄生蟲及病毒)之典型方法包含樣本培養，以便擴大病原體數目成為可觀察之菌落生長，然後可以標準實驗室試驗鑑定及計數。如果需要，培養物亦可提供為其他試驗以便決定病原體對於藥物治療之敏感性。為了精確鑑定感染種類，臨床醫師必須依賴培養結果，其在任何地方皆需要 3
15 日(就多數細菌而言，包括快速生長之分枝桿菌)至 8 週(就結核分枝桿菌而言)。為了精確鑑定細菌種類，培養物後續經由大規模的生化試驗，此另需要數日或甚至數週。因為疾病之嚴重性以及立即的藥物介入之必要性，快速做此確認甚為重要。本文中所提及之培養技術大部分用於細菌感
20 染及黴菌感染之診斷，且如果是病毒感染，其通常不被用於診斷目的，特別是因為經由臨床樣本培養之病毒分離頻率低於 15%。

對於例如眼睛感染及神經系統感染之診斷，適當樣本為下列症候群病原檢測診斷成功的另一關鍵問題，例如角

【發明內容】

發明簡述

本發明提供一套化學標記病原體特定正向及反向引子，該引子獨特設計在多重引子聚合酶連鎖反應中，於 95°C 變性溫度、58 至 65°C 之黏接溫度及於 72°C 延伸，由病原體特異性增幅靶序列。本發明亦提供一套衍生自病原體特異性基因之靶 DNA 序列，該基因固定於惰性載體上，並與使用病原體特定正向及反向 PCR 引子所獲得之 PCR 增幅產物特異性雜交。

本發明提供一種快速分析法，用於同步檢測眼睛及中樞神經系統感染之病原體，該感染之免疫學參數並無指示出主動感染，僅指示顯露病原體，且依例如細菌及黴菌培養之傳統微生物學分析，其敏感性皆不足以檢測病原體，或不夠快速地在 48 小時內鑑定病原體。

本發明結合 PCR 分析之高敏感性與雜交鑑定之高特異性，在宏陣列(macroarray)上，經色彩檢測法雜交檢測，其最終結果可經由裸眼監測。然而，亦可使用螢光標記，例如 Quantum Dots、Cy3、Cy5、FITC，且產物可經由螢光顯微鏡看見。

本發明之特徵為一種多重引子(multiplex)分析，用於同步檢測及區別引起眼睛及 CNS 感染之病原體，其包含：

- i) 處理臨床樣本，例如由被懷疑受眼睛或 CNS 感染侵襲之病患所收集之角膜抹片，或結膜擦試片，或水樣液，或玻璃狀液，或玻璃體手術收集之灌洗液，或腦脊髓液

8. 水痘帶狀疱疹 DNA 聚合酶基因
9. 腺病毒 Hexon 基因
10. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因 I
11. 真細菌 16s 核糖體 RNA 基因區 II
- 5 12. 格蘭氏陽性菌 16s 核糖體 RNA 基因之特異性部分
13. 結合分枝桿菌 MPB64 基因
14. 兩棲類分枝桿菌 16s-23s RNA 基因
15. 龜鱉分枝桿菌 16s-23s RNA 基因
16. 弓蟲 B1 基因
- 10 17. 砂眼披衣菌多形性蛋白 II
18. 黴菌 28s 核糖體 RNA 基因之特異性部分
19. 瘰癧桿菌 16s-23s 核糖體 RNA 基因之特異性部分
20. 格蘭氏陰性菌 gyr B 基因之特異性部分
21. 格蘭氏陰性菌烏頭酸水合酶(aconitate hydratase)
- 15 基因

22. 格蘭氏陰性菌核糖核酸酶基因

為了進一步改善檢測一些微生物之確實性，例如單純疱疹 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹及格蘭氏陰性菌，各微生物選擇一個以上之基因用於增幅之目的。在單
20 純疱疹 1 及 2 與細胞巨大病毒之情況，各微生物選擇三種不同基因，而水痘帶狀疱疹則選擇二種基因。

疱疹病毒之 DNA 聚合酶基因為一種對於 PCR 敏感之基因，且使用於不同之研究。在第一種研究中，使用 95°C 變性 45 秒鐘、64°C 黏接 45 秒、及 72°C 延伸 45 秒之熱循

環條件增幅 179 bp 產物(Madhavan HN et al, Detection of simplex virus(HSV) using polymerase chain reaction (PCR) in clinical samples Comparison of PCR with standard laboratory methods for the detection of HSV, J. Clin. Virol. 14 : 145-151 (1999))。而在另一研究中，使用不同套引子並於 95°C 變性 45 秒鐘、於 60°C 黏接 45 秒、及於 72°C 延伸 45 秒之熱循環條件增幅相同基因之 469 及 391 bp 區域(Madhavan HN et al, Phenotypic and Genotypic methods for the detection of simplex virus serotypes. J. Virol. Methods, 108 : 97-102. (2003))。當檢測不同病毒時，例如就 PCR 用於 HSV、CMV 及 VZV 以鑑定眼睛感染而言，使用不同熱條件的任何方式(Priya K et al, Association of herpes viruses in aqueous humour of patients with serpigenous choroiditis : a polymerase chain reaction based study, Ocular Immunology and Inflammation 9 : 1-9 (2003))。在此研究中，反應條件及引子濃度依不同病毒而不同，因此可顯見，為了能在所給予之臨床樣本中，進行可快速檢測及區別一或多種病原體的單管多重引子 PCR 反應，對於一組已知病原體設計引子及特異性靶序列是十分困難。

因此，必須考慮探究使用已知的生物資訊方法，設計與 PCR 增幅產物互補之適當 PCR 引子及靶 DNA 序列的可能性。

為了達到此一目的，本發明之發明者首先決定下列較佳地進行多重引子 PCR 反應以檢測 HSV、CMV 及 VZV

的條件，即於 95°C 變性，之後於 58°C -65°C 黏接，然後於 72°C 延伸。因此，獲得特異性靶 DNA 序列之 PCR 增幅產物，該產物與固定在固相基質之各病原體的理想雜交溫度固定在 48°C 至 55°C。故，必須考慮設計一組靶 DNA 序列用於各該病原體，特定 PCR 增幅產物與其互補之靶 DNA 序列在相同溫度雜交，而不會造成 DNA 序列之非特異性結合。

在設計多重引子 PCR 反應之引子上，最困難的要素為在此方法中設計引子全部具有相同融化溫度，以便在相同熱循環條件下能夠增幅所有基因。

增幅用引子組由上述基因序列中選擇，以致於所有引子具有黏接溫度範圍為 58-65°C，因而所有 23 個基因可在相同試管中使用 PCR 增幅，在該特定病原體之所有品系或血清型中維持不變。

不同大小的增幅子可妨礙以 PCR 法多重引子增幅之效率，因此，選擇引子之第二標準為固定相同大小之增幅子於 66-90 個核苷酸範圍內。上節中所述之所有基因選擇含 66-90 bp 長度(包括引子序列)之範圍。

為保持融化溫度一致，引子長度在 17 至 29 個鹼基對之間變化。

此外，在多重引子反應中，因存在互補區而使引子中形成環或交叉雜交，其可干擾 PCR 增幅。為避免所有此類阻礙，謹慎地設計所有引子，以完全排除其中引子之環的形成或交叉雜交。小心避免經引子組之任何非特異性(交叉

Anand A Ret al Use of polymerase chain reaction (PCR) and DNA probe hybridization to determine the gram reaction of the interacting bacterium in the intraocular fluids of patients with endophthalmitis. Journal of Infection, 41 : 221-226 (2000); Anand AR et al. Use of polymerase Chain reaction in fungal endophthalmitis Ophthalmology 108 : 326-330 (2001), 使用相同準則選擇不同套之引子, 即使一些引子於 58°C 黏接, 實驗上需保證所有引子在 60°C 有良好之增幅。

本具體實施例在小心評估後, 選擇下列獨特引子, 並用於檢測及區別病原體。這些序列為獨特的, 並且為此項技藝上所未知的。

1. 單純疱疹病毒 1 及 2 糖蛋白 D 基因, 經含 SEQ ID No 1 及 2 之引子組 1 增幅, FP: 5' cgcttggtttcggatgggag 3' (SEQ ID No.1)及 RP: 5' gccccagagacttggttagg 3' (SEQ ID No.2)。

2. 單純疱疹病毒 1 及 2 UL 44 基因, 經含 SEQ ID No 3 及 4 之引子組 2 增幅, FP: 5' ggcaatcgtgtacgtcgtccg 3' (SEQ ID No.3)及 RP: 5' cgggggggtcttgcgttac 3' (SEQ ID No.4)。

3. 單純疱疹病毒 1 及 2 DNA 聚合酶基因, 經含 SEQ ID No 5 及 6 之引子組 3 增幅, FP: 5' caagctgacggacatttacaagg 3'(SEQ ID No.5)及 RP: 5' gtccacacgcgaaacacg 3'(SEQ ID No.6)。

在另一具體實施例中，本發明提供該引子及探針庫之用途，其中該分析為於臨床樣本中定量病原體之即時 PCR，用以監控預後或疾病治療。

5 在另一具體實施例中，本發明提供該引子庫之用途，其中可以宏陣列或墨點法(slot blot)或線性探針分析之型式偵測增幅產物。

在另一具體實施例中，本發明提供一種由固定於一固相物之探針構成之宏陣列，該固相物包含硝化纖維、尼龍、荷電尼龍、玻璃或聚苯乙烯。

10 在另一具體實施例中，本發明提供一種檢測及區別病原體之方法，該病原體引起例如感染性眼內炎、或角膜炎、或葡萄膜炎、或視網膜炎、或腦膜炎之症候群，其中偵測之病原體為單純疱疹病毒 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹病毒、腺病毒、真細菌、格蘭氏陽性微生物、
15 格蘭氏陰性菌、黴菌、結核分枝桿菌、龜鱉分枝桿菌、兩棲類分枝桿菌、弓蟲、砂眼披衣菌。

在另一具體實施例中，本發明提供一種在引起具有相似症狀之眼睛或神經系統疾病的可能病原體群組中，檢測個別病原體之方法。

20 在另一具體實施例中，本發明提供一種選擇使用少數或所有前述引子之任何多重引子 PCR 分析，其中調查由一些或所有該微生物引起之任何臨床症候群，以檢測存在於臨床樣本中任一個別病原體或病原體群組。

在另一具體實施例中，本發明提供一種同步檢測引起

五、中文發明摘要：

本發明係關於一種診斷方法，其用於在許多可引起感染之可能病原體中，鑑定單一或多於一種眼及神經系統感染之病原體。感染眼睛或神經系統之分別區域的所有病原體一般引起相同的臨床表現或症候群。本發明係關於一種可在一組可能病原體間，於單一試驗檢測及區別病原體，無需採用各別針對一個病原體之一套試驗。本發明之目的在於以症候群基礎診斷取代依個別病原體檢測之診斷。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to the diagnostic methods for identification of the single causative agent or more than one causative agent of ocular and nervous system infections among many probable pathogens, which can cause the infection. All the pathogens affecting a discrete area of eye or nervous system generally cause same clinical manifestations or syndromes. The present invention relates to detection and discrimination of the pathogen among the set of probable pathogens in a single test without resorting to a battery of tests each being directed at detection of one pathogen. The current invention aims at the syndrome based diagnostic replacing the diagnostics based on detection of individual pathogens.

十、申請專利範圍：

1. 一種用於偵測及區別引起症候群病原體之引子組之組合，
其中，該組合包含兩組以上之引子組，係專一性地偵測
及區別兩種以上之病原體，其中，該引子組係選自由下
列所成群組：

第 1 組為 FP : 5' cgcttggtttcgatgggag 3'(SEQ ID
No.1)、

RP : 5' gccccagagacttggttagg 3'(SEQ ID
No.2)；

第 2 組為 FP : 5' ggcaatcgtgtacgtcgtccg 3'(SEQ ID
No.3)、

RP : 5' cgggggggtcttgcgttac 3'(SEQ ID
No.4)；

第 3 組為 FP : 5' caagctgacggacatttacaagg 3'(SEQ ID
No.5)、

RP : 5' gtcccacacgcgaaacacg 3'(SEQ ID
No.6)；

第 4 組為 FP : 5' ttccggctcatggcgttaacc 3'(SEQ ID
No.7)、

RP : 5' cgccctgcttttacgttacgc 3'(SEQ ID
No.8)；

第 5 組為 FP : 5' cggcgacgacgacgataaag 3'(SEQ ID
No.9)、

RP : 5' caatctggtcgcgtaatcctctg 3'(SEQ ID
No.10)；

第 6 組為 FP : 5' gggcacgtcctcgcagaag 3'(SEQ ID
No.11) 、

RP : 5' ccaagatgcaggtgataggtgac 3'(SEQ ID
No.12) ;

第 7 組為 FP : 5' ggtcttgccggagctggtattac 3'(SEQ ID
No.13) 、

RP : 5' tgcctccgtgaaagacaaagaca 3'(SEQ ID
No.14) ;

第 8 組為 FP : 5' tccatttaacgttgcatcattttgtg 3'(SEQ ID
No.15) 、

RP : 5' acgttccggtagcgagttatctg 3'(SEQ ID
No.16) ;

第 9 組為 FP : 5' cgccgccaacatgctctacc 3'(SEQ ID
No.17) 、

RP : 5' gttgcgggaggggatggata 3'(SEQ ID
No.18) ;

第 10 組為 FP : 5' tgggctacacacgtgctacaatgg 3'(SEQ
ID No.19) 、

RP : 5' cggactacgatcggttttgtgaga 3'(SEQ ID
No.20) ;

第 11 組為 FP : 5' ggcctaacacatgcaagtcgagc 3'(SEQ ID
No.21) 、

RP : 5' ggcagattcctagggcattactcacc 3'(SEQ ID
No.22) ;

第 12 組為 FP : 5' acgtcaaatacatcatgcccccttat 3'(SEQ ID No.23) 、

RP : 5' tgcagcccctttgtaccgtccat 3'(SEQ ID No.24) ;

第 13 組為 FP : 5' gcggaacgtgggaccaatac 3'(SEQ ID No.25) 、

RP : 5' cgacgggggtgattttcttcttc 3'(SEQ ID No.26) ;

第 14 組為 FP : 5' aacttttttgactgccagacacactattg 3'(SEQ ID No.27) 、

RP : 5' ggatgccaccccccaaaag 3'(SEQ ID No.28) ;

第 15 組為 FP : 5' tggttactcgcttggtgaatatgt 3'(SEQ ID No.29) 、

RP : 5' gacgttttgccgactacctatcc 3'(SEQ ID No.30) ;

第 16 組為 FP : 5' cccctctgctggcgaaaagtg 3'(SEQ ID No.31) 、

RP : 5' ggcgaccaatctgcgaatacac 3'(SEQ ID No.32) ;

第 17 組為 FP : 5' aatcgtatctcgggttaatgttgc 3'(SEQ ID No.33) 、

RP : 5' tcgaggaaaaccgtatgagaaac 3'(SEQ ID No.34) ;

第 18 組為 FP : 5' gctgggactgaggactgcgac 3'(SEQ ID No.35)、

RP : 5' ttcaagacgggcggcatataac 3'(SEQ ID No.36) ;

第 19 組為 FP : 5' tggcgaacgggtgagtaaca 3'(SEQ ID No.37)、

RP : 5' ccggtattagccccagtttcc 3'(SEQ ID No.38) ;

第 20 組為 FP : 5' cggcggcaagttcgacgac 3'(SEQ ID No.39)、

RP : 5' ccaccgagacgcccacacc 3'(SEQ ID No.40) ;

第 21 組為 FP : 5' ccaggtcggcggagaagc 3'(SEQ ID No.41)、

RP : 5' ccaccggcccgatgacc 3'(SEQ ID No.42) ;

第 22 組為 FP : 5' gccgccctgaccaccttc 3'(SEQ ID No.43)、

RP : 5' gcgggttggttcggcatcag 3'(SEQ ID No.44) ;

其中，各病原體係引起至少一種症候群。

2. 如申請專利範圍第 1 項之引子組之組合，其中，該病原體係選自由單純疱疹病毒 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹病毒、腺病毒、真細菌(Eubacteria)、格蘭氏陽性菌、格蘭氏陰性菌、黴菌、結核分枝桿菌

(*Mycobacterium tuberculosis*)、龜鰲分枝桿菌(*Mycobacterium chelonae*)、兩棲類分枝桿菌(*Mycobacterium fortuitum*)、弓蟲(*Toxoplasma gondii*)、及砂眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)所成群組。

3. 如申請專利範圍第 1 項之引子組之組合，其中，該症候群係選自由感染性眼內炎、角膜炎、葡萄膜炎、視網膜炎、腦膜炎、腦膜腦炎所成群組。

4. 如申請專利範圍第 1 項之引子組之組合，其中，

由第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、第 2 組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組[(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 4 組[(SEQ ID No.7)及(SEQ ID No.8)]、第 5 組[(SEQ ID No.9)及(SEQ ID No.10)]、第 6 組[(SEQ ID No.11)及(SEQ ID No.12)]、第 7 組[(SEQ ID No.13)及(SEQ ID No.14)]、及第 8 組[(SEQ ID No.15)及(SEQ ID No.16)]所組成之組合係用以偵測病毒性視網膜炎；或

由第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、第 2 組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組[(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 9 組[(SEQ ID No.17)及(SEQ ID No.18)]、及第 17 組[(SEQ ID No.33)及(SEQ ID No.34)]所組成之組合係用以偵測角膜結膜炎；或

由第 13 組[(SEQ ID No.25)及(SEQ ID No.26)]、
第 14 組[(SEQ ID No.27)及(SEQ ID No.28)]、第 15
組[(SEQ ID No.29)及(SEQ ID No.30)]、第 16 組
[(SEQ ID No.31)及(SEQ ID No.32)]所組成之組合係
用以偵測葡萄膜炎；或

由第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID No.20)]、
第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID No.22)]、第 12
組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID No.24)]、第 18 組
[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]、第 19 組[(SEQ
ID No.37)及(SEQ ID No.38)]、第 20 組[(SEQ ID
No.39)及(SEQ ID No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)
及(SEQ ID No.42)]、及第 22 組[(SEQ ID No.43)及
(SEQ ID No.44)]所組成之組合係用以偵測感染性眼內
炎；或

由第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、第 2
組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組[(SEQ
ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 4 組[(SEQ ID No.7)及
(SEQ ID No.8)]、第 5 組[(SEQ ID No.9)及(SEQ ID
No.10)]、第 6 組[(SEQ ID No.11)及(SEQ ID No.12)]、
第 7 組[(SEQ ID No.13)及(SEQ ID No.14)]、第 8 組
[(SEQ ID No.15)及(SEQ ID No.16)]、第 13 組[(SEQ
ID No.25)及(SEQ ID No.26)]、第 16 組[(SEQ ID
No.31)及(SEQ ID No.32)]、及第 18 組[(SEQ ID

No.35)及(SEQ ID No.36)]所組成之組合係用以偵測腦膜腦炎；或

由第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID No.20)]、第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID No.22)]、第 12 組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID No.24)]、第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]、第 20 組[(SEQ ID No.39)及(SEQ ID No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)及(SEQ ID No.42)]、及第 22 組[(SEQ ID No.43)及(SEQ ID No.44)]所組成之組合係用以偵測格蘭氏陽性菌/格蘭氏陰性菌；或

由第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID No.20)]、第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID No.22)]、第 12 組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID No.24)]、第 13 組[(SEQ ID No.25)及(SEQ ID No.26)]、第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]、第 20 組[(SEQ ID No.39)及(SEQ ID No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)及(SEQ ID No.42)]、及第 22 組[(SEQ ID No.43)及(SEQ ID No.44)]所組成之組合係用以區別急性及慢性腦炎。

5. 如申請專利範圍第 1 項之引子組之組合，其中，由第 1 至 22 組(SEQ ID No.1 至 44)所組成之組合係用以偵測單純疱疹病毒 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹病毒、腺病毒、真細菌、格蘭氏陽性菌、格蘭氏陰性菌、

黴菌、結核分枝桿菌、龜鱉分枝桿菌、兩棲類分枝桿菌、弓蟲、及砂眼披衣菌之一個以上之目標核酸。

6. 如前述申請專利範圍任一項之引子組之組合，其所用樣本係選自水樣液、玻璃狀液或玻璃體灌洗液、角膜抹片、結膜擦布、腦脊髓液、血液、及血漿所成群組。
7. 如前述申請專利範圍第 1 項之引子組之組合，其中，該引子係於 5' 端以生物素部分標示，而經由形成呈色產物檢測；或

該引子經由螢光標記標示，該螢光標記為有機螢光標誌，選自螢光異硫氰酸鹽(FITC)所成群組，或無機螢光奈米顆粒，包括 Quantum DotsTM、Cy3、Cy5，其係經由任何螢光掃描裝置或顯微鏡檢測。

8. 一種病原體特定 DNA 探針序列之組合，用於偵測及區別兩種以上之病原體，其中，該組合包含兩組以上之探針組，其中，該 DNA 探針序列為使用申請專利範圍第 1 項所述之引子組之增幅產物，其係選自由下列所成群組：

(1) 探針 DNA 序列

“cgcttggtttcggatgggaggcaactgtgctatccccatcacggtcattgagtagacaccgaatgctcctacaacaagtctctgggggc” (SEQ ID No. 45)、

(2) 探針 DNA 序列

“ggcaatcgtgtacgtcgtccgcacatcacagtcgcggcagcgtcatcggcggtaacgcaagaccccccccg” (SEQ ID No. 46)、

(3) 探針 DNA 序列

“caagctgacggacatttacaagggtccccctggacgggtacggccgcatg
aacggccggggcggtgtttcgcggtgtgggac” (SEQ ID No. 47)、

(4) 探針 DNA 序列

“ttccggctcatggcggttaaccaggtagaaactgtgtgtacagttgcgttgt
gcgtaacgtaaaagcagggcg” (SEQ ID No. 48)、

(5) 探針 DNA 序列

“cggcgacgacgacgataaagaatacaaaagccgcagtgctcgtccagagg
attacgcgaccagattg” (SEQ ID No.49)、

(6) 探針 DNA 序列

“gggcacgtcctcgcagaaggactccaggtacaccttgacgtactggtea
cctatcacctgcatcttgg” (SEQ ID No.50)、

(7) 探針 DNA 序列

“ggtcttgccggagctggtattaccttaaaactcactaccagtcatttctatc
catctgtctttgtctttcacggaggca” (SEQ ID No. 51)、

(8) 探針 DNA 序列

“tccatttaacgttgcattttgtgttatcatagaactgcgtaaactcgg
caagtaatacacgataactcgctaccggaacgt” (SEQ ID No. 52)、

(9) 探針 DNA 序列

“cgccgccaacatgctctaccctatacccgccaacgctaccaacgtgcca
tatccatccccctcccgcaac” (SEQ ID No. 53)、

(10) 探針 DNA 序列

“tgggctacacacgtgctacaatggtcggtacagagggtcgccaaaccgc

gaggtggagctaatctcacaaaaccgatcgtagtccg” (SEQ ID No. 54)、

(11) 探針 DNA 序列

“ggcctaacacatgcaagtcgagcggatgaaaggagcttgctcctggatt
cagcggcggacgggtgagtaatgcctaggaatctgcc” (SEQ ID No. 55)、

(12) 探針 DNA 序列

“acgtcaaatcatcatgcccccttatgacctgggctacacacgtgctacaat
ggacgggtacaaagggctgca” (SEQ ID No. 56)、

(13) 探針 DNA 序列

“gcggaacgtgggaccaataacctgggttgggccggctgcttcgggcagc
aactcccccggttgaagaagaaaatcaccccgctcg” (SEQ ID No. 57)、

(14) 探針 DNA 序列

“aacttttttgactgccagacacactattgggctttgagacaacaggcccgt
gccccttttggggggtggcatcc” (SEQ ID No. 58)、

(15) 探針 DNA 序列

“tggttactcgcttggtgaatatgttttataaatcctgtccaccccgtaggata
ggtagtcggcaaaacgtc” (SEQ ID No. 59)、

(16) 探針 DNA 序列

“cccctctgctggcgaaaagtgaattcatgagtatctgtgcaactttgggtg
tattegcagattggctgcc” (SEQ ID No. 60)、

(17) 探針 DNA 序列

“aatcgatatctcgggttaatgttgcatgatgctttatcaaatagacaagcttag

atccgtttctcatcacggttttcctcga” (SEQ ID No. 61) 、

(18) 探針 DNA 序列

“gctgggactgaggactgcgacgtaagtcaaggatgctggcataatggtt
atatgccgcccgtcttgaa” (SEQ ID No. 62) 、

(19) 探針 DNA 序列

“tggcgaacgggtgagtaacacgtgagtaacctgcccttgactttgggata
acttcaggaaactggggctaataccgg” (SEQ ID No. 63) 、

(20) 探針 DNA 序列

“cggcggcaagttcgacgacaacacctacaagggtgtccggcggcttgca
cgggtgtgggcgtctcggtgg” (SEQ ID No. 64) 、

(21) 探針 DNA 序列

“ccaggtcggcggagaagccgaggcaggcggaggtccttcagttcgtcgc
gggtcatcgggcccgggtgg” (SEQ ID No. 65) 、 以及

(22) 探針 DNA 序列

“gccgccctgaccaccttcacagcctggccggccggttacctggtgctgat
gccgaacaacccgc” (SEQ ID No. 66) 。

9. 如申請專利範圍第 8 項之病原體特定 DNA 探針序列之組合，其中，該 DNA 探針係於 5' 端以生物素部分標示，而經由形成呈色產物檢測；或

該 DNA 探針經由螢光標記標示，該螢光標記為有機螢光標誌，選自螢光異硫氰酸鹽(FITC)所成群組，或無機螢光奈米顆粒，包括 Quantum DotsTM、Cy3、Cy5，其係經由任何螢光掃描裝置或顯微鏡檢測。

10. 一種 DNA 靶序列之組合，其包含兩組以上之 DNA 靶序列，係專一性地偵測及區別兩種以上之病原體，係選自由下列所成群組：

- (1) 5' gcaactgtgctatccccatcacgggtcatggagtacaccgaatgct
3' (SEQ ID No. 67)、
- (2) 5' cacatcacagtcgcggcagcgtcatcggcg3' (SEQ ID No.
68)、
- (3) 5' tccccctggacgggtacggccgcatgaacggccgggg3'
(SEQ ID No. 69)、
- (4) 5' aggtagaaactgtgtgtacagttgcgttg3' (SEQ ID No.
70)、
- (5) 5' aatacaaagccgcagtgtcgtc3' (SEQ ID No. 71)、
- (6) 5' gactccaggtacaccttgacgtactg3' (SEQ ID No. 72)、
- (7) 5' cttaaaactcactaccagtcatttctatccatc3' (SEQ ID No.
73)、
- (8) 5' ttatcatagaactgcgtaaacactcggcaagtaata3' (SEQ
ID No. 74)、
- (9) 5' ctatacccgccaacgctaccaacgtgcca3' (SEQ ID No.
75)、
- (10) 5' tcggtacagagggtcgccaaaccgcgaggtggagctaa3'
(SEQ ID No. 76)、
- (11) 5' ggatgaaaggagcttgctcctggattcagcggcggacg3'
(SEQ ID No. 77)、
- (12) 5' gacctgggctacacacgtgctaca 3' (SEQ ID No. 78)、

(13) 5'ctgggttgggcccggctgcttcgggcagcaactccccgggtt3'

(SEQ ID No. 79)、

(14) 5'ggctttgagacaacaggcccgtgccc3' (SEQ ID No.

80)、

(15) 5'tttataaatcctgtccaccccgt3' (SEQ ID No. 81)、

(16) 5'aaattcatgagtatctgtgcaactttg3' (SEQ ID No. 82)、

(17) 5'atgatgctttatcaaatagacaagcttagatcc3' (SEQ ID

No. 83)、

(18) 5'gtaagtcaaggatgctggcataatg3' (SEQ ID No. 84)、

(19) 5'gcttcagcgcgcgtcagcagagataac3' (SEQ ID No.

85)、

(20) 5'aacacctacaaggtgtccggcggttgccac3' (SEQ ID No.

86)、

(21) 5'cgaggcaggcgaggtccttcagttcgtcgcg3' (SEQ ID

No. 87)、以及

(22) 5'atcagcctggccggccgttacctggtg3' (SEQ ID No.

88)。

11. 一種檢測及區別病原體之方法，包括下列步驟：

- (i) 進行多重引子 PCR(聚合酶連鎖反應)，使用第 1 組 [(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、第 2 組[(SEQ ID No.3)及 (SEQ ID No.4)]、第 3 組 [(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 4 組[(SEQ ID No.7)及 (SEQ ID No.8)]、第 5 組[(SEQ ID No.9)及 (SEQ ID No.10)]、第 6 組[(SEQ ID No.11)及 (SEQ ID

No.12)]、第 7 組 [(SEQ ID No.13) 及 (SEQ ID No.14)]、第 8 組 [(SEQ ID No.15) 及 (SEQ ID No.16)]、第 13 組 [(SEQ ID No.25) 及 (SEQ ID No.26)]、第 16 組 [(SEQ ID No.31) 及 (SEQ ID No.32)]、及第 18 組 [(SEQ ID No.35) 及 (SEQ ID No.36)]之引子組以獲得增幅產物；

(ii) 將步驟(i)所得之增幅產物與固定於固相基質上之互補 DNA 靶序列雜交，其中，該靶序列係選自由 SEQ ID No.67 至 88 所成群組；以及

(iii) 檢測該雜交產物，以進一步檢測及區別該病原體，其中，該病原體係選自由單純疱疹病毒 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹病毒、腺病毒、真細菌、格蘭氏陽性菌、格蘭氏陰性菌、黴菌、結核分枝桿菌、龜鱉分枝桿菌、兩棲類分枝桿菌、弓蟲、及砂眼披衣菌所成群組。

12. 一種檢測及區別兩種以上之引起症候群病原體之方法，包括下列步驟：

(i) 進行多重引子 PCR(聚合酶連鎖反應)，使用第 1 至 22 組引子組(SEQ ID No.1 至 SEQ ID No.44)之組合由臨床樣本獲得增幅 PCR 產物；

(ii) 將該 PCR 產物變性；

(iii) 將該變性之 PCR 產物與 DNA 靶序列雜交；以及

(iv) 檢測該雜交作用以鑑定出該病原體。

13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中，該症候群係選自由感染性眼內炎、角膜炎、葡萄膜炎、視網膜炎、腦膜炎、眼部感染、及腦膜腦炎所成群組。
14. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中，該 DNA 靶序列係選自由 SEQ ID No.67 至 88 所成群組。
15. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中，該第 1 至 22 組之引子組(SEQ ID No.1 至 44)可一起用於相同熱循環條件之單一試管，該條件之特徵在於，94°C 5 分鐘之變性步驟、之後於 60-64°C 45 秒、72°C 45 秒及 94°C 45 秒 40 個循環，之後於 72°C 反應延伸 10 分鐘。
16. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該引子係於 5' 端以生物素部分標示，而經由形成呈色產物檢測；或
該引子經由螢光標記標示，該螢光標記為有機螢光標誌，選自螢光異硫氰酸鹽(FITC)所成群組，或無機螢光奈米顆粒，包括 Quantum Dots™、Cy3、Cy5，其係經由任何螢光掃描裝置或顯微鏡檢測。
17. 如申請專利範圍第 11 至 16 項任一項之方法，其中，該雜交作用之檢測係使用選自由 SEQ ID No.45 至 66 所成群組之增幅 PCR 產物作為探針，以宏陣列(macro array)或墨點法(slot blot)或線性探針分析(line probe assay)之形式之檢測；其中，該探針為使用申請專利範圍第 1 項所述之引子組之增幅產物。
18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中，該宏陣列包括 DNA 靶序列 (SEQ ID No.67 至 88)，固定於固

相物上，該固相物包含硝化纖維、尼龍、荷電尼龍、玻璃或聚苯乙烯。

19. 一種用於同步檢測及區分引起外眼感染、眼內炎、或葡萄膜炎、或視網膜炎、或腦膜腦炎之病原體之套組，其包含：

- a) 第 1 至 22 組之引子組(SEQ ID No.1 至 44)；
- b) 一種包含 SEQ ID No.67 至 88 之 DNA 序列之基質，其固定於一固相物上；
- c) 增幅 DNA 之聚合酶連鎖反應所需之標準試劑；
- d) 雜交 PCR 增幅產物與固定於該固相物上之 DNA 序列之基質所需之標準試劑；及
- e) 檢測及區別最終雜交產物所需之標準試劑。

20. 一種用於檢測樣本中病原體之套組，包含：第 1 至 22 組之引子組(SEQ ID No.1 至 44)，其中，該病原體為單純疱疹病毒 1 及 2、細胞巨大病毒、水痘帶狀疱疹病毒、腺病毒、真細菌、格蘭氏陽性菌、格蘭氏陰性菌、黴菌、結核分枝桿菌、龜鱉分枝桿菌、兩棲類分枝桿菌、弓蟲、及砂眼披衣菌。

21. 一種套組，包含：

引子組：第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、第 2 組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組[(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 4 組[(SEQ ID No.7)及(SEQ ID No.8)]、第 5 組[(SEQ ID No.9)及(SEQ ID No.10)]、第 6 組[(SEQ ID No.11)及(SEQ ID

No.12)]、第 7 組[(SEQ ID No.13)及(SEQ ID No.14)]、
及第 8 組[(SEQ ID No.15)及(SEQ ID No.16)]，用以
偵測病毒性視網膜炎；或

引子組：第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、
第 2 組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組
[(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 9 組[(SEQ ID
No.17)及(SEQ ID No.18)]、及第 17 組[(SEQ ID
No.33)及(SEQ ID No.34)]，用以偵測角膜結膜炎；或

引子組：第 13 組[(SEQ ID No.25)及(SEQ ID
No.26)]、第 14 組[(SEQ ID No.27)及(SEQ ID
No.28)]、第 15 組[(SEQ ID No.29)及(SEQ ID
No.30)]、第 16 組[(SEQ ID No.31)及(SEQ ID
No.32)]，用以偵測葡萄膜炎；或

引子組：第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID
No.20)]、第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID
No.22)]、第 12 組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID
No.24)]、第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID
No.36)]、第 19 組[(SEQ ID No.37)及(SEQ ID
No.38)]、第 20 組[(SEQ ID No.39)及(SEQ ID
No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)及(SEQ ID
No.42)]、及第 22 組[(SEQ ID No.43)及(SEQ ID
No.44)]，用以偵測感染性眼內炎；或

引子組：第 1 組[(SEQ ID No.1)及(SEQ ID No.2)]、
第 2 組[(SEQ ID No.3)及(SEQ ID No.4)]、第 3 組

[(SEQ ID No.5)及(SEQ ID No.6)]、第 4 組[(SEQ ID No.7)及(SEQ ID No.8)]、第 5 組[(SEQ ID No.9)及(SEQ ID No.10)]、第 6 組[(SEQ ID No.11)及(SEQ ID No.12)]、第 7 組[(SEQ ID No.13)及(SEQ ID No.14)]、第 8 組[(SEQ ID No.15)及(SEQ ID No.16)]、第 13 組[(SEQ ID No.25)及(SEQ ID No.26)]、第 16 組[(SEQ ID No.31)及(SEQ ID No.32)]、及第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]，用以偵測腦膜腦炎；或

引子組：第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID No.20)]、第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID No.22)]、第 12 組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID No.24)]、第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]、第 20 組[(SEQ ID No.39)及(SEQ ID No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)及(SEQ ID No.42)]、及第 22 組[(SEQ ID No.43)及(SEQ ID No.44)]，用以偵測格蘭氏陽性菌/格蘭氏陰性菌；或

引子組：第 10 組[(SEQ ID No.19)及(SEQ ID No.20)]、第 11 組[(SEQ ID No.21)及(SEQ ID No.22)]、第 12 組[(SEQ ID No.23)及(SEQ ID No.24)]、第 13 組[(SEQ ID No.25)及(SEQ ID No.26)]、第 18 組[(SEQ ID No.35)及(SEQ ID No.36)]、第 20 組[(SEQ ID No.39)及(SEQ ID No.40)]、第 21 組[(SEQ ID No.41)及(SEQ ID

No.42)]、及第 22 組 [(SEQ ID No.43) 及 (SEQ ID No.44)]，用以偵測急性及慢性腦炎。

22. 一種基質，包含選自 SEQ ID No.67 至 88 之至少兩種經固定之 DNA 靶序列之組合，其係專一性地偵測及區別兩種以上之病原體。