

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5907879号  
(P5907879)

(45) 発行日 平成28年4月26日 (2016. 4. 26)

(24) 登録日 平成28年4月1日 (2016. 4. 1)

(51) Int. Cl.

F I

G O 6 F 19/24 (2011. 01)  
 C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)  
 C 1 2 M 1/34 (2006. 01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

G O 6 F 19/24  
 C 1 2 Q 1/68 Z N A A  
 C 1 2 M 1/34 B  
 C 1 2 N 15/00 A

請求項の数 34 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2012-538984 (P2012-538984)  
 (86) (22) 出願日 平成22年11月11日 (2010. 11. 11)  
 (65) 公表番号 特表2013-510578 (P2013-510578A)  
 (43) 公表日 平成25年3月28日 (2013. 3. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/056387  
 (87) 国際公開番号 W02011/060174  
 (87) 国際公開日 平成23年5月19日 (2011. 5. 19)  
 審査請求日 平成25年10月11日 (2013. 10. 11)  
 (31) 優先権主張番号 61/261, 109  
 (32) 優先日 平成21年11月13日 (2009. 11. 13)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510005889  
 ベックマン コールター, インコーポレ  
 イテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 928  
 21, プレア, エス. クレーマー ブー  
 ルバード 250  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100062409  
 弁理士 安村 高明  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロットを用いて生物学的持続状態の存在を検出するためのシステムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の生物学的実体の存在を決定するための方法であって、  
 該試料において、少なくとも3つの遺伝子エレメントの量を検出するステップと、  
 デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、該試料中の該生物  
 学的実体の存在を決定するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムが、少なくと  
 も3つの遺伝子エレメントと関連する測定値を入力として用い、該少なくとも3つの遺伝  
 子エレメントと関連する測定値を組み合わせてベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元  
 プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、該生物学的実  
 体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にない場合は、該生物学的実体が存在しない、ス  
 テップ  
 を含み、

ここで、該生物学的実体が、M R S Aを含み、ここで、該少なくとも3つの遺伝子エレ  
 メントがm e c A、S C C m e c、およびS t a p h y l o c o c c u s a u r e u s  
 特異的な標的遺伝子配列を含む、方法。

【請求項 2】

前記二次元プロットがYプロットであり、ここで、前記判定アルゴリズムが、m e c A  
 、S C C m e c、および前記S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 特異的な標的  
 遺伝子配列の測定値を、該二次元Yプロット上のベクトル

【数 3】

$\vec{p}$

として組み合わせる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ベクトル

【数 3】

$\vec{p}$

10

が、式：

【数 4】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}.$$

により定義される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが、mecA、SCCmec、および femA を含む、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 5】

前記 Y プロットをディスプレイ上に表示するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記境界関数が、既知試料のセットから創出され、MRSA の存在が、既知試料の該セット中の各試料について既知である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

PCR 閾値サイクル (Ct) 値が、前記遺伝子エレメントの各々に対して測定され、該 Ct 値は、前記 Y プロットを作成するために用いられる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 9】

試料中の生物学的実体の存在を決定するためのシステムであって、

該試料において、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントと関連する値を検出することが可能な測定モジュールと、

該測定モジュールからの測定値を保存するメモリと、

判定アルゴリズムを実行するための命令を有する、コンピュータにより読み取り可能なコードを含有する、コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、ここで、該判定アルゴリズムが、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの測定値を入力として用い、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの測定値を組み合わせるベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、該生物学的実体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にはない場合は、該生物学的実体が存在しない、媒体と、

40

該試料中の該生物学的実体の存在を決定するために、該コンピュータにより読み取り可能な媒体上で、該コンピュータにより読み取り可能なコードを実行するプロセッサを含み、

ここで、該生物学的実体が、MRSA を含み、ここで、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが mecA、SCCmec、および Staphylococcus aureus

50

特異的な標的遺伝子配列を含む、システム。

【請求項 10】

前記値が、前記少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの量である、請求項 9 に記載のシステム。

【請求項 11】

前記二次元プロットが二次元 Y プロットであり、ここで、前記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および前記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の測定値を、該二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

10

として組み合わせる、請求項 9 または 10 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記ベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

20

【数 5】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}$$

により定義される、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 13】

前記測定モジュールがリアルタイム PCR 装置を含む、請求項 9 から 12 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 14】

30

前記二次元プロットを表示するためのディスプレイをさらに含む、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 15】

前記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、請求項 9 から 14 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 16】

PCR 閾値サイクル (Ct) 値が、前記遺伝子エレメントの各々に対して測定され、該 Ct 値は、前記 Y プロットを作成するために用いられる、請求項 11 に記載のシステム。

【請求項 17】

40

コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、判定アルゴリズムのためのコードを含み、ここで、該判定アルゴリズムが少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの測定値を入力として用い、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの測定値を組み合わせるベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にない場合は、該生物学的実体が存在せず、

ここで、該生物学的実体が、*MRSA* を含み、ここで、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を含む、媒体。

【請求項 18】

50

前記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、請求項 17 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【請求項 19】

前記二次元プロットが二次元 Y プロットであり、ここで、前記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および前記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の測定値を、該二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

10

として組み合わせる、請求項 17 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【請求項 20】

前記ベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

【数 6】

20

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}$$

により定義される、請求項 19 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【請求項 21】

前記二次元プロットを表示するためのコードをさらに含む、請求項 19 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【請求項 22】

PCR 閾値サイクル (Ct) 値が、前記遺伝子エレメントの各々に対して測定され、該 Ct 値は、前記 Y プロットを作成するために用いられる、請求項 19 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

30

【請求項 23】

未知試料中の生物学的実体の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出する方法であって、

既知試料において、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの存在および値を検出するステップと、

該既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムがベクトルを創出し、各ベクトルについての入力として、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの該検出された値を用い、ここで、一部のベクトルが該生物学的実体と関連し、一部のベクトルが該生物学的実体と関連しないステップと、

40

該ベクトルを、二次元プロット上にプロットするステップと、

該生物学的実体と関連するベクトルと、該生物学的実体と関連しないベクトルを区分する、境界関数を創出するステップを含み、

ここで、該生物学的実体が、*MRSA*を含み、ここで、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を含む、方法。

【請求項 24】

前記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネッ

50

トワーク、またはガウス分布関数を用いて定義される、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記二次元プロットを表示するステップをさらに含む、請求項 23 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記二次元プロットが Y プロットであり、ここで、前記判定アルゴリズムが、mecA、SCCmec、および前記 Staphylococcus aureus 特異的な標的遺伝子配列の測定値を、該二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

10

として組み合わせる、請求項 23 から 25 のいずれかに記載の方法。

【請求項 27】

前記ベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

20

【数 7】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

PCR 閾値サイクル (Ct) 値が、前記遺伝子エレメントの各々に対して測定され、該 Ct 値は、前記 Y プロットを作成するために用いられる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

30

前記 SCCmec は、orfX 接合部にある、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 30】

前記 SCCmec は、orfX 接合部にある、請求項 9 から 16 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 31】

前記 SCCmec は、orfX 接合部にある、請求項 17 から 22 のいずれかに記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【請求項 32】

SCCmec / orfX 接合部の検出は、前記 SCCmec の存在を示す、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 33】

SCCmec / orfX 接合部の検出は、前記 SCCmec の存在を示す、請求項 9 から 16 のいずれかに記載のシステム。

【請求項 34】

SCCmec / orfX 接合部の検出は、前記 SCCmec の存在を示す、請求項 17 から 22 のいずれかに記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

#### 関連出願への相互参照

この出願は、2009年11月13日に出願された米国仮特許出願第61/261,109号(名称「Systems and Methods for Detecting the Presence of a Biological Status Using Plot」(代理人事件番号021594-010300US))の本出願であり、かつ上記米国仮特許出願第61/261,109号の米国特許法119条(e)項の下での利益を主張する。上記出願は、その全容が、全ての目的について、参考として本明細書に援用される。

#### 【背景技術】

##### 【0002】

10

*Staphylococcus aureus*のメチシリン耐性菌株(MRSA)は、院内発生を含めた重大な帰結を伴う感染症に関与し、広範にわたる抗生剤に対して耐性を示し、このため、処置の選択肢を制限する。医療に随伴するMRSAは、すべてのペニシリンおよびセファロスポリンに対して交差耐性であることが予測可能であるだけでなく、一般的に用いられる他の複数の抗生剤に対してもまた耐性であることが典型的である。MRSA感染症の処置は一般に、通常は防御の最後の線として用いられる、より高価で、多くはより毒性の強い抗生剤を必要とする。したがって、MRSAの迅速な検出は、処置の方策および感染制御の方策のいずれに対しても臨床的に極めて重要である。

##### 【0003】

MRSAの検出は、MRSAが、メチシリン感受性*Staphylococcus aureus*(MSSA)、メチシリン耐性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌属(MR-CONS)、および/またはメチシリン感受性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌属(MS-CONS)を含め、他の複数の類縁細菌と共にしばしば共コロニー形成するという事実によりさらに複雑化する。

20

##### 【0004】

臨床微生物検査室においてMRSAを検出するための従来の方法は、MRSAをMSSAおよびMR-CONSから単離および区別するための最初のステップとして、試料から、その細菌を培養するステップを伴う。この手法は時間がかかり、結果が分かるまでに少なくとも20~24時間を必要とする。

##### 【0005】

30

メチシリン耐性*Staphylococcus aureus*(MRSA)を検出し、それをメチシリン感受性*Staphylococcus aureus*(MSSA)から区別するための、多くの分子ベースの方法が公表されている。このような一方法は、MRSAの2つの個別の領域である、*Staphylococcus*カセット染色体(SCCmec;メチシリン耐性の原因である)のmecA遺伝子と、*Staphylococcus aureus*のspa遺伝子を標的とする(特許文献1;非特許文献1)。この手法を用いるMRSAの明確な検出は、これもまたmecA遺伝子を保有してメチシリン耐性をもたらす、メチシリン耐性コアグラエゼ陰性ブドウ球菌属(MR-CONS)など、*Staphylococcus aureus*以外の菌株が共存することにより妨げられる(非特許文献2)。

40

##### 【0006】

より近年の分子的手法では、SCCmecに対するプライマーおよびプローブ、ならびに*Staphylococcus aureus*ゲノムの隣接領域を用いる(特許文献2;非特許文献3)。SCCmecは、mecA遺伝子を保有し、orfX遺伝子の3'端の特定の部位であるattBsccl部位にこれを挿入する、移動性の遺伝子エレメントである。SCCmecの左側末端が、attBscclの、orfXを含まない側と隣接するのに対し、SCCmecの右側末端は、attBscclのorfX側と隣接する(非特許文献4;非特許文献5;非特許文献6)。この手法により、SCCmec/orfX接合部の検出から、mecA遺伝子の存在が推測される。数個の異なる種類のSCCmecについて記載されている通り、この手法は、複数のプライマーの使用を必要とする。この手

50

法はまた、*mecA* 遺伝子を含有しない *SCCmec* カセットの存在に起因する偽陽性結果（非特許文献 7）およびそのアッセイが対象としない新規出現型の *SCCmec* に起因する偽陰性結果（非特許文献 8）をもたらす。

【0007】

別の手法は、異なる *SCCmec* 型を通じて相溶性が高い領域における 1 つのプライマーと、隣接する *Staphylococcus aureus* DNA における 1 つのプライマーを用いている（Cuny ら、*Clin. Microbiol. Infect.*、2005 年、11 巻：834～837 頁；欧州特許第 1529847 B1 号）。この領域を包含するプライマーにより *MSSA* もまたプライミングされる可能性も高いので、この手法もまた、偽陽性をもたらす。

10

【0008】

最後に、特異的な抗体および磁気ビーズを用いて、*Staphylococcus aureus* を陽性選択する方法が記載されている（Francois ら、*Journal of Clinical Microbiology*、2003 年 1 月、254～260 頁；欧州特許第 1,370,694 B1 号）。この手法は、*Staphylococcus aureus* を富化するが、*MRSA* を陽性同定し、*CoNS* を検出する可能性を低減するために、3 つのプライマー/プローブセットの使用を必要とする。この方法は、その核酸を回収するのに、遠心分離ステップと分離溶解ステップを必要とする。

【0009】

市販の *MRSA* アッセイは、*SCCmec* の右側末端における接合部および *orfX* を標的とする。5 つの異なる *SCCmec* 型および多数の *SCCmec* 亜型が同定されており、新たな *SCCmec* 亜型が出現する可能性は高い。加えて、*MRSA* に由来する *MSSA* は、*mecA* 遺伝子を伴わずに *SCCmec* 配列の一部を保持しうる可能性がある。したがって、*SCCmec* 右側末端の *orfX* との接合部を標的とするアッセイは、*MRSA* に由来する *MSSA* による偽陽性結果と、新規出現の *SCCmec* 型/亜型を保有する *MRSA* による偽陰性結果をもたらす可能性がある。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献 1】米国特許第 5,702,895 号明細書

30

【特許文献 2】米国特許第 6,156,507 号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Sinsimer ら、*Journal of Clinical Microbiology*、2005 年 9 月、4585～4591 頁

【非特許文献 2】Becker ら、*Journal of Clinical Microbiology*、2006 年 1 月、229～231 頁

【非特許文献 3】Huletsky ら、*Journal of Clinical Microbiology*、2004 年 5 月、1875～1884 頁

【非特許文献 4】Ito ら、*Antimicrob. Agent Chemother.*、2001 年、45 巻、1323～1336 頁

40

【非特許文献 5】Ito ら、*Antimicrob. Agent Chemother.*、2004 年、48 巻、2637～2651 頁

【非特許文献 6】Noto ら、*J. Bacteriol.*、2008 年、190 巻：1276～1283 頁

【非特許文献 7】Farley ら、*Journal of Clinical Microbiology*、2008 年 2 月、743～746 頁

【非特許文献 8】Heusser ら、*Antimicrob. Agents Chemother.*、2007 年 1 月、390～393 頁

【発明の概要】

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0012】

このように、MRSAを検出するための現行の方法は、日常的な臨床および監視の目的には、労力を要し、時間がかかり、信頼を置けない。したがって、MRSAを検出し、同時に、MSSAおよび/またはMR - CoNSを含めた他の類縁細菌からこれを識別する、迅速で、容易で、信頼のおけるアッセイを開発する必要がある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明の実施形態は、加えて、メチシリン感受性 *Staphylococcus aureus* (MSSA)、メチシリン耐性コアグラゼ陰性ブドウ球菌属 (MR - CoNS) 、および/または他の細菌株も含有しうる試料中に、メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) を検出するためのシステムおよび方法に関する。本発明の他の実施形態は、より一般的に、プロットおよび境界関数を用いて生物学的実体を解析するためのシステムおよび方法にも関しうる。

10

## 【0014】

本発明の一実施形態は、試料中の生物学的実体の存在を決定する方法を対象とする。その方法は、試料において、少なくとも3つの遺伝子エレメントの量を検出するステップを含む。デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、試料中の該生物学的実体の存在を決定する。判定アルゴリズムは、少なくとも3つの遺伝子エレメントと関連する測定値 (例えば、測定量) を入力として用い、その値を組み合わせてベクトルを形成し、ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較する。ベクトルが、境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、ベクトルが、境界関数内にはない場合は、生物学的実体が存在しない。

20

## 【0015】

本発明の別の実施形態は、試料中の生物学的実体の存在を決定するためのシステムを対象とする。該システムは、試料において、少なくとも3つの遺伝子エレメントの値 (例えば、量) を検出することが可能な測定モジュールと、該測定モジュールからの検出値 (例えば、検出量) を保存するメモリを含む。該システムはまた、判定アルゴリズムを実行するための命令を有する、コンピュータにより読み取り可能なコードを含有する、コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、ここで、該判定アルゴリズムが、該少なくとも3つの遺伝子エレメントの検出値および測定値 (例えば、検出量および測定量) を入力として用い、その値を組み合わせてベクトルを形成する媒体も包含する。ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較する。ベクトルが、境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、ベクトルが、境界関数内にはない場合は、生物学的実体が存在しない。該システムはまた、試料中の生物学的実体の存在を決定するために、コンピュータにより読み取り可能な媒体上で、コンピュータにより読み取り可能なコードを実行するプロセッサも包含する。

30

## 【0016】

本発明の別の実施形態は、判定アルゴリズムのためのコードを含む、コンピュータにより読み取り可能な媒体を対象とする。該判定アルゴリズムは、少なくとも3つの遺伝子エレメントと関連する検出値および測定値 (例えば、検出量および測定量) を入力として用い、その値を組み合わせてベクトルを形成する。該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較する。該ベクトルが、該境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、該ベクトルが、該境界関数内にはない場合は、該生物学的実体が存在しない。

40

## 【0017】

本発明の別の実施形態は、未知試料中の生物学的実体の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出するための方法を対象とする。該方法は、既知試料において、少なくとも3つの遺伝子エレメントの存在および値 (例えば、量) を検出するステップと、既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムがベクトルを創出し、各ベクトルについての

50

入力として、該少なくとも3つの遺伝子エレメントの検出値（例えば、検出量）を用いるステップを包含する。一部のベクトルは、生物学的実体と関連し、一部のベクトルは、生物学的実体と関連しない。該方法は、ベクトルを、二次元プロット上にプロットするステップと、生物学的実体と関連するベクトルと、生物学的実体と関連しないベクトルを区分する、境界関数を創出するステップをさらに包含する。

【0018】

一実施形態によれば、試料中のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の存在を決定するための方法が開示される。該方法は、試料を、該試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置く。次に、試料を増幅し、該試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出することができる。次いで、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、試料中のMRSAの存在を決定することができる。判定アルゴリズムは、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いて、試料中にMRSAが存在するかどうかを決定することができる。該試料中の *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、判定アルゴリズムを用いて、MRSAが該試料中に存在することを決定することができる。

【0019】

一実施形態によれば、試料中のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の存在を決定するためのシステムが開示される。該システムは、多くの構成要素を含みうる。例えば、該システムは、試料を、該試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置いた後で、該試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出することが可能な測定モジュールを含みうる。該システムは、測定モジュールからの検出量を保存することができるメモリをさらに含みうる。該システムはまた、判定アルゴリズムを実行するための命令を有する、コンピュータにより読み取り可能なコードを含有する、コンピュータにより読み取り可能な媒体も含みうる。判定アルゴリズムは、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いて、MRSAが該試料中に存在するかどうかを決定することができる。該試料中の *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、判定アルゴリズムを用いて、MRSAが該試料中に存在することを決定することができる。該システムはまた、該試料中のMRSAの存在を決定するために、該コンピュータにより読み取り可能な媒体上で、該コンピュータにより読み取り可能なコードを実行することができるプロセッサも含みうる。

【0020】

別の実施形態によれば、コンピュータにより読み取り可能な媒体が開示される。該コンピュータにより読み取り可能な媒体は、試料中のMRSAの存在を決定することができる判定アルゴリズムについてのコードを含みうる。判定アルゴリズムは、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いて、MRSAが該試料中に存在するかどうかを決定することができる。該試料中の *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、判定アルゴリズムを用いて、MRSAが該試料中に存在することを決定することができる。 *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量は、試料を、該試

料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置き、該試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出することにより得ることができる。

#### 【0021】

さらに別の実施形態によれば、未知試料中のメチシリン耐性*Staphylococcus aureus* (MRSA) の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出するための方法が開示される。該方法は、既知試料のセットを、該既知試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置くステップを含みうる。既知試料の該セット中の各試料について、MRSAの存在または非存在が既知である。次いで、該方法は、該既知試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出する。次いで、該方法は、既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行する。判定アルゴリズムは、*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いる。最後に、該方法は、未知試料中にMRSAが存在するかどうかを決定するのに用いることができるモデルを創出する。該モデルは、既知試料に対して実行される判定アルゴリズムの出力から創出することができ、該モデルは、MRSA陽性試料とMRSA陰性試料との間の境界を定義する、選択した境界関数により定義することができる。

#### 【0022】

これらの実施形態、ならびに他の実施形態については、本開示の後出においてより詳細に説明する。

したがって本発明は以下の項目を提供する：

#### (項目1)

試料中の生物学的実体の存在を決定するための方法であって、  
 該試料において、少なくとも3つの標的の量を検出するステップと、  
 デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、該試料中の該生物学的実体の存在を決定するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムが、少なくとも3つの遺伝子エレメントと関連する測定値を入力として用い、該少なくとも3つの遺伝子エレメントと関連する測定値を組み合わせてベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、該生物学的実体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にない場合は、該生物学的実体が存在しない、ステップを含む方法。

#### (項目2)

上記二次元プロットがYプロットであり、ここで、上記少なくとも3つの遺伝子エレメントが*mecA*、*SCCmec*、および*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列を含み、ここで、上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該*Staphylococcus aureus*特異的な標的遺伝子配列の検出量を、該二次元Yプロット上のベクトル

#### 【数3】

$$\vec{p}$$

として組み合わせる、項目1に記載の方法。

#### (項目3)

上記ベクトル

【数 3】

 $\vec{p}$ 

が、式：

【数 4】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}.$$

により定義される、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

上記少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが、*mecA*、*SCCmec*、および *femA* を含む、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 5)

上記生物学の実体が、*MRSA* を含む、項目 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 6)

上記 Y プロットをディスプレイ上に表示するステップをさらに含む、項目 2 に記載の方法。

(項目 7)

上記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、項目 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8)

上記境界関数が、既知試料のセットから創出され、*MRSA* の存在が、既知試料の該セット中の各試料について既知である、項目 1 から 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

試料中の生物学の実体の存在を決定するためのシステムであって、  
該試料において、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントと関連する値を検出することが可能な測定モジュールと、

該測定モジュールからの検出値を保存するメモリと、

判定アルゴリズムを実行するための命令を有する、コンピュータにより読み取り可能なコードを含有する、コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、ここで、該判定アルゴリズムが、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの検出値および測定値を入力として用い、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの検出値および測定値を組み合わせベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、該生物学の実体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にない場合は、該生物学の実体が存在しない、媒体と、

該試料中の該生物学の実体の存在を決定するために、該コンピュータにより読み取り可能な媒体上で、該コンピュータにより読み取り可能なコードを実行するプロセッサを含むシステム。

(項目 10)

上記値が、上記少なくとも 3 つの標的の量である、項目 9 に記載のシステム。

(項目 11)

上記二次元プロットが二次元 Y プロットであり、ここで、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を含み、ここで、上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量を、該二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

 $\vec{p}$ 

10

20

30

40

50

として組み合わせる、項目 9 または 10 に記載のシステム。

(項目 12)

上記ベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

【数 5】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

10

により定義される、項目 11 に記載のシステム。

(項目 13)

上記測定モジュールがリアルタイム PCR 装置を含む、項目 9 から 12 のいずれかに記載のシステム。

(項目 14)

上記二次元プロットを表示するためのディスプレイをさらに含む、項目 11 に記載のシステム。

(項目 15)

上記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、項目 9 から 14 のいずれかに記載のシステム。

20

(項目 16)

コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、判定アルゴリズムのためのコードを含み、ここで、該判定アルゴリズムが少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの検出値および測定値を入力として用い、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの検出値および測定値を組み合わせるベクトルを形成し、該ベクトルを、二次元プロット上の境界関数と比較し、該ベクトルが該境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、該ベクトルが該境界関数内にはない場合は、該生物学的実体が存在しない、媒体。

(項目 17)

30

上記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数により定義される、項目 16 または 17 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

(項目 18)

上記二次元プロットが二次元 Y プロットであり、ここで、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を含み、ここで、上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量を、該二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

40

$$\vec{p}$$

として組み合わせる、項目 16 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

(項目 19)

上記ベクトル

【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

## 【数 6】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、項目 18 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

(項目 20)

上記二次元プロットを表示するためのコードをさらに含む、項目 18 に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

(項目 21)

未知試料中の生物学的実体の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出する方法であって、

10

既知試料において、少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの存在および値を検出するステップと、

該既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムがベクトルを創出し、各ベクトルについての入力として、該少なくとも 3 つの遺伝子エレメントの該検出値を用い、ここで、一部のベクトルが該生物学的実体と関連し、一部のベクトルが該生物学的実体と関連しないステップと、

該ベクトルを、二次元プロット上にプロットするステップと、

該生物学的実体と関連するベクトルと、該生物学的実体と関連しないベクトルを区分する、境界関数を創出するステップを含む方法。

20

(項目 22)

上記境界関数が、矩形ゲーティング関数、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数を用いて定義される、項目 21 に記載の方法。

(項目 23)

上記二次元プロットを表示するステップをさらに含む、項目 21 または 22 に記載の方法。

(項目 24)

上記二次元プロットが Y プロットであり、上記少なくとも 3 つの遺伝子エレメントが *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列を含み、ここで、上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量を、該二次元 Y プロット上のベクトル

30

## 【数 3】

$$\vec{p}$$

として組み合わせる、項目 21 から 23 のいずれかに記載の方法。

(項目 25)

上記ベクトル

40

## 【数 3】

$$\vec{p}$$

が、式：

## 【数 7】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

50

試料中のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の存在を決定するための方法であって、

該試料を、該試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置くステップと、

該試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出するステップと、

デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、該試料中のMRSAの存在を決定するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用い、ここで、該試料中の *mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、該判定アルゴリズムを用いて、MRSAが、該試料中に存在することを決定することができるステップを含む方法。

(項目27)

上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列が、*femA* である、項目26に記載の方法。

(項目28)

上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の上記検出量を、二次元Yプロット上のベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

として組み合わせ、ここで、該ベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

を用いて、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量が、上記選択した境界関数により定義される量とほぼ等しいかどうかを決定することができる、項目26または27に記載の方法。

(項目29)

上記ベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

が、式：

【数8】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、項目28に記載の方法。

(項目30)

上記二次元Yプロットがディスプレイ上に表示される、項目28または29に記載の方法。

(項目31)

上記選択した境界関数が、矩形ゲーティング法、円形ゲーティングプロセス、またはガウス分布関数を用いて定義される、項目26から30のいずれかに記載の方法。

(項目32)

上記選択した境界関数が、ニューラルネットワークを用いて計算される、項目26から31のいずれかに記載の方法。

(項目33)

上記選択した境界関数が既知試料のセットから創出され、ここで、MRSAの存在が既知試料の該セット中の各試料について既知である、項目26から32のいずれかに記載の方法。

(項目34)

上記試料中の、少なくとも、mecA、SCCmec、および上記Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列の存在および量を、リアルタイムPCRにより検出する、項目26から33のいずれかに記載の方法。

10

(項目35)

少なくとも、mecA、SCCmec、および上記Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列の量を、サイクル数で測定する、項目34に記載の方法。

(項目36)

試料中のメチシリン耐性Staphylococcus aureus(MRSA)の存在を決定するシステムであって、

該試料において、少なくとも、mecA、SCCmec、およびStaphylococcus aureus(SA)特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、mecA、SCCmec、およびStaphylococcus aureus(SA)特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出することが可能な測定モジュールであって、ここで、該試料が、該試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置かれる、測定モジュールと、

20

該測定モジュールからの検出量を保存するメモリと、

判定アルゴリズムを実行するための命令を有する、コンピュータにより読み取り可能なコードを含有する、コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、ここで、該判定アルゴリズムが、mecA、SCCmec、および該Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いる媒体と、

該試料中のMRSAの存在を決定するために、該コンピュータにより読み取り可能な媒体上で、該コンピュータにより読み取り可能なコードを実行するプロセッサを含み、ここで、

30

該試料中のmecA、SCCmec、および該Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列の該検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、MRSAが該試料中に存在することを、該判定アルゴリズムが決定するシステム。

(項目37)

上記Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列が、femAである、項目36に記載のシステム。

(項目38)

上記判定アルゴリズムが、mecA、SCCmec、および上記Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列の上記検出量を、二次元Yプロット上のベクトル

40

【数3】

$$\vec{p}$$

として組み合わせ、ここで、該ベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

50

を用いて、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量が、上記選択した境界関数により定義される量とほぼ等しいかどうかを決定することができる、項目 36 または 37 に記載のシステム。

(項目 39)

上記ベクトル

【数 3】

$\vec{p}$

が、式：

【数 9】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、項目 38 に記載のシステム。

(項目 40)

使用者に情報を表示することが可能であるディスプレイをさらに含み、ここで、上記二次元 Y プロットが該ディスプレイ上に示される、項目 38 または 39 に記載のシステム。

(項目 41)

上記選択した境界関数が、矩形ゲーティング法を用いて定義される、項目 36 から 40 のいずれかに記載のシステム。

(項目 42)

上記選択した境界関数が、ニューラルネットワークを用いて計算される、項目 36 から 41 のいずれかに記載のシステム。

(項目 43)

上記選択した境界関数が、既知試料のセットから創出され、ここで、MRSA の存在が、既知試料の該セット中の各試料について既知である、項目 36 から 42 のいずれかに記載のシステム。

(項目 44)

上記測定モジュールが、リアルタイム PCR を用いて、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出する、項目 39 から 43 のいずれかに記載のシステム。

(項目 45)

少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の上記量を、サイクル数で測定する、項目 44 に記載のシステム。

(項目 46)

コンピュータにより読み取り可能な媒体であって、試料中の MRSA の存在を決定することができる判定アルゴリズムのためのコードを含み、ここで、該判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用い、ここで、該判定アルゴリズムが、該試料中の *mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量が、選択した境界関数により定義される量とほぼ等しい場合は、MRSA が該試料中に存在することを決定し、ここで、

該試料を、該試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置き、該試料中において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出することにより、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量および測定量を得る、媒体。

10

20

30

40

50

## (項目47)

上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列が、*femA* である、項目46に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

## (項目48)

*mecA*、*SCCmec*、および上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の上記検出量が、上記選択した境界関数により定義される量とほぼ等しいかどうかを決定するために、上記判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の該検出量を、二次元Yプロット上のベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

10

として組み合わせる、項目46または47に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

## (項目49)

上記ベクトル

【数3】

$$\vec{p}$$

が、式：

20

【数10】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}$$

により定義される、項目48に記載の、コンピュータにより読み取り可能な媒体。

## (項目50)

未知試料中のメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出するための方法であって、

既知試料のセットを、該既知試料中に存在する任意の細菌の核酸を露出させる条件下に置くステップであって、ここで、MRSAの存在が、既知試料の該セット中の各試料について既知であるステップと、

30

該既知試料において、少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列を増幅し、該少なくとも、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* (SA) 特異的な標的遺伝子配列の存在および量を検出するステップと、

該既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行するステップであって、ここで、該判定アルゴリズムが、*mecA*、*SCCmec*、および該 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の検出量および測定量を入力として用いるステップと、

該未知試料中にMRSAが存在するかどうかを決定するのに用いることができるモデルを創出するステップであって、ここで、該モデルを、該既知試料に対して実行される該判定アルゴリズムの出力から創出し、ここで、該モデルが、MRSA陽性試料とMRSA陰性試料との間の境界を定義する、選択した境界関数により定義されるステップを含む方法。

40

## (項目51)

上記 *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列が、*femA* である、項目50に記載の方法。

## (項目52)

上記選択した境界関数を校正するために、上記判定アルゴリズムが、上記既知試料中の各試料について、*mecA*、*SCCmec*、および上記 *Staphylococcus*

50

a u r e u s 特異的な標的遺伝子配列の上記検出量を、二次元 Y プロット上のベクトル

【数 3】

$\vec{p}$

として組み合わせる、項目 5 0 に記載の方法。

( 項目 5 3 )

上記ベクトル

【数 3】

$\vec{p}$

10

が、式：

【数 1 1】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + SA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}$$

により定義される、項目 5 2 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 3】

【図 1】図 1 は、一実施形態による方法において実行されるステップを例示するフローチャートを示す。

20

【図 2】図 2 は、本発明の一実施形態による方法において実行されるステップを例示するフローチャートを示す。

【図 3】図 3 ~ 5 は、本発明の実施形態による、各種の陽性試料および陰性試料からの判定アルゴリズムの出力を例示する図を示す。

【図 4】図 3 ~ 5 は、本発明の実施形態による、各種の陽性試料および陰性試料からの判定アルゴリズムの出力を例示する図を示す。

【図 5】図 3 ~ 5 は、本発明の実施形態による、各種の陽性試料および陰性試料からの判定アルゴリズムの出力を例示する図を示す。

【図 6】図 6 は、本発明の各種の実施形態を実行するのに用いることができるシステムについてのブロック図である。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 4】

各種の実施形態は、試料中の M R S A を同定するためのシステムおよび方法を開示し、それは、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s のメチシリン耐性菌株 ( M R S A ) 陽性試料は、m e c A のコピー数と、S C C m e c のコピー数と、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 特異的な標的遺伝子配列のコピー数とがほぼ同じであるという事実に基づいている。これらのシステムおよび方法はさらに、そのプロットの各軸が 1 2 0 ° ずつ離れている 2 D プロット上に、3 つのアッセイを同時に示しうる。一実施形態によれば、その 2 D 表示に Y プロットを用いる。所与の試料の m e c A についての値と、S C C m e c についての値と、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 特異的な標的遺伝子配列についての値とが同様である場合は、該試料の絶対アッセイの読み取り値 ( a b s o l u t e a s s a y r e a d i n g ) に関わらず、該試料の m e c A、S C C m e c、および S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 特異的な標的遺伝子配列の測定コピー数が、原点に極めて近接してプロットされうる。この変換を一助として、M R S A 陽性試料を、M R S A 陰性試料から識別するのに用いることができる境界関数を定義することができる。

40

【 0 0 2 5】

本開示で用いられるすべての科学用語および技術用語は、別段に指定しない限り、当技術分野において一般的に用いられる意味を有する。本開示で用いられる以下の語または語

50

句は、意味が指定されている。

【0026】

本明細書で用いられる「境界関数」とは、データが、ある生物学的持続状態と関連するか、またはある生物学的持続状態と関連しないかを決定するのに用いられる数学関数でありうる。境界関数は、手作業を介すること、ニューラルネットワーク、費用関数などの使用を介することを含め、任意の適切な様式で創出することができる。境界関数はまた、楕円、四角形、円などを含めた、任意の適切な形態または線により表わすこともできる。境界関数は、形態が規則的な場合もあり、不規則な場合もある。

【0027】

本明細書で用いられる「ベクトル」とは、各々が少なくとも1つの方向、および典型的には1つのスカラーを有する、1つ以上の成分に由来する値に関しうる。

10

【0028】

本明細書で用いられる「遺伝子エレメント」という用語は、本発明の方法における標的として有用な、対象のゲノムにおける配列を指す場合がある。一部の実施形態では、遺伝子エレメントが、例えば、*Staphylococcus*におけるorfX、femA、またはmecAなどのオープンリーディングフレームまたは遺伝子である。遺伝子エレメントはまた、mecA遺伝子を含む場合もあり、含まない場合もある、*Staphylococcus*カセット染色体であるSCCmecなど、移動性の遺伝子エレメントでもありうる。

【0029】

20

本明細書で用いられる「SCCmec」、「SCCmec配列」、および「SCCmecカセット」という用語は、互換的に用いられ、Itora(2001年、Antimicrob. Agents Chemother., 45巻:1323~1336頁)において記載されている通り、mecA遺伝子を保有し、*Staphylococcus*の種のゲノムへと挿入される、*Staphylococcus*カセット染色体として公知の遺伝子エレメントを指す。

【0030】

本出願では、SCCmec挿入部位を、「orfX-ISS/attBsccl」と称する。この挿入部位は、本明細書で「orfX」と称する、遺伝子の3'端に位置する。SCCmecの挿入がなされる染色体の遺伝子座を、「attBsccl」と称する。本明細書では、該挿入部位における特異的な配列を、「orfX挿入部位配列(orfX-ISS)」または「attBscclコア領域」と称する。この配列は、*Staphylococcus aureus*において高度に保存的な配列であることが公知である(Itora、Antimicrob. Agent Chemother., 2001年、45巻、323~1336頁; Notoら、J. Bacteriol., 2008年、190巻:1276~1283頁)。

30

【0031】

*Staphylococcus aureus*のorfX-ISS/attBsccl領域へと挿入した後では、SCCmec左側末端の接合領域をMRSA-LEと称し、SCCmec右側末端の接合領域をMRSA-REと称する。左側末端の接合部では、SCCmec配列が、attBscclのorfXを含まない側と隣接する。右側末端の接合部では、SCCmec配列が、attBscclのorfX側と隣接する。orfX-ISS/attBsccl領域は、それらのすべてが参照により本明細書に組み込まれる、Itora、Antimicrob. Agents Chemother., 2001年、45巻、1323~1336頁; Itora、Antimicrob. Agent Chemother., 2004年、48巻、2637~2651頁; Notoら、J. Bacteriol., 2008年、190巻:1276~1283頁; および米国特許第6,156,507号において詳細に記載されている。SCCmecの挿入が存在しない場合は、このorfX-ISS/attBsccl領域に切れ目がなくなる。増幅法により、orfX-ISS/attBsccl領域が完全であると同定される場合は、これにより、SC

40

50

C m e c カセットが挿入されていないことが示される。しかし、o r f X - I S S / a t t B s c c 領域が増幅されないからといって、m e c A 遺伝子の存在が示されるわけではない。S C C m e c カセットが挿入された後で、m e c A 遺伝子が失われる可能性があることも公知である。したがって、m e c A が存在しない場合でもなお、S C C m e c カセットにより、o r f X - I S S / a t t B s c s 領域の増幅が阻止される可能性がある。

#### 【 0 0 3 2 】

「オリゴヌクレオチド」とは、併せて共有結合している2つ以上のヌクレオチドサブユニットを有する、ヌクレオチドポリマーである。オリゴヌクレオチドは一般に、約10～約100ヌクレオチドである。ヌクレオチドサブユニットの糖基は、リボースの場合もあり、デオキシリボースの場合もあり、O M e など、これらの修飾誘導体の場合もある。該ヌクレオチドサブユニットは、ホスホジエステル結合、修飾結合 ( m o d i f i e d l i n k a g e ) などの結合により接合される場合もあり、オリゴヌクレオチドの、その相補的標的ヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションを阻止しない、非ヌクレオチド部分により接合される場合もある。修飾結合には、標準的なホスホジエステル結合を、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合、または中性ペプチド結合など、異なる結合で置換する修飾結合が含まれる。また、窒素塩基類似体も、本発明によるオリゴヌクレオチドの構成要素でありうる。「標的核酸」とは、標的核酸配列を含む核酸である。「標的核酸配列」、「標的ヌクレオチド配列」、または「標的配列」とは、相補的オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしうる、特異的なデオキシリボヌクレオチド配列またはリボヌクレオチド配列である。

#### 【 0 0 3 3 】

本明細書で用いられる「プローブ」という用語は、対象の標的核酸とハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドを指す。ハイブリダイゼーションは、対象の標的核酸との相補的な塩基対合を介してプローブが結合する結果として生じる。当業者は、ハイブリダイゼーション条件の厳密性 ( s t r i n g e n c y ) に応じて、プローブが、該プローブ配列と完全に相補的であるわけではない標的配列と実質的に結合することが典型的であることを理解するはずである。プローブ ( および、したがって、その標的 ) を検出、視覚化、測定、および / または定量しうるように、該プローブを適切な標識またはレポーター部分と会合させることができる。

#### 【 0 0 3 4 】

本明細書で用いられる「プライマー」という用語は、核酸合成をプライミングするのに用いられるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、相補的塩基対合によりその鋳型とハイブリダイズし、したがって、複製を開始するのに用いられる。ハイブリダイゼーションは、上記でプローブについて記載したのと同じ様式で生じる。P C R では、2つのプライマー：二本鎖核酸分子のセンス鎖にハイブリダイズすることが典型的である「フォワードプライマー」と、その分子のアンチセンス鎖にハイブリダイズすることが典型的である「リバースプライマー」を用いる。

#### 【 0 0 3 5 】

本明細書で用いられる「P C R」という用語は、生物 ( l i v i n g o r g a n i s m ) を用いることなく、D N A を酵素的に複製することにより、長い二本鎖D N A 分子内で短いD N A 配列 ( 通常、50～600塩基 ) を指数関数的に増幅するための技法を指す ( M u l l i s ら、M e t h o d s E n z y m o l . 、1987年、155巻：335～50頁)。本発明では、他の i n v i t r o における増幅技法も用いることができ、これらは、当業者に周知である。これらの方法には、例えば、リガーゼ連鎖反応 ( L C R ) 、核酸配列ベースの増幅 ( N A S B A ) 、鎖置換増幅 ( S D A ) 、転写を介する増幅 ( T M A ) 、分枝D N A 法 ( b D N A ) 、およびローリングサークル増幅技法 ( R C A T ) が含まれる。

#### 【 0 0 3 6 】

本明細書で用いられる「リアルタイムP C R」という用語は、各増幅サイクル後に、増幅されたD N A を、その反応においてそれが蓄積するにつれてリアルタイムで定量化する

種類のPCRを指す(Heidら、Genome Research、1996年、6巻(10号):986~994頁)。当業者には、リアルタイムPCRを実施するための多数のプロブ化学(probe chemistry)が周知である。一般的に用いられる一方法は、TaqMan(登録商標)アッセイ(例えば、米国特許第5,210,015号;同第5,487,972号;および同第5,804,375号を参照されたい)である。用いることが可能であり、市販品の購入が可能である、他のリアルタイムPCRプロブ化学には、FRETプライマー、分子ビーコン、Scorpionプライマー(登録商標)、Amplifluorプライマー(登録商標)、Luxプライマー(登録商標)、Eclipse(登録商標)、およびUltimate Probe(登録商標)が含まれる。リアルタイムPCR技法の総説については、Bustinら、J. Mol. Endocrin., 34巻:597~601頁(2005年)を参照されたい。

10

#### 【0037】

本明細書で用いられる「多重PCR」という用語は、単一の反応試験管内で、2つ以上の異なる標的の増幅を可能とする反応物中に、1つより多いセットのプライマーが包含される種類のPCRを指す。「多重PCR」という用語はまた、複数のプライマーおよびプロブを用いるが、1つの標的だけを増幅するPCRも指す。一実施形態では、本発明の多重PCRが、リアルタイムPCRである。

#### 【0038】

本明細書で用いられるある「生物学的持続状態」とは、患者に由来する試料の特定の生物学的状態(biological state)に関しうる。大半の場合において、該生物学的持続状態は、試料が、特定の生物学的実体、例えば、標的の疾患生物または疾患と関連する患者細胞を含むかどうかに関する。例えば、1つの生物学的持続状態は、試料がMRSA細菌を含むことでありうるのに対し、別の生物学的持続状態は、試料がMRSA細菌を含まないことでありうる。他の例において、該生物学的持続状態は、試料が癌細胞を含むかどうかに関しうる。

20

#### 【0039】

本発明の一実施形態は、MRSA、MSSA、MR-CONS、または他の細菌を含有しうる試料においてMRSAを検出するためのアッセイに関する。本発明の実施形態は、多重遺伝子エレメント(例えば標的)の組合せを同時に増幅および検出するのに多重PCRを用いる。

30

#### 【0040】

一実施形態によれば、標的DNAの初期量を、PCR閾値サイクル数(Ct)で測定する。例えば、解析される反応について、規定のシグナル閾値を決定する。標的核酸のほか、基準核酸または標準核酸について、このシグナル閾値に達するのに必要とされるサイクル数(Ct)を決定する。標的分子の絶対コピー数または相対コピー数は、基準核酸と比較した標的核酸について得られるCt値に基づき決定することができる。したがって、Ct値は、標的DNAの初期量に反比例する(参照により本明細書に組み込まれる、Ct値の完全な議論については、Heidら、Genome Research、1996年、6巻(10号):986頁を参照されたい)。同定した方法のうちの1つにおいて増幅された遺伝子セットの所定量または所定数の表示に基づいて、特定の標的遺伝子の初期量を外挿することを可能とする、他の数学的手法を用いることができる。

40

#### 【0041】

一実施形態では、本発明が、試料中のMRSAの存在を決定する方法であって、蛍光による検出に十分であり、該試料中の1つ以上のMRSA特異的な標的配列の初期レベルを示すレベルの増幅産物を生成させるように、該試料をある時間にわたり、ある条件下でリアルタイムPCRにかけるステップを含む方法を対象とする。

#### 【0042】

別の実施形態では、増幅を、プライマー(フォワードプライマーおよびリバースプライマー)のセットおよびプロブにより実施する。プロブは、その5'端において蛍光原レポーター分子で標識することができ、その3'端において消光分子で標識することがで

50

きる。消光分子は、蛍光原レポーター分子からのシグナルの発光を阻止する。プローブは、フォワードプライマーがハイブリダイズする領域と、リバースプライマーがハイブリダイズする領域との間の標的配列領域にハイブリダイズする。プローブがハイブリダイズする鎖に沿ってポリメラーゼが移動すると、このポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ活性によりプローブの5'端が切断され、このため、消光部分の分離により、蛍光原シグナルの発光が可能となる。

#### 【0043】

具体的な実施形態では、本発明のプローブが、蛍光レポーター（フルオロフォア）および蛍光性または非蛍光性の消光分子を含む、二重標識した蛍光原プローブを含みうる。本発明の実施形態のフルオロフォアは、5'端、3'端、またはいずれかの端の内部を含めた任意の位置においてプローブに結合させることができる。本発明のある実施形態では、フルオロフォアおよび消光剤を、それぞれ、プローブの5'端および3'端に結合させる。フルオロフォアの例には、FAM、ROX、HEX、NED、Cy5、Texas Red、Calfluor Red、Calfluor Orange、Quasar 670、Quasar 705が含まれるがこれらに限定されない。消光剤の例には、TAMARA、Blackhole消光剤であるBHQ-1およびBHQ-2が含まれるがこれらに限定されない。

#### 【0044】

別の実施形態では、本発明は、3標的アッセイ（three target assay）を用いて、MRSAを検出し、これをMSSA、MR-CoNS、または他の細菌から識別する方法であって、ここで、そのアッセイに用いられる標的にmecA遺伝子配列、Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列、およびSCCmec遺伝子配列が含まれる方法を提供する。具体的な実施形態では、Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子が、femAである。以下の記載では、Staphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列として、femAに明示的に言及することが多いが、各種の実施形態ではまた、他のStaphylococcus aureus特異的な標的遺伝子配列も用いることができる。MRSAの存在を決定するのに用いることができるさらに他の標的には、orfXが含まれうる。

#### 【0045】

各種の実施形態では、MRSAの存在を決定するために、従来の陽性 - 陰性法またはデルタ法を用いる必要がない。代わりに、MRSA陽性試料では、mecAのコピー数と、femAのコピー数と、SCCmecのコピー数とがほぼ同じであるという事実に基づく手法を用いる。mecAのコピー数と、femAのコピー数と、SCCmecのコピー数とがほぼ等量で存在する場合は、試料中におけるMRSAの存在が示されうる。本発明の実施形態では、アッセイ判定アルゴリズムを用いて、mecA、SCCmec、およびfemAのCt値を解析することができる。この判定アルゴリズムはさらに、120度ずつ開いた線を有する2Dプロットに、3つのアッセイを同時に示しうる。mecA、SCCmec、およびfemAの測定量を表わす、そのプロットの3つの軸の各々が、2Dプロット上で「Y」として表わされるので、このプロットをYプロットと称することができる。試料のmecAについての読み取り値と、femAについての読み取り値と、SCCmecについての読み取り値とが同様である場合は、該試料の絶対アッセイの読み取り値に関わらず、該試料のmecA、femA、およびSCCmecの測定コピー数が、プロットの原点に近接してプロットされる。この変換を一助とすれば、矩形ゲーティング法（rectangle gating approach）で、MRSA陽性試料と、MRSA陰性試料を識別するのに十分でありうる。他の適切な手法は、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数を用いうる。さらなる詳細を以下に示す。

#### 【0046】

図1は、一実施形態により、試料中にMRSAが存在するかどうかを決定するのに用いることができる、モデルを構築するのに用いることができるステップを例示する。該モデ

10

20

30

40

50

ル内の境界関数は、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の測定量に基づき、*MRSA* 陽性試料を、*MRSA* 陰性試料から区分することができる。

【0047】

より一般的に述べると、本発明の一実施形態は、未知試料中の生物学的実体の存在を決定するのに用いることができるモデルを創出するための方法を対象とする。該方法は、既知試料において、少なくとも3つの標的の存在および量を検出するステップと、既知試料中の各試料について、デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行するステップであって、該判定アルゴリズムがベクトルを創出し、各ベクトルについての入力として、該少なくとも3つの標的の検出量を用いるステップを包含する。一部のベクトルは、生物学的実体と関連し、一部のベクトルは、生物学的実体と関連しない。該方法は、ベクトルを、二次元プロット上にプロットするステップと、生物学的実体と関連するベクトルと、生物学的実体と関連しないベクトルを区分する、境界関数を創出するステップをさらに包含する。

10

【0048】

ステップ1000では、選択した数の既知試料を、該試料中の細菌の核酸を露出させる条件下に置く。この文脈では、既知試料が、それが *MRSA* について陽性であると検定されるべきか陰性であると検定されるべきかが既に知られている試料である。したがって、該既知試料を用いて、後の未知試料もまた *MRSA* を含有するかどうかを決定することができるモデルを構築することができる。詳細に記載するのは *MRSA* についてであるが、本発明の他の実施形態では、他の適切な生物学的実体の存在も検出しうるということが理解される。

20

【0049】

試料を、該試料中の核酸を露出させる条件下に置くための、多くの異なる方法が存在する。例えば、当技術分野で周知である通り、試料の温度を上昇させて、DNA鎖を分離することができる。また、試料中の核酸を露出させるための他の周知の手段も用いることができる。

【0050】

ステップ1010では、既知試料の各々について、*mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列など、少なくとも3つの標的の存在および量を検出する。一部の実施形態では、対象の標的の各々について、*Ct* 値を測定することができる。一実施形態によれば、*Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列が、*femA* である。試料に由来する遺伝子を測定するには、多くの異なる方法が存在する。例えば、多重PCRを用いて、測定の各標的のPCR閾値サイクル数 (*Ct*) を測定することができる。

30

【0051】

決定された *Ct* 値を用いて、Yプロットを創出することができる。しかし、Yプロットを創出する前に、プレスクリーニングプロセスを実施することができる。プレスクリーニングプロセスでは、システムが3つの標的遺伝子配列のうちのいずれも検出しない場合、試料を *MRSA* 陰性とみなし、Yプロットには示さない。一実施形態では、*mecA* > 35、*femA* > 32、または *SCCmec* > 32 であれば、試料を陰性とみなす。別の実施形態では、*mecA* > 30、*femA* > 30、または *SCCmec* > 30 であれば、試料を陰性とみなす。一部の実施形態では、試料がこのプレスクリーニングプロセスを通過した後に、試料をYプロット上にプロットし、これにより解析する。プレスクリーニングプロセスで用いられる閾値は、機器および試料の調製に依存しうる。

40

【0052】

ステップ1020では、判定アルゴリズムを、既知試料の各々からの、測定された標的の各々に適用することができる。一実施形態によれば、判定アルゴリズムが、Yプロットを用いる。

【0053】

50

一実施形態によれば、各既知試料について、判定アルゴリズムが、Yプロットでありうる2Dプロット上へと投影されうる、中間ベクトルを創出する。中間ベクトルは、互いに120度ずつ離れた3つの単位ベクトルの和であることが可能であり、ステップ1020から得られるmecA値、femA値、およびSCCmec値によりこれを重み付けすることができる。一実施形態によれば、式：

【0054】

【数1】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + femA * e^{\frac{2}{3}\pi i} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi i}, \quad [ \text{式中 } \vec{p}$$

10

は、中間ベクトルである]により、ベクトルの和を表わすことができる。femAは、総称変数(generic variable)「SA」(Staphylococcus aureus 特異的な標的遺伝子配列と関連する値を表わす)で置き換えることができる。他の実施形態によればまた、測定された標的の相対量をどのように用いるかを表わすための他の類似の手段も用いることができる。

【0055】

ステップ1030では、未知試料がMRSAを含有するかどうかを決定するのに用いることができるモデルを創出するために、ステップ1020において創出した、各既知試料についての中間ベクトルを解析することができる。一実施形態によれば、既知試料の中間ベクトルを用いて、境界関数を選択し、境界関数のパラメータを定義する。境界関数を用いて、未知試料中にMRSAが存在するか、または未知試料中にMRSAが存在しないかを決定することができる。

20

【0056】

一実施形態によれば、測定された既知試料のすべてについてのYプロットに対してクラスタリング解析を実施して、MRSA陽性試料と、MRSA陰性試料を区分することができる。femA、mecA、およびSCCmecは、単一コピーの標的であり、MRSA陽性試料には、これらの標的のコピーが等量で存在するはずなので、クラスタリング解析により、陽性試料を併せてまとめることができる。数学的に述べると、これは、試料がMRSA陽性であれば、その中間ベクトルが、Yプロット上で原点近くに存在するはずであることを意味する。したがって、陽性試料を包含する矩形面積など、単純な境界関数を用いて、Yプロットの原点周囲に位置する陽性試料をクラスタリングすることができる。陰性試料は、この境界の外部に分散しうる。一実施形態によれば、単純な矩形ボックスを用いて、Yプロット上の陽性試料と陰性試料を区分することができる。既知試料からの測定値を用いて、矩形ボックスによる境界を調整することができる。例えば、ニューラルネットワークアルゴリズムを用いれば、該ボックスによる境界を定義する一助とすることができる。他の実施形態では、より複雑な境界関数を選択することもでき、他の手段を用いて、選択した境界関数の係数を調整することもできる。上記で言及した通り、他の手法(例えば、円形ゲーティングプロセス、ニューラルネットワーク、またはガウス分布関数)を用いて境界関数を創出することもできる。

30

【0057】

図2は、一実施形態により、MRSAが試料中に存在するかどうかを決定するのに用いうるステップを例示する。本明細書で用いられる未知試料とは、試料中にMRSAが存在するかどうか知られていない試料を指す。図2のステップは、図1によるステップを用いて創出されるモデルなどのモデルを用いて、未知試料がMRSAを含有するかどうかを決定しうる。未知試料は、様々な測定標的を有しうる。これらの測定値は、未知試料の測定標的から創出される中間ベクトルがモデルの境界関数に相対して存在するかどうかの分析によってMRSAの存在を検出するのに用いることができる。

40

【0058】

より一般的に述べると、本発明の実施形態は、試料中の生物学的実体の存在を決定するための方法を対象とする。該方法は、試料において、少なくとも3つの標的の値(例えば

50

、量)を検出するステップを含む。デジタルコンピュータ上で判定アルゴリズムを実行することにより、試料中の生物学的実体の存在を決定する。判定アルゴリズムは、少なくとも3つの標的の測定値(例えば、測定量)を入力として用い、その値を組み合わせるベクトルを形成し、これを、二次元プロット上の境界関数と比較する。ベクトルが、境界関数内にある場合は、生物学的実体が存在し、ベクトルが、境界関数内にない場合は、生物学的実体が存在しない。

【0059】

ステップ1100では、未知試料を、試料中の細菌の核酸を露出させる条件下に置く。モデルを構築しながらステップ1000において用いた同じ技法を、ステップ1100でもまた用いることができる。

10

【0060】

ステップ1110では、未知試料から、少なくとも3つの標的である *mecA*、*SCCmec*、および *Staphylococcus aureus* 特異的な標的遺伝子配列の Ct 値を測定する。ステップ1010において用いた同じ技法を用いて、ステップ1110を達成することができる。

【0061】

この時点で、上に記載したのと同様のプレスクリーニングプロセスを用いて、MRSAと関連しない可能性が極めて高い試料を除去することができる。

【0062】

ステップ1120では、モデルを構築するのに用いた判定アルゴリズムを、未知試料に由来する、測定された標的に適用することができる。例えば、ステップ1020で用いた同じ関数を用いて、未知試料から中間ベクトルを創出することができる。

20

【0063】

ステップ1130では、MRSAが未知試料に存在するかどうかを決定する。一実施形態によれば、未知試料について創出された中間ベクトルを、既知試料から創出された境界関数に対して比較することにより、これを達成することができる。未知試料の中間ベクトルが、MRSA陽性試料を示す境界内部に収まる場合は、該未知試料中のMRSAの存在を決定することができる。未知試料の中間ベクトルが、MRSA陽性の境界外部に外れる場合は、該未知試料中のMRSAの非存在を決定することができる。

【0064】

本発明の実施形態は、特に有利である。以下で言及する通り、MRSAが、他の複数の類縁細菌と共にコロニー形成しうることが多いという事実にもかかわらず、本発明の実施形態は、試料中のMRSAを同定するのに特に有用である。

30

【0065】

以下の例示的な実施例により、本発明の各種の実施形態がさらに実証される。該実施例は、例示を目的として示されるものであり、いかなる形であれ、本発明を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0066】

(実施例1)

試料の調製

659例の試料を収集し、一実施形態により用いることができるモデルを形成する目的でこれらを解析した。試料は既知試料であった、すなわち、試料の各々においてMRSAが存在するかどうかは既知であった。各試料について、2つずつのスワブを回収した。次いで、これらの2つのスワブを、個別に、MRSAについて培養した。2つのスワブからの培養結果が一致する場合は、この試料を有効(valid)であるとみなした。

40

【0067】

次いで、有効な各既知試料を、pH8.0のトリス1ml、およびpH8.0の1mM EDTAを伴う試料緩衝液用試験管内に入れた。3000rpmで40秒間にわたり、試料緩衝液用試験管をボルテックスすることにより、そのスワブヘッドから細菌をふるい

50

落とした。次いで、500  $\mu$ Lの細菌懸濁物（すなわち、細菌懸濁物を含有する試料緩衝液）を、未使用の試験管へと移した。

【0068】

次いで、10  $\mu$ Lのプロセスコントロール作業原液を、該未使用の試験管に添加した。また、10  $\mu$ Lの細胞壁消化酵素も、該未使用の試験管に添加した。短時間にわたりボルテックスした後、70 で5分間にわたり、該試験管をインキュベートした。次いで、Agencourt VirNA Extraction Kitを用いて、細菌DNAを抽出した。

【0069】

次いで、188  $\mu$ Lの溶解用緩衝液、1.0  $\mu$ LのポリA RNA (10  $\mu$ g/ $\mu$ L)、および100  $\mu$ LのProteinase K (20 mg/mL)を一緒に混合する(pH 8.0の10 mMトリス、50%のグリセロール、5 mMの塩化カルシウム中で)ことにより、プレミックス(pre-mix)を調製した。

【0070】

次いで、該プレミックスを、該試験管に添加し、1700 RPMで10秒間にわたりボルテックスし、次いで、70 の水浴中で5分間にわたりインキュベートした。

【0071】

該試験管を室温まで冷却した後に、100%のイソプロパノール575  $\mu$ L、および10  $\mu$ Lの結合緩衝液(カルボキシル基でコーティングした常磁性ビーズ)を該試験管に添加し、該試験管を、1700 RPMで10秒間にわたりボルテックスした。

【0072】

次いで、該試験管を室温で2分間にわたりインキュベートし、次いで、マイクロ遠心分離試験管用の磁石上で6分間にわたり静置し、磁性ビーズを捕捉した。その磁性ビーズを乱すことなく上清を吸引除去した。次いで、磁石から該試験管を取り去り、500  $\mu$ Lの洗浄用緩衝液(3.3 Mのチオシアン酸グアニジン、1.7% v/vのTriton X-100、167.5 mMのクエン酸ナトリウム)を添加した。

【0073】

該試験管を、1700 RPMで10秒間にわたりボルテックスし、次いで、磁石上に戻し、4分間にわたり静置した。次いで、上清を吸引除去し、廃棄した。磁石から該試験管を取り去り、75%のエタノール900  $\mu$ Lを添加した。次いで、該試験管を、1700 RPMで10秒間にわたりボルテックスし、磁石上に戻し、6分間にわたり静置し、上清を吸引除去した。75%エタノールによる洗浄を合計2回にわたり繰り返した。磁性ビーズを、磁石上、室温で15分間にわたり乾燥させた。

【0074】

DNAを溶出させるために、25  $\mu$ Lのヌクレアーゼ非含有水を、該乾燥させたビーズに添加した。短時間にわたり該試験管をボルテックスし、次いで、70 で5分間にわたりインキュベートした。次いで、該試験管を磁石上に戻し、1分間にわたり静置した。溶出した核酸を、PCR解析に用いた。

【0075】

PCR反応混合物の準備

まず、PCR試薬を融解させ、次いで、以下のステップの間、氷上で維持した。96ウェルプレート上の縁辺部のウェル(行AおよびHのウェル、列1および12のウェル)は用いなかった。PCRプレート1枚につき、1つの陽性対照および1つの陰性対照を用いた。

【0076】

次いで、試料および対照に必要とされる量の反応混合物を調製した。反応12回分の増量に基づき、該反応混合物を調製した。

【0077】

2.0 mLのポリプロピレン製試験管に、以下の容量: 5倍濃度のPCR反应用緩衝液300  $\mu$ L(反応1回当たりに必要とされる容量 $\times$ 13)、6倍濃度のOligo Mi

10

20

30

40

50

× 108.33 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)、1 MのMgCl<sub>2</sub> 2.6 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)、1単位/μLのUDG 31.2 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)、12.5 mMのdNTP 20.8 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)、40単位/μLのDNAポリメラーゼ 1.82 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)、およびH<sub>2</sub>O 95.25 μL (反応1回当たりに必要とされる容量×13)を添加した。

#### 【0078】

ウェル1個当たり30 μLの容量で、該反応混合物を、Stratageneの96ウェルPCRプレートへとアリコート分割した。20 μLのSPRI-TEにより抽出したDNA試料を、単一のウェルに添加した。20 μLの陰性対照を、ヌクレアーゼ非含有水を伴う単一のウェルに添加した。20 μLの陽性対照を、単一のウェルに添加した。45 μLのピペットセットを用いて、その混合物を上下に10回にわたりピペッティングすることにより、該試料および該反応混合物を作製した。次いで、その調製したPCRプレートを、Optical Adhesive Coverで密封し、次いで、3000 rpmで3分間にわたり遠心分離した。

#### 【0079】

##### モデルの創出および解析

次いで、そのプレートを、Stratagene Mx3005P qPCR測定器へとロードした。該プレート内で使用するウェルを選択し、蛍光データを収集するために、以下の色素：CY5、HEX、ROX、FAMを選択した。最後に、以下のサイクリング条件：37 で4分間(1回)；95 で1分間(1回)；91 で5秒間→62 で10秒間→58 で25秒間(50回)を指定した。モニタリング標的の一部を、以下の表1に表示する。

#### 【0080】

##### 【表1-1】

| 標的   | プライマー/プローブ  | 名称                    | 表1<br>配列(配列番号)                    |
|------|-------------|-----------------------|-----------------------------------|
| femA | フォワードプライマー  | femA-3 forward primer | GACCGTTATAATTTCTATGGTGTTAGTGG (1) |
|      | リバースプライマー   | femA-3 reverse primer | GTCACCAACATATTCAATAATTCAGC (2)    |
|      | TaqMan プローブ | femA-sa-probe         | ACAGAAGATGCTGAAGATGCTGGTGT (3)    |

#### 【0081】

【表 1 - 2】

|              |               |                         |                                           |
|--------------|---------------|-------------------------|-------------------------------------------|
| mecA         | フォワードプライマー    | mecA-2 forward primer   | GCAGAAAGACCAAAGCATACATATTGA (4)           |
|              | リバースプライマー     | MecA-2 reverse primer   | GCCTATCTCATATGCTGTTCTGT (5)               |
|              | TaqMan プローブ   | mecAprobe               | AGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCA (6)            |
| S.felis (IC) | IC フォワードプライマー | Sfforwardnew            | TGCCAATGTAGATAGTCTTCCAGA (7)              |
|              | IC リバースプライマー  | sfreversenew            | AAGTGCCCAGAAGAATGAGTGG (8)                |
|              | IC プローブ       | fSfelis                 | ACCGCCACCATTATTACGTACAGCTG (9)            |
| SCCmec       | フォワードプライマー    | OrfX-ISS/attBSc for-1   | TGAGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTG (10)           |
|              | フォワードプライマー    | OrfX-ISS/attBSc for-2   | TGCGGGTTGTGTTAATTGAACAAGTG (11)           |
|              | リバースプライマー     | mecII512-1-sccmec-3     | TCACITTTTATTCTTCAAAGATTGAGC (12)          |
|              | リバースプライマー     | primer11-1-sccmec-7     | AAATTGCTACTAAAGAGGATATGGAAAACCATC (13)    |
|              | リバースプライマー     | primer12-sccmec-8       | CTCTGCTTTATATTATAAAATTACGGCTG (14)        |
|              | リバースプライマー     | newtypeiii-1-sccmec-14  | CGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTTT (15)    |
|              | リバースプライマー     | <u>typeIVc-sccmec-2</u> | CTTGAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAAC (16)         |
|              | リバースプライマー     | NEWPRIMERS              | TGAGCTTTTTTCCACTCCCATTCTTCCAAA (17)       |
|              | リバースプライマー     | SCCmec-4nV              | GCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATAC (18)     |
|              | リバースプライマー     | SCCmec-3n               | CATTCATTCATCCACCCTAACTTAATCTTTC (19)      |
|              | リバースプライマー     | SCCmec-5n               | TATGGAAATCCATCTCTACTTTATTGTTTTCTTC (20)   |
|              | リバースプライマー     | SCCmec-6n               | AATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC (21)    |
|              | リバースプライマー     | SE-7-11                 | CTATTTCTGTAATACTTAAACCTTTTCTTCC (22)      |
|              | リバースプライマー     | SE-17                   | CCGTATGATTCATATTAATAATGAATCATACGGAGG (23) |
|              | リバースプライマー     | SE-13                   | CTTCTTATGAAATGTCTTTTTTCACTTATCC (24)      |

10

20

30

40

【表 1 - 3】

|  |             |              |                                     |
|--|-------------|--------------|-------------------------------------|
|  | TaqMan プローブ | orfx probe-2 | ATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAYGCTC (25) |
|  | TaqMan プローブ | ORFX PROBE-1 | ACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC (26) |
|  | TaqMan プローブ | ORFX PROBE   | ACGCCTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC (27) |

## 【0083】

10

他の実施形態では、配列および／または長さが実質的に同一である他のプライマーおよびプローブを本発明の実施形態に用いることができる。

## 【0084】

まず、閾値と共に、すべての試料ウェルおよび陽性対照ウェルを選択した。次いで、データ解析を実施した。次いで、FAM、HEX、ROX、およびCY5の順序で、PCR閾値を記録し、アッセイ判定アルゴリズムファイルへと記入した。試料について収集された閾値は、該試料の各々におけるmecA、femA、およびSCCmecの量に対応する。

## 【0085】

図1で例示する実施形態についてと同様に、各試料について、中間ベクトルを創出した。各中間ベクトルは、互いに120度ずつ離れた3つの単位ベクトルの和であり、それぞれ、mecA値、femA値、およびSCCmec値により重み付けした。用いた式は：

20

## 【0086】

## 【数2】

$$\vec{p} = mecA * e^{0i} + femA * e^{\frac{2}{3}\pi} + SCCmec * e^{\frac{4}{3}\pi}, \text{ [ 式中 } \vec{p}$$

は、中間ベクトルである]であった。2D-Yプロット上にプロットしたときに、これらの試料のうちの一部がどのようにあられるかの例示を、図3に示す。

30

## 【0087】

図3で見ることができる通り、MRSA陽性試料から創出される中間ベクトルは一般に、それらの終点が、プロットの原点周囲にクラスタリングされている。これに対し、MRSA陰性試料は一般に、それらの中間ベクトルの終点が、原点からより離れた位置に存在している。

## 【0088】

図4は、単純な矩形ボックス4000を、境界関数としてどのように用いて、陽性試料と陰性試料を区分することができるかを示す。659例の試料を、モデルの基礎として用いると、矩形ボックスの左縁、右縁、上縁、および下縁は、-3、2.5、2、および-1.3である。試料をクラスタリングするのに、単純な矩形を用いずに、より洗練された方法を他のモデルに適用することもできる。例えば、その場合はニューラルネットワークを用いて調整される関数により、境界を定義することができる。また、境界が矩形である必要はなく、他のモデルでは、より複雑な形状により、既知試料に対するより良好な適合(fit)をもたらすことができる。

40

## 【0089】

次いで、新たに創出されたモデルを用いて既知試料を解析し、該モデルが該既知試料をどの程度正確に類別するかを調べることができる。上に記載した通りに、各既知試料について中間ベクトルを計算し、該ベクトルを、境界関数と比較する、Yプロットベースの判定アルゴリズムは、659例の試料について、5例の偽陰性(FN)および0例の偽陽性(FP)を結果としてもたらした。5例のFNをより詳しく検討したところ、5例中3例

50

の試料が、少なくとも1つのアッセイで、C t 値 ( C t = 4 0 ) を伴わなかった。これは、陽性試料では生じないはずである。この理由で、これら3例の試料は、信頼できる検査点ではないと考える。こうして、これら3例のF Nを除いた後で、2例のF Nと0例のF Pが残る。これらの偽陰性のうちの1例を、図4の4 0 1 0で強調する。

【0090】

これに対し、基準方法 ( B D Gene ohm ( 商標 ) M R S A アッセイ ) を既知試料に適用したところ、3例のF Nおよび9例のF Pが結果として得られた。したがって、新規のM R S A 判定アルゴリズムは、基準方法と比較して、F Nを増大させずに、F Pの著明な低減を示す。

【0091】

( 実施例 2 )

試料の調製

199例の鼻腔内スワブを回収し、スチュアート輸送培地内で保存する。スワブヘッドを取り外し、各スワブヘッドを、p H 8 . 0 の 1 0 m M トリスおよび p H 8 . 0 の 1 m M E D T A を伴う、トリスベースの試料緩衝液 1 2 0 0  $\mu$  L、1 mm のジルコニア / シリカビーズ約 1 0 0 m g を伴う、2 m l の試料懸濁液用試験管へと移した。3 0 0 0 r p m の速度で少なくとも 1 5 秒間にわたり、該試料用試験管をボルテックスすることにより、該スワブヘッド上の細菌をふり落としした。

【0092】

次いで、該スワブヘッドを該試料用試験管から無菌的に取り出し、1 m l の T r y p i c S o y b r o t h ( T S B ) および 6 . 5 % の N a C l を伴う 1 5 m l の細菌培養用試験管へと移した。該接種された細菌用試験管を、3 7 のインキュベータへと移し、2 0 0 r p m の速度で振とうしながら一晩にわたりインキュベートした。

【0093】

次いで、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s および / または M R S A の存在または非存在を確認した。一晩にわたる培養ブロスを各々 1 0  $\mu$  L ずつ、B B L ( 商標 ) C H R O M a g a r M R S A プレートおよび B B L ( 商標 ) C H R O M a g a r S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s プレートへと画線した。次いで、A g e n c o u r t V i r N A キットのプロトコールに記載される通り、各試験管からの、1 2 0 0  $\mu$  L の試料溶液のうちの 5 0 0  $\mu$  L ずつを、DNA 単離手順にかけた。略述すると、プロセスコントロールとしての一定量の C F U の S . f e l i s 細菌 ( または C F U なしの一定量の S . f e l i s ) でこの手順を開始した。各試験管に 1 0 単位ずつのアクロモペプチダーゼ ( A c h r o m p e p t i d a s e ) を添加し、十分に混合し、7 0 の水浴中で 4 分間にわたりインキュベートした。次いで、各試料に、1 8 8  $\mu$  L の溶解用緩衝液、1 . 0  $\mu$  L の P o l y A ( 6 0 0  $\mu$  g / m l )、および 1 0 0  $\mu$  L のプロテアーゼ K ( 6 . 4 m g / m l ) を含有する、調製したての 2 8 9  $\mu$  L の溶解用溶液を添加し、十分に混合した。次いで、各試料をインキュベートし、次いで、2 分間にわたり冷却した。次いで、1 0  $\mu$  L の磁気ビーズ、および 5 7 5  $\mu$  L の 1 0 0 % イソプロパノールを添加し、ボルテックスすることにより十分に混合した。その反応内容物を、室温で 5 分間にわたりインキュベートし、次いで、該試料用試験管を磁気スタンド上に 6 分間にわたり静置することにより、磁気ビーズを回収して、該試料溶液が澄明となるまで、該溶液から磁気ビーズを分離した。

【0094】

次に、吸引の間にビーズを除去しないように注意しながら、該試料から上清を吸引除去した。5 0 0  $\mu$  L の洗浄用緩衝液を該試料に添加し、1 0 秒間にわたりボルテックスし、混合した。次いで、その試験管を、磁石上で 4 分間にわたり ( または澄明になるまで ) インキュベートした。次いで、再度、該試料から上清を吸引除去した。次いで、調製したての 7 5 % エタノール 9 0 0  $\mu$  L を添加し、該試験管を 1 0 秒間にわたりボルテックスした。次いで、その試験管を、磁石上で、澄明になるまで 4 分間にわたりインキュベートした。次いで、再度、該試料から上清を吸引除去し、今一度、エタノールによる洗浄を繰り返

10

20

30

40

50

した。次いで、該ビーズを、磁石上で、15～25分間にわたり乾燥させた。該ビーズのリングが開裂し始めた場合に、該試料が溶出した。磁石からその試験管を取り去り、ヌクレアーゼ非含有水25μLを添加し、DNAを溶出させた。次いで、該試料をボルテックスして混合した。次いで、その試験管を、70℃で5分間にわたりインキュベートした。その試験管を磁石上に戻し、1分間にわたりインキュベートした。次いで、溶出液を清潔な試験管へと移し、PCRによる増幅にかけた。

#### 【0095】

PCRプライマーおよびPCRプローブ、PCRサイクリング条件

Master mixの表で列挙される試薬は、氷上で調製した。総反応回数に応じて、DNA/RNAアーゼ非含有試験管に表示容量の試薬を一緒にして単純に添加することにより、十分なMaster mixを調製できた。その試験管をボルテックスして混合し、次いで、後の使用のために氷上に放置した。各溶出液20μLずつを、MX3000P 96ウェルPCRプレート（スカートなし）（Stratagene、型番401333）（1つのウェルに1つの溶出液）へと添加した。30μLのMaster mixを、溶出液で満たされた各ウェルに添加し、次いで、8回以上にわたり上下に静かにピペティングする（マルチチャネル型が有用であろう）ことにより、混合した。そのプレートを、MicroAmp（商標）光学接着フィルム（Applied Biosystems）により密閉し、次いで、1100×gで3分間にわたり遠心分離してから、PCR装置に入れた。

#### 【0096】

Stratagene MX3005P装置上でのPCRサイクリング条件は、以下：37℃で4分間（1回）；95℃で1分間（1回）；95℃で15秒間→62℃で10秒間→58℃で30秒間（40回）の通りに設定した。モニタリングした一部の標的については、上に記載している。

#### 【0097】

モデルの創出および解析

第1の例示的实施例で既に説明した通り、各標的の閾値をエクスポートし、判定アルゴリズムへと入力する。

#### 【0098】

本実施例における既知試料は、該第1の実施例とまったく同じ方法で収集したわけではないので、第2の実施例についてのYプロットアルゴリズムにおける矩形ボックスの左縁、右縁、上縁、および下縁は、-4、5、5、3、および-4であることが判明した。これを図5で例示する。上記モデルを用いて該既知試料を処理し直したところ、3例の偽陽性および4例の偽陰性が見つかった。これは、11例の偽陽性および2例の偽陰性をもたらす、Cephied Xpert（登録商標）によるMRSAについての基準方法に対する改良を表わした。

#### 【0099】

図6は、本発明の一実施形態を実行するのに用いることができるコンピュータシステム300のブロック図である。コンピュータシステム300は、一群の入力モジュールを有する。測定モジュール301を用いて、試料中の選択した標的を測定する。この測定モジュールは、標的の反応を測定するのに選択した測定方法に応じて、本発明の異なる実施形態間で異なりうる。例えば、一実施形態によれば、測定モジュールが、試料に対してPCR解析を実施しうる。測定モジュールは、典型的なリアルタイムPCR装置の作業コンポーネントの少なくとも一部により実施することができる。また、標準的なキーボード302およびマウス303も示す。コンピュータシステム300はまた、該コンピュータ内に各種の典型的なコンピュータの構成要素も含有する。これらの構成要素は、システムバス304、1つ以上のディスクドライブ305、RAM 306、およびプロセッサ307を包含する。実施形態の正確な性質に応じてまた、他の構成要素も存在しうる。図5はまた、システムの利用者への情報の表示を可能とするモニター308も示す。

#### 【0100】

本発明の一実施形態では、試料を処理し、試料から選択した標的の量を測定する測定モジュール301に試料を入れる。次いで、この情報を、システムバス304を通してコンピュータシステムへと移し、プロセッサ307を用いて、適切な判定アルゴリズムを反応データに適用することができる。判定アルゴリズムを実装する(implement)目的でプロセッサ307が実行する命令は、RAM306またはディスクドライブ305など、コンピュータにより読み取り可能な媒体に保存される。判定アルゴリズムもまた、この同じ媒体に保存することができる。次いで、判定アルゴリズムの出力を、モニター308に表示することができる。例えば、判定アルゴリズムが、中間ベクトルを介して3つの標的の測定量をグラフ表示するのに2D Yプロットを用いる場合は、該中間ベクトルの終点を、モニター308に表示することができる。本発明の代替的な実施形態は、他の通信手段を介して情報の出力をもたらしすることができる。例えば、コンピュータシステムは、プリンターを用いてYプロットを印刷することもできるし、ネットワークを介してYプロットを別のコンピュータへと送信することもできる。次いで、測定された試料からの情報を用いて、モデルを構築する一助とすることもでき、該試料がMRSAを含有するかどうかを決定する一助とすることもできる。

10

#### 【0101】

本発明が関連する技術分野における当業者には明らかである通り、本発明は、本発明の精神または本質的な特徴から逸脱しない限りにおいて、上記で具体的に開示した形態以外の形態においても実施することができる。したがって、上に記載した本発明の特定の実施形態は、例示的なものであると考えるものとし、制限的なものとしては考えないものとする。本発明の範囲は、前出の記載に含有される例に限定されるものではなく、添付の特許請求の範囲に示される通りである。

20

#### 【0102】

本出願に記載されるソフトウェアコンポーネント、ステップ、または関数は、例えば、従来の技法またはオブジェクト指向の技法を用いる、例えば、Java(登録商標)、C++、またはPerlなど、任意の適切なコンピュータ言語を用いる、1つ以上のプロセッサにより実行されるソフトウェアコードとして実装することができる。ソフトウェアコードは、ランダムアクセスメモリ(RAM)、読み取り専用メモリ(ROM)などのコンピュータにより読み取り可能な媒体(例えば一時的でない、コンピュータにより読み取り可能な媒体)、ハードドライブもしくはフロッピー(登録商標)ディスクなどの磁気媒体、またはCD-ROMなどの光学媒体に、一連の命令またはコマンドとして保存することができる。任意のこのようなコンピュータにより読み取り可能な媒体はまた、単一のコンピュータ装置上または単一のコンピュータ装置内に常駐させることができるが、システムまたはネットワーク内の異なるコンピュータ装置上または異なるコンピュータ装置内に存在させることもできる。

30

#### 【0103】

本発明の一部の実施形態は、ソフトウェアもしくはハードウェアまたはこれら両方の組合せにおける制御論理の形態で実装することができる。この制御論理は、本発明の実施形態で開示される一連のステップを実施するように情報処理デバイスを方向づけるのに適合させた複数の命令として、情報保存媒体内に保存することができる。本明細書で示される開示および教示に基づき、当業者は、本発明を実装する他の方途および/または方法を理解する。

40

#### 【0104】

特にそれに反することを意図しない限りにおいて、「ある(a)」、「ある(an)」、または「その、該(the)」は、「1つ以上の」を意味することを意図する。

#### 【0105】

【化 1】

**参考文献**

K. Becker, I. Pagnier et. al. Does nasal cocolonization by Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determination by molecular methods? *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2006, p229-231.

10

【 0 1 0 6 】

## 【化 2】

C. Cuny and W. Witte. PCR for the identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne orfX. *Clin. Microbiol Infect* 2005; 11:834-837.

C. Cuny and W. Witte. Method for detecting methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). European Patent Application EP 1529847 A1, 11.05.2005.

10

P Francois, D. Pittet et.al. Rapid detection of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. *Journal of Clinical Microbiology*, January 2003, p254-260.

K. Hiramatsu, T. Ito et. al. Method of identifying methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or methicillin-resistant coagulase negative staphylococci. United States Patent 6,156,507, December 5, 2000.

A. Huletsky, R. Giroux et. al. New real time PCR assays for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, May 2004, p1875-1884.

20

H. Matsunaga, K. Tsukumo et. al. Method and kit for detecting methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. United States Patent 5,702,895, December 30, 1997.

J. Schrenzel and P. Francois. Method for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. United States patent Application Publication US2004/0241824 A1, December 2, 2004.

30

D. Sinsimer, S. Leekha et. al. Use of a multiplex molecular beacon platform for rapid detection of methicillin and vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Sept. 2005, p4585-4591.

K. Mckernan, E. Gustafson, et. al. Methods of isolating nucleic acids using multifunctional group coated solid phase carriers. United States Patent Application Publication US 2006/0177836 A1, August 10, 2006.

J. Farley, P. Stamper, et. al. Comparison of the BD GeneOhm methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR assay to culture by use of BBL CHROMagar MRSA for detection of MRSA in nasal surveillance cultures from an at-risk community population. *Journal of Clinical Microbiology*, February 2008, p743-746.

40

## 【 0 1 0 7 】

## 【化 3】

R. Heusser, M. Ender, et al., Mosaic Staphylococcal Cassette Chromosome mec Containing Two Recombinase Loci and a New mec Complex, B2. Antimicrob. Agents Chemother. January 2007, p390-393.

T. Ito, Y. Katayama, et. Al., Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome mec integrated in the chromosome in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agent Chemother. 2001, 45: p1323-1336.

10

C. Heid, J. Stevens, et al., Real time quantitative PCR. Genome Research, 1996 6(10):986-994.

K Mullis and F Faloona, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987;155:335-50.

T. Ito, X. Ma et al., Novel Type V Staphylococcal Cassette mec Driven by a Novel Cassette Chromosome Recombinase, ccrC. Antimicrob. Agent Chemother. 2004, 48: P2637-2651.

20

M. Noto, B. Kreiswirth, et al., Gene Acquisition at the Insertion Site for SCCmec, the Genomic Island Conferring Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus, J. Bacteriol. 2008, 190:1276-1283.

30

本出願の全体では、各種の刊行物を参照する。これらの刊行物のそれらの全体における開示は、すべての目的で、本出願における参照により本出願に組み込まれる。いずれも先行技術であるとは容認されない。

【図 1】

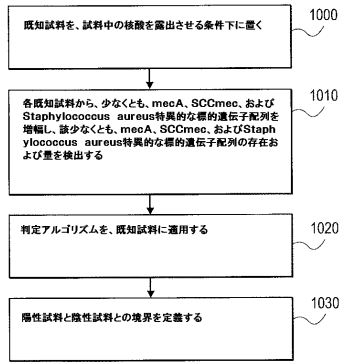


FIG. 1

【図 2】

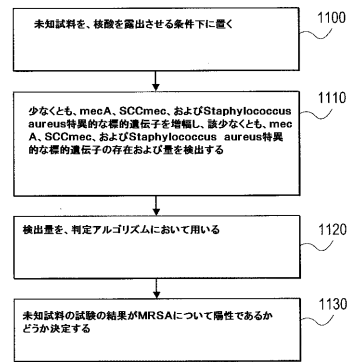


FIG. 2

【図 3】

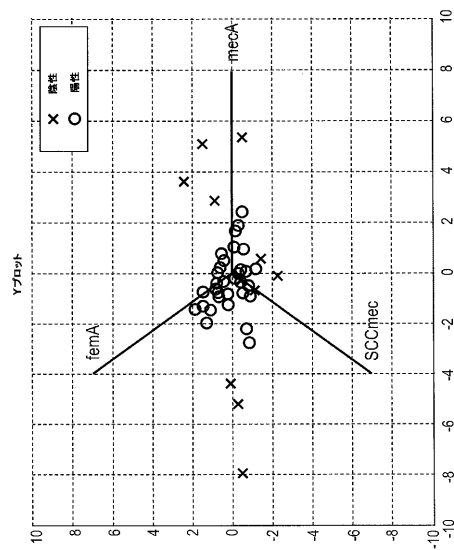


FIG. 3

【図 4】

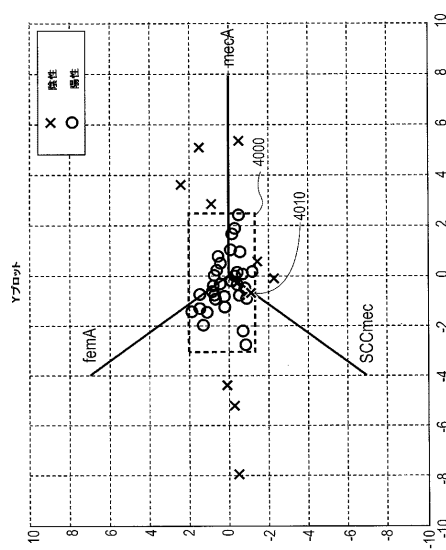
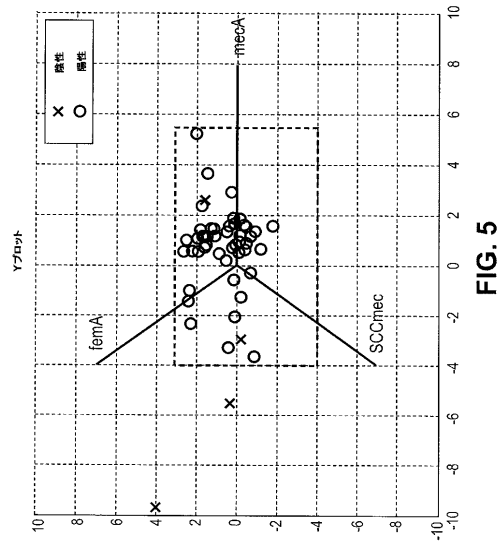
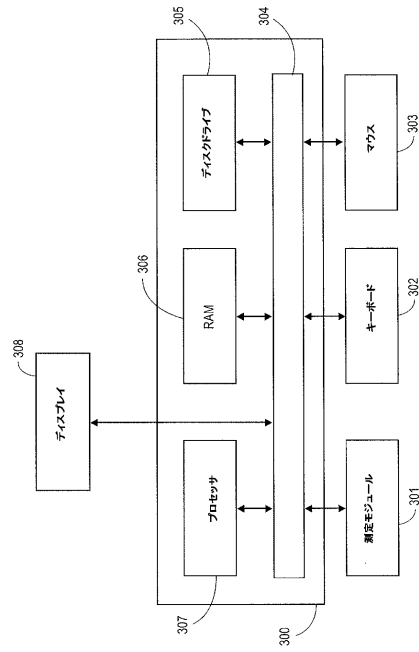


FIG. 4

【図 5】



【図 6】



【配列表】

0005907879000001.app

## フロントページの続き

- (72)発明者 ル, ジュリュ  
アメリカ合衆国 フロリダ 33032, ホームステッド, エスダブリュー 278ティエ  
イチ ストリート 14145
- (72)発明者 ワン, ジファ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02459, ニュートン, シンシア ロード 115
- (72)発明者 レイス, アントニオ アレバロ  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01949, ミドルトン, ソーヤー レーン 22
- (72)発明者 グスタフソン, エリック アラン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02062, ノーウッド, レイルロード アベニュー  
55
- (72)発明者 ライリー, ジョン スティーブン  
アメリカ合衆国 フロリダ 33196-3622, マイアミ, エスダブリュー 159 コ  
ート 10610

審査官 松野 広一

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2003/0030637(US, A1)  
国際公開第2009/018000(WO, A1)  
特表2004-531251(JP, A)  
国際公開第2008/129428(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G06F 19/10 - 19/28  
C12M 1/34  
C12Q 1/68  
C12N 15/09