



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0101065
(43) 공개일자 2012년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
G06F 19/24 (2011.01)
(21) 출원번호 10-2012-7015126
(22) 출원일자(국제) 2010년11월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/056455
(87) 국제공개번호 WO 2011/060222
국제공개일자 2011년05월19일
(30) 우선권주장
61/261,147 2009년11월13일 미국(US)

(71) 출원인
베크만 컬터, 인코포레이티드
미국 92821 캘리포니아주 브리어 사우쓰 크래머
블러바드 250
(72) 발명자
루, 줄루
미국 33032 플로리다주 홈스테드 에스더블유 278
번 스트리트 14145
왕, 지후아
미국 02459 매사추세츠주 뉴턴 신시아 로드 115
(74) 대리인
김영, 양영준

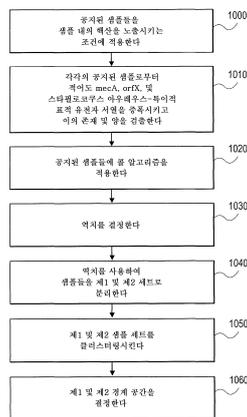
전체 청구항 수 : 총 66 항

(54) 발명의 명칭 **클러스터링을 사용하여 생물학적 상태의 존재를 검출하기 위한 시스템 및 방법**

(57) 요약

생물학적 실체의 존재를 결정하기 위한 방법이 제공된다. 이러한 방법은 적어도, 다수의 샘플과 관련된, 제1 유전 요소 (예를 들어, mecA)와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소 (예를 들어, femA)와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소 (예를 들어, orfX)와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계를 포함할 수 있다. 각각의 샘플은 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함한다. 이러한 방법은 제3 유전 요소와 관련된 역치를 결정하는 단계, 역치를 사용하여 샘플들을 제1 샘플 세트 및 제2 샘플 세트로 분리하는 단계, 제1 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특징 공간(feature space) 내에 클러스터링시키는 단계, 제1 샘플 세트를 사용하여 제1 경계 공간을 정의하는 단계, 및 제2 샘플 세트를 사용하여 제2 경계 공간을 정의하는 단계를 또한 포함한다. 제1 및 제2 경계 공간은 한 생물학적 실체를 다른 생물학적 상태로부터 구별한다. 다른 실시양태들은 SCCmec와 같은 유전 요소의 사용을 또한 포함할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

레예스, 안토니오 아레발로

미국 01949 매사추세츠주 미들턴 소이어 레인 22

구스타프슨, 에릭 알란

미국 02062 매사추세츠주 놀우드 레일로드 애비뉴
55

릴리, 존 스티븐

미국 33196-3622 플로리다주 마이애미 에스더블유
159 씨티. 10610

특허청구의 범위

청구항 1

적어도, 다수의 공지된 샘플과 관련된, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 각각의 공지된 샘플이 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함하는 것인 단계;

제3 유전 요소와 관련된 역치를 결정하는 단계;

역치를 사용하여 공지된 샘플들을 제1 공지된 샘플 세트 및 제2 공지된 샘플 세트로 분리하는 단계;

제1 공지된 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특징 공간 내에 클러스터링시키는 단계;

제1 공지된 샘플 세트를 사용하여 제1 경계 공간을 정의하고, 이때 제1 경계 공간이 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계; 및

제2 공지된 샘플 세트를 사용하여 제2 경계 공간을 정의하고, 이때 제2 경계 공간이 상기 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 유전 요소가 *mecA*를 포함하고, 제2 유전 요소가 *femA*를 포함하며, 제3 유전 요소가 *OrfX*를 포함하고, 생물학적 상태가 MRSA 상태를 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 각각 제1 및 제2 타원에 의해 정의되는 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 값이 Ct 값인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 입력 단계 전에,

공지된 샘플을 공지된 샘플 내의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하는 단계; 및

적어도 제1 유전 요소, 제2 유전 요소 및 제3 유전 요소를 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계

를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

적어도, 다수의 공지된 샘플과 관련된, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 각각의 공지된 샘플이 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함하는 것인 단계;

제3 유전 요소와 관련된 역치를 결정하는 단계;

역치를 사용하여 공지된 샘플들을 제1 공지된 샘플 세트 및 제2 공지된 샘플 세트로 분리하는 단계;

제1 공지된 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특징 공간 내에 클러스터링시키는 단계;

제1 공지된 샘플 세트를 사용하여 제1 경계 공간을 정의하고, 이때 제1 경계 공간이 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계; 및

제2 공지된 샘플 세트를 사용하여 제2 경계 공간을 정의하고, 이때 제2 경계 공간이 상기 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계

를 포함하는 방법을 구현하기 위한, 프로세서에 의해 실행가능한 코드를 포함하는 컴퓨터 판독가능 매체.

청구항 7

제7항의 컴퓨터 판독가능 매체, 및 상기 컴퓨터 판독가능 매체에 커플링된 프로세서를 포함하는 디지털 컴퓨터.

청구항 8

제7항의 디지털 컴퓨터에 커플링된 측정 모듈을 포함하는 시스템.

청구항 9

미지의 샘플과 관련된 제1 입력 값, 제2 입력 값, 및 제3 입력 값을 상기 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값이 미지의 샘플 내의 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련되는 것인 단계; 및

미지의 샘플을 상기 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터를 사용하여 제1 경계 공간 또는 제2 경계 공간을 사용하여 생물학적 상태와 관련되는 것으로서 분류하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 분석 모델을 사용하기 위한 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 생물학적 상태가 MRSA 상태를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

적어도, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계;

디지털 컴퓨터를 사용하여 적어도 다수의 제1 입력 값 및 적어도 제2 유전 요소와 관련된 제2 입력 값을 사용하여 하나 이상의 중간값을 생성시키는 단계; 및

디지털 컴퓨터를 사용하여 하나 이상의 중간값 및 다수의 제3 입력 값을 사용하여 생물학적 상태에 대한 경계 공간을 생성시키고, 이때 경계 공간이 상기 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계

를 포함하는, 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 분석 모델을 생성시키는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1 유전 요소가 *mecA*를 포함하고, 제2 유전 요소가 *femA*를 포함하며, 제3 유전 요소가 *SCCmec*를 포함하고, 생물학적 상태가 MRSA 상태를 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서, 경계 공간이 타원에 의해 정의되는 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 타원을 최적화하기 위해 비용 함수가 사용되는 것인 방법.

청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1, 제2 및 제3 값이 Ct 값인 방법.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 입력 단계 전에, 샘플을 샘플 내의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하는 단계; 및 적어도 제1 유전 요소, 제2 유전 요소 및 제3 유전 요소를 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

적어도, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계;

디지털 컴퓨터를 사용하여 적어도 다수의 제1 입력 값 및 적어도 제2 유전 요소와 관련된 제2 입력 값을 사용하여 하나 이상의 중간값을 생성시키는 단계; 및

디지털 컴퓨터를 사용하여 하나 이상의 중간값 및 다수의 제3 입력 값을 사용하여 생물학적 상태에 대한 경계 공간을 생성시키고, 이때 경계 공간이 상기 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계를 포함하는 방법을 구현하기 위한, 프로세서에 의해 실행가능한 코드를 포함하는 컴퓨터 판독가능 매체.

청구항 18

제11항의 컴퓨터 판독가능 매체, 및 상기 컴퓨터 판독가능 매체에 커플링된 프로세서를 포함하는 디지털 컴퓨터.

청구항 19

제18항의 디지털 컴퓨터에 커플링된 측정 모듈을 포함하는 시스템.

청구항 20

미지의 샘플과 관련된 제1 입력 값, 제2 입력 값, 및 제3 입력 값을 상기 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값이 미지의 샘플 내의 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련되는 것인 단계; 및

미지의 샘플을 경계 공간을 사용하여 생물학적 상태와 관련되는 것으로서 분류하는 단계

를 포함하는, 제11항 내지 제16항 중 어느 한 항의 방법에 따라 생성된 분석 모델을 사용하기 위한 방법.

청구항 21

샘플을 샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하는 단계;

샘플 내의 적어도 *mecA*, *orfX*, 및 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)-특이적 표적 유전자 서열을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계; 및

디지털 컴퓨터 상에서 콜(call) 알고리즘을 실행함으로써 샘플 내의 메티실린-저항성 스태필로코쿠스 아우레우스(MRSA)의 존재를 결정하고, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 *mecA*, *orfX*, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 검출된 *orfX*의 양이 역치 미만인 경우에는 콜 알고리즘이 제1 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하며, 검출된 *orfX*의 양이 역치를 초과하는 경우에는 콜 알고리즘이 제2 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인 단계

를 포함하는, 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위한 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열이 *femA*인 방법.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 둘 모두 타원형 경계 공간인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 원점 주위에서의 평행이동 및 각 변위를 거친 것인 방법.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 측정된 *mecA* 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양의 함수로서 정의되는 것인 방법.

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 경계 공간에 대한 최적의 파라미터를 확인하기 위해 비용 함수가 사용되는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 비용 함수가 하기 식에 의해 정의되는 것인 방법.

$$\text{비용} = c_1 * \text{FN\#} + c_2 * \text{FP\#}.$$

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 신경망(neural network)을 사용하여 정의되는 함수인 방법.

청구항 29

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 유전 알고리즘을 사용하여 정의되는 함수인 방법.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 내의 적어도 *mecA*, *orfX*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 존재 및 양이 실시간 PCR에 의해 검출되는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 적어도 *mecA*, *orfX*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양이 사이클(cycle)로 측정되는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 역치가 약 45 사이클인 방법.

청구항 33

샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용된 샘플 내의 적어도 *mecA*, *orfX*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출할 수 있는 측정 모듈;

측정 모듈로부터의 검출된 양을 저장하는 메모리;

콜 알고리즘을 실행하기 위한 명령어가 있는 컴퓨터 판독가능 코드를 함유하는 컴퓨터 판독가능 매체이며, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 *mecA*, *orfX*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 검출된 *orfX*의 양이 역치 미만인 경우에는 콜 알고리즘이 제1 경계 공간을 사용하여 메티실린-저항성 스타필로코쿠스 아우레우스(MRSA)의 존재를 결정하며, 검출된 *orfX*의 양이 역치를 초과하는 경우에는 콜 알고리즘이 제2 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인, 컴퓨터 판독가능 매체; 및

샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위해 컴퓨터 판독가능 매체 상의 컴퓨터 판독가능 코드를 실행하는 프로세서

를 포함하는, 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위한 시스템.

청구항 34

제33항 또는 제34항에 있어서, 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열이 femA인 시스템.

청구항 35

제33항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 둘 모두 타원형 경계 공간인 시스템.

청구항 36

제35항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 원점 주위에서의 평행이동 및 각 변위를 거친 것인 시스템.

청구항 37

제33항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 측정된 mecA 및 femA의 양의 함수로서 정의되는 것인 시스템.

청구항 38

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 경계 공간에 대한 최적의 파라미터를 확인하기 위해 비용 함수가 사용되는 것인 시스템.

청구항 39

제38항에 있어서, 비용 함수가 하기 식에 의해 정의되는 것인 시스템.

$$\text{비용} = c_1 * \text{FN\#} + c_2 * \text{FP\#}.$$

청구항 40

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 신경망을 사용하여 정의되는 함수인 시스템.

청구항 41

제33항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 유전 알고리즘을 사용하여 정의되는 함수인 시스템.

청구항 42

제33항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 내의 적어도 mecA, orfX, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 존재 및 양이 실시간 PCR에 의해 검출되는 것인 시스템.

청구항 43

제42항에 있어서, 적어도 mecA, orfX, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양이 사이클로 측정되는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 역치가 약 45 사이클인 방법.

청구항 45

콜 알고리즘에 대한 코드를 포함하고, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 mecA, orfX, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 검출된 orfX의 양이 역치 미만인 경우에는 콜 알고리즘이 제1 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하며, 검출된 orfX의 양이 역치를 초과하는 경우에는 콜 알고리즘이 제2 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를

결정하는 것인, 컴퓨터 판독가능 매체.

청구항 46

샘플을 샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하는 단계;

샘플 내의 적어도 *mecA*, *SCCmec*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열 (SA)을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계; 및

디지털 컴퓨터 상에서 콜 알고리즘을 실행함으로써 샘플 내의 메티실린-저항성 스타필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)의 존재를 결정하고, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 *mecA*, *SCCmec*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 콜 알고리즘이 적어도 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열 및 *mecA*로부터 중간값을 생성시키며, 콜 알고리즘이 중간값 및 *SCCmec*를 사용하여 정의되는 경계 공간을 추가로 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인 단계

를 포함하는, 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위한 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열이 *femA*인 방법.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 중간값이 *mecA* 및 SA의 함수로서 정의되고, 이때 중간값이 하기 식을 사용하여 정의되는 *mecA* 및 SA의 가중 선형 조합인 방법.

$$\text{중간값} = \text{mecA} * \sin(-0.3) + \text{SA} * \cos(-0.3).$$

청구항 49

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 측정된 *mecA* 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양의 함수로서 정의되는 것인 방법.

청구항 50

제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 경계 공간에 대한 최적의 파라미터를 확인하기 위해 비용 함수가 사용되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 비용 함수가 하기 식에 의해 정의되는 것인 방법.

$$\text{비용} = c_1 * \text{FN\#} + c_2 * \text{FP\#}.$$

청구항 52

제46항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 유전 알고리즘을 사용하여 정의되는 함수인 방법.

청구항 53

제46항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 내의 적어도 *mecA*, *SCCmec*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 존재 및 양이 실시간 PCR에 의해 검출되는 것인 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 적어도 *mecA*, *SCCmec*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양이 사이클로 측정되는 것인 방법.

청구항 55

샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용된 샘플 내의 적어도 mecA, SCCmec, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열 (SA)을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출할 수 있는 측정 모듈;

측정 모듈로부터의 검출된 양을 저장하는 메모리;

콜 알고리즘을 실행하기 위한 명령어가 있는 컴퓨터 판독가능 코드를 함유하는 컴퓨터 판독가능 매체이며, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 mecA, SCCmec, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 메티실린-저항성 스타필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 콜 알고리즘이 적어도 mecA 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열로부터 중간값을 생성시키며, 콜 알고리즘이 중간값 및 SCCmec를 사용하여 정의되는 경계 공간을 추가로 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인, 컴퓨터 판독가능 매체; 및

샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위해 컴퓨터 판독가능 매체 상의 컴퓨터 판독가능 코드를 실행하는 프로세서를 포함하는, 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하기 위한 시스템.

청구항 56

제55항에 있어서, 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열이 femA인 시스템.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 중간값이 mecA 및 SA의 함수로서 정의되고, 이때 중간값이 하기 식을 사용하여 정의되는 mecA 및 SA의 가중 선형 조합인 시스템.

중간값 = mecA * sin(-0.3) + SA * cos(-0.3).

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간 둘 모두가 측정된 mecA 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양의 함수로서 정의되는 것인 시스템.

청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및 제2 경계 공간에 대한 최적의 파라미터를 확인하기 위해 비용 함수가 사용되는 것인 시스템.

청구항 60

제59항에 있어서, 비용 함수가 하기 식에 의해 정의되는 것인 방법.

비용 = $c_1 * FN\# + c_2 * FP\#$.

청구항 61

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간이 유전 알고리즘을 사용하여 정의되는 함수인 시스템.

청구항 62

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플 내의 적어도 mecA, SCCmec, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 존재 및 양이 실시간 PCR에 의해 검출되는 것인 시스템.

청구항 63

제62항에 있어서, 적어도 mecA, SCCmec, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양이 사이클로 측정되는 것인 시스템.

청구항 64

콜 알고리즘에 대한 코드를 포함하고, 이때 콜 알고리즘이 적어도 검출 및 측정된 mecA, SCCmec, 및 스타필로코

쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하여 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하고, 콜 알고리즘이 적어도 mecA 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열로부터 중간값을 생성시키며, 콜 알고리즘이 중간값 및 SCCmec를 사용하여 정의되는 경계 공간을 추가로 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인, 컴퓨터 판독가능 매체.

청구항 65

공지된 샘플들의 세트를 이 공지된 샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하고, 이때 메티실린-저항성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)의 존재가 공지된 샘플들의 세트 내의 각각의 샘플에 대해 공지되어 있는 것인 단계;

공지된 샘플 내의 적어도 mecA, orfX, 및 스태필로코쿠스 아우레우스 (SA)-특이적 표적 유전자 서열을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계;

공지된 샘플들 내의 각각의 샘플에 대해 디지털 컴퓨터 상에서 콜 알고리즘을 실행하고, 이때 콜 알고리즘이 검출 및 측정된 mecA, orfX, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하는 것인 단계; 및

미지의 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있는 모델을 생성시키고, 이때 모델이 공지된 샘플들에 대해 실행된 콜 알고리즘의 출력물로부터 생성되고, 검출된 orfX의 양이 역치 미만인 경우에는 모델이 제1 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하며, 검출된 orfX의 양이 역치를 초과하는 경우에는 모델이 제2 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인 단계

를 포함하는, 미지의 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하는데 사용될 수 있는 모델을 생성시키기 위한 방법.

청구항 66

공지된 샘플들의 세트를 이 공지된 샘플 내에 존재하는 임의의 박테리아의 핵산을 노출시킬 조건에 적용하고, 이때 메티실린-저항성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)의 존재가 공지된 샘플들의 세트 내의 각각의 샘플에 대해 공지되어 있는 것인 단계;

공지된 샘플 내의 적어도 mecA, SCCmec, 및 스태필로코쿠스 아우레우스 (SA)-특이적 표적 유전자 서열을 증폭시키고 이의 존재 및 양을 검출하는 단계;

공지된 샘플들 내의 각각의 샘플에 대해 디지털 컴퓨터 상에서 콜 알고리즘을 실행하고, 이때 콜 알고리즘이 검출 및 측정된 mecA, SCCmec, 및 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 양을 입력물로서 사용하는 것인 단계; 및

미지의 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있는 모델을 생성시키고, 이때 모델이 공지된 샘플들에 대해 실행된 콜 알고리즘의 출력물로부터 생성되고, 모델이 적어도 스태필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열 및 mecA로부터 중간값을 생성시키며, 콜 알고리즘이 중간값 및 SCCmec를 사용하여 정의되는 경계 공간을 추가로 사용하여 MRSA의 존재를 결정하는 것인 단계

를 포함하는, 미지의 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하는데 사용될 수 있는 모델을 생성시키기 위한 방법.

명세서

기술분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2009년 11월 13일에 출원된 미국 가출원 번호 61/261,147의 정규 출원이고, 35 USC 119(e) 하에 이를 우선권으로 청구하며, 이는 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참고로 포함된다.

배경기술

[0003] 배경기술

[0004] 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)의 메티실린 저항성 균주 (MRSA)는 병원내 돌발이 포함되는 심각한 결과가 있는 감염에 연루되고, 광범위한 항생제에 대한 저항성을 나타내어, 치료 선택권을 제한한다.

모든 페니실린 및 세팔로스포린에 대해 예상대로 교차 저항성일 뿐만 아니라, 통상적으로 사용되는 여러 다른 항생제에 대해서 또한 전형적으로 저항성이기 때문에, 건강관리와 관련된 MRSA는 임상적으로 특히 중요하다. 일반적으로 MRSA 감염의 치료는 더욱 고가이고 종종 더욱 독성인 항생제를 필요로 하고, 이러한 항생제는 보통 최종 방어선으로서 사용된다. 따라서, MRSA의 신속한 검출이 치료 및 감염 제어 조치 둘 모두를 위해 임상적으로 매우 중요하다.

- [0005] MRSA가 종종 메티실린-민감성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MSSA), 메티실린-저항성 코아굴라제(coagulase)-음성 스태필로코쿠스 (MR-CoNS) 및/또는 메티실린-민감성 코아굴라제-음성 스태필로코쿠스 (MS-CoNS)가 포함되는 여러 다른 관련 박테리아와 함께 공동-콜로니화할 수 있다는 사실로 인해 MRSA의 검출이 추가로 복잡하다.
- [0006] 임상 미생물학 실험실에서의 MRSA의 검출을 위한 전통적인 방법은 MSSA 및 MR-CoNS로부터의 MRSA의 단리 및 구별을 위한 제1 단계로서 샘플로부터의 박테리아를 배양하는 단계를 수반한다. 이러한 접근법은 시간이 걸리고, 결과를 알 때까지 최소 20시간 내지 24시간이 필요하다.
- [0007] 메티실린 저항성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)의 검출 및 이를 메티실린 민감성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MSSA)로부터 구별하는 것을 위한 다수의 분자 기반 방법이 공개되어 있다. 한 이같은 방법은 MRSA의 2개의 별도의 영역인 스태필로코쿠스 카세트 염색체의 *mecA* 유전자 (SCC*mec*, 메티실린 저항성을 담당함) 및 스태필로코쿠스 아우레우스의 *spa* 유전자를 표적으로 한다 (미국 특허 5,702,895, 문헌 [Sinsimer, et al., Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2005, 4585-4591]). 메티실린 저항성에 대한 *mecA* 유전자를 또한 보유하는 메티실린 저항성 코아굴라제 음성 스태필로코쿠스 (MR-CoNS)와 같은 비-스타필로코쿠스 아우레우스 균주의 공존이 이러한 접근법을 사용한 MRSA의 명확한 검출을 방해한다 (문헌 [Becker, et al., Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2006, p229-231]).
- [0008] 더욱 최근의 분자적 접근법은 SCC*mec* 및 스태필로코쿠스 아우레우스 게놈의 플랭킹(flanking) 영역에 대한 프라이머 및 프로브를 활용한다 (미국 특허 6,156,507, 문헌 [Hutletsky, et al., Journal of Clinical Microbiology, May 2004, p1875-1884]). SCC*mec*는 *mecA* 유전자를 보유하는 이동성 유전 요소이고, *orfX* 유전자의 3' 끝부분에 있는 특정 부위인 attB*sc*에서 삽입된다. SCC*mec*의 왼쪽 말단은 attB*sc*의 비-*orfX* 측면과 인접하는 한편, SCC*mec*의 오른쪽 말단은 attB*sc*의 *orfX* 측면과 인접한다 (문헌 [Ito, et al., Antimicrob. Agent Chemother. 2001, 45, p1323-1336]; [Ito et al., Antimicrob. Agent Chemother. 2004, 48, p2637-2651], [Noto, et al., J. Bacteriol. 2008, 190: 1276-1283]). 이러한 접근법은 SCC*mec*/*orfX* 접합부의 검출로부터 *mecA* 유전자의 존재를 추론한다. 여러 상이한 유형의 SCC*mec*가 기술되어 있기 때문에 이러한 접근법은 다중 프라이머의 사용을 필요로 한다. 또한 이러한 접근법은 *mecA* 유전자를 함유하지 않는 SCC*mec* 카세트의 존재로 인한 가양성 결과 (문헌 [Farley, et al., Journal of Clinical Microbiology, February 2008, p743-746]) 및 검정에 포함되지 않는 새롭게 출현한 SCC*mec* 유형으로 인한 가음성 결과 (문헌 [Heusser, et al., Antimicrob. Agents Chemother. January 2007, p390-393])에 영향받기 쉽다.
- [0009] 또 다른 접근법은 상이한 SCC*mec* 유형들 간에 상동성이 높은 영역에서의 하나의 프라이머 및 플랭킹된 스태필로코쿠스 아우레우스 DNA에서의 하나의 프라이머를 이용한다 (문헌 [Cuny, et al., Clin. Microbiol Infect 2005; 11:834-837], 유럽 특허 1529847 B1). 이러한 영역을 포함하는 프라이머로는 MSSA를 또한 프라이밍할 가능성이 높기 때문에 이러한 접근법도 또한 가양성에 영향받기 쉽다.
- [0010] 마지막으로, 특이적 항체 및 자기 비드를 사용하여 스태필로코쿠스 아우레우스를 양성으로 선별하는 방법이 기술되었다 (문헌 [Francois, et al., Journal of Clinical Microbiology, January 2003, p254-260]; 유럽 특허 1,370,694B1). 이러한 접근법은 스태필로코쿠스 아우레우스에 대해 강화시키지만, MRSA를 양성으로 확인하고 CoNS를 검출할 가능성을 감소시키기 위해 3개의 프라이머/프로브 세트의 사용을 필요로 한다. 이러한 방법은 핵산을 회수하기 위해 원심분리 단계 및 별도의 용해 단계를 필요로 한다.
- [0011] 시판되는 MRSA 검정은 SCC*mec* 오른쪽 말단 접합부 및 *orfX*를 표적으로 한다. SCC*mec*의 5가지 상이한 유형 및 다수의 하위유형이 확인되어 있고, 새로운 SCC*mec* 하위유형의 출현 가능성이 높다. 또한, MRSA로부터 유래된 MSSA가 *mecA* 유전자가 없는 SCC*mec* 서열의 일부분을 유지할 수 있는 것이 가능하다. 따라서, *orfX*와의 SCC*mec* 오른쪽 말단 접합부를 표적으로 하는 검정은 MRSA-유래 MSSA의 가양성 결과 및 새롭게 출현한 SCC*mec* 유형/하위유형을 보유하는 MRSA의 가음성 결과를 제공할 가능성이 크다.
- [0012] 따라서, MRSA 검출을 위한 현재의 방법들은 힘이 들고, 시간이 걸리며, 상세하게 정확하지 않을 수 있다. 그러므로, 빠르고, 사용하기 쉬우며, 신뢰할 수 있고, MRSA와 같은 생물학적 실체를 검출할 수 있고 동시에 이를

MSSA, 및/또는 MR-CoNS, 또는 기타 생물학적 실체가 포함되는 다른 관련된 박테리아로부터 구별할 수 있는 방법 및 시스템이 요구된다.

발명의 내용

- [0013] 간략한 개요
- [0014] 본 발명의 실시양태들은 생물학적 상태가 샘플 내에 존재하는지 또는 존재하지 않는지를 결정하기 위한 시스템 및 방법에 관한 것이다. 본 발명의 일부 실시양태는 메티실린 민감성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MSSA), 메티실린 저항성 코아글라제-음성 스태필로코쿠스 (MR-CoNS), 및/또는 기타 박테리아 균주를 추가적으로 함유할 수 있는 샘플 내의 메티실린 저항성 스태필로코쿠스 아우레우스 (MRSA)를 검출하는 것을 포함하는 방법에 관한 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 한 실시양태는 적어도, 다수의 샘플과 관련된, 제1 유전 요소 (예를 들어, *mecA*)와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소 (예를 들어, *femA*)와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소 (예를 들어, *orfX*)와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계를 포함하는 (분석 모델을 생성시키는) 방법에 관한 것이다. 각각의 샘플은 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함한다. 이러한 방법은 제3 유전 요소와 관련된 역치를 결정하는 단계, 역치를 사용하여 샘플들을 제1 샘플 세트 및 제2 샘플 세트로 분리하는 단계, 제1 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특정 공간 내에 클러스터링시키는 단계, 제1 샘플 세트를 사용하여 제1 경계 공간을 정의하는 단계, 및 제2 샘플 세트를 사용하여 제2 경계 공간을 정의하는 단계를 또한 포함한다. 제1 및 제2 경계 공간은 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 실시양태는 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 분석 모델을 생성시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 방법은 적어도, 제1 유전 요소 (예를 들어, *mecA*)와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소 (예를 들어, *femA*)와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소 (예를 들어, *SCCmec*)와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 디지털 컴퓨터를 사용하여 적어도 다수의 제1 입력 값 및 적어도 제2 유전 요소와 관련된 제2 입력 값을 사용하여 하나 이상의 중간값을 생성시키는 단계, 및 하나 이상의 중간값 및 다수의 제3 입력 값을 사용하여 생물학적 상태에 대한 경계 공간을 생성시키는 단계를 또한 포함한다. 경계 공간은 이러한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별한다.
- [0017] 본 발명의 다른 실시양태는 이러한 분석 모델을 사용하기 위한 방법, 뿐만 아니라 이러한 분석 모델을 사용하는 컴퓨터 판독가능 매체 (예를 들어, 비-일시적 컴퓨터 판독가능 매체 예컨대 메모리 칩 및 메모리 디스크) 및 시스템에 관한 것이다.
- [0018] 이러한 실시양태들, 뿐만 아니라 기타 실시양태들이 이후에 본 개시내용에서 더욱 상세하게 기재될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 분석 모델을 형성시키기 위해 한 실시양태에 따라 취해진 단계들을 도시하는 흐름도를 나타낸다.
- 도 2는 한 실시양태에 따른 *orfX*의 역치 초과 및 미만의 2차원 공간에서의 *femA* 대 *mecA*를 도시하는 다이어그램을 나타낸다.
- 도 3a 및 3b는 한 실시양태에 따른 2차원 공간에서의 *femA* 대 *mecA*를 도시하는 다이어그램을 나타낸다.
- 도 4는 분석 모델을 사용하는 한 실시양태에 따라 취해진 단계들을 도시하는 흐름도를 나타낸다.
- 도 5는 중간값을 사용하는 분석 모델을 형성시키기 위해 한 실시양태에 따라 취해진 단계들을 도시하는 흐름도를 나타낸다.
- 도 6a 및 6b는 한 실시양태에 따른 2차원 공간에서의 *mecA* 대 *SCCmec* 및 *femA* 대 *SCCmec*를 도시하는 다이어그램을 나타낸다.
- 도 7은 한 실시양태에 따라 중간값을 생성시키고 이러한 중간값을 *SCCmec*와 함께 사용하여 경계 공간을 생성시키기 위한 방법을 도시하는 다이어그램을 나타낸다.
- 도 8은 한 실시양태에 따른 2차원 공간에서의 중간값 대 *SCCmec*를 도시하는 다이어그램을 나타낸다.

도 9는 한 실시양태에 따른 2차원 공간에서의 중간값 대 SCCmec의 함수로서의 경계 공간을 도시한다.

도 10은 분석 모델을 사용하는 한 실시양태에 따라 취해진 단계들을 도시하는 흐름도를 나타낸다.

도 11은 다양한 실시양태를 실행하는데 사용될 수 있는 시스템의 블록 다이어그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 상세한 설명
- [0021] 다양한 실시양태들이 샘플 내의 유전 요소 예컨대 *mecA*, *SCCmec*, *orfX*, 및/또는 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열 예컨대 *femA*의 측정된 양으로부터 샘플 내의 스타필로코쿠스 아우레우스의 메티실린 저항성 균주 (MRSA)를 확인하기 위한 시스템 및 방법을 개시한다. 본 발명의 일부 실시양태는 검출된 *orfX*의 양이 역치 미만인 경우에는 제1 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정하고, 검출된 *orfX*의 양이 역치를 초과하는 경우에는 제2 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정함으로써 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정한다. 다른 실시양태는 적어도 *mecA* 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열로부터 중간값을 생성시키고, 경계 공간을 사용하여 MRSA의 존재를 결정한다. 이러한 경계 공간은 중간값 및 *SCCmec*를 사용하여 정의될 수 있다.
- [0022] 본 개시내용에서 사용된 모든 과학 용어 및 기술 용어는 달리 상술되지 않는 한 당업계에서 통상적으로 사용되는 의미를 지닌다. 본 개시내용에서 사용되는 경우, 하기의 단어 또는 구절은 상술된 의미를 지닌다.
- [0023] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "샘플"은 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, 생물학적 기원의 임의 유형의 물질을 지칭하며, 이는, 예를 들어, 임의의 유체, 조직, 또는 세포일 수 있다. 예를 들어, 샘플은 생체액, 예를 들어, 소변, 혈액, 혈청, 혈장, 코 분비물, 뇌척수액 등일 수 있다. 별법적으로, 샘플은 배양된 세포 또는 조직, 미생물 배양물, 또는 생물학적 물질로부터 생산 또는 유래된 임의의 분획 또는 생성물일 수 있다. 임의적으로, 샘플이 정제되거나, 부분적으로 정제되거나, 정제되지 않거나, 강화되거나, 또는 증폭될 수 있다.
- [0024] 본원에서 사용되는 경우, 용어 "유전 요소"는 본 발명의 방법에서 표적으로서 유용한 관심 대상인 게놈 내의 하위서열(subsequence)을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전 요소는 오픈 리딩 프레임 또는 유전자, 예를 들어, 스타필로코쿠스 내의 *orfX*, *femA* 또는 *mecA*이다. 유전 요소는 또한 이동성 유전 요소, 예컨대 스타필로코쿠스 카세트 염색체인 *SCCmec*일 수 있고, 이는 *mecA* 유전자를 포함할 수 있거나 또는 포함하지 않을 수 있다.
- [0025] 본원에서 사용되는 경우, "입력 값"은 예를 들어 유전 요소와 관련될 수 있는 임의의 적절한 값일 수 있다. 예를 들어, 입력 값은 다양한 표적 유전자와 관련되는 Ct 값일 수 있다.
- [0026] 본원에서 사용되는 경우에, "경계 공간"은 "경계 함수"에 의해 정의되는 공간일 수 있다. "경계 함수"는 데이터가 생물학적 상태와 관련되는지 또는 생물학적 상태와 관련되지 않는지 여부를 결정하는데 사용되는 수학 함수일 수 있다. 경계 함수는 수동, 신경망(neural network)의 사용, 비용 함수의 사용 등을 포함하는 임의의 적절한 방식으로 생성될 수 있다. 또한 경계 함수는 타원, 직사각형, 원 등을 포함하는 임의의 적절한 형상 또는 선에 의해 표시될 수 있다. 또한 경계 함수는 형상이 규칙적이거나 불규칙적일 수 있다.
- [0027] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "*SCCmec*" "*SCCmec* 서열" 및 "*SCCmec* 카세트"는 스타필로코쿠스 카세트 염색체로서 공지된 유전 요소를 지칭하도록 상호교환가능하게 사용되고, 이는 문헌 [Ito et al., 2001, Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1323-1336]에 기재된 바와 같이, *mecA* 유전자를 보유하고, 스타필로코쿠스 종 게놈 내로 삽입된다. 한 실시양태에서, *SCCmec*는 *orfX* 접합부에 있다.
- [0028] *SCCmec* 삽입 부위는 본 출원에서 "*orfX*-ISS/*attBsc*"로 지칭된다. 이러한 삽입 부위는 본원에서 "*orfX*"로 지칭되는 스타필로코쿠스 아우레우스 유전자의 3' 끝부분에 있다. *SCCmec* 삽입이 일어나는 염색체 유전자좌는 "*attBsc*"로 지칭된다. 이러한 삽입 부위에서의 특이적 서열이 본원에서 "*orfX*-삽입 부위 서열 (*orfX*-ISS)" 또는 "*attBsc* 코어(core) 영역"으로 지칭된다. 이러한 서열은 스타필로코쿠스 아우레우스 내의 고도로 보존되는 서열인 것으로 공지되어 있다 (문헌 [Ito, et al., Antimicrob. Agent Chemother. 2001, 45, p323-1336], [Noto, et al., J. Bacteriol. 2008, 190:1276-1283]).
- [0029] 스타필로코쿠스 아우레우스의 *orfX*-ISS/*attBsc* 영역 내로의 삽입 후, *SCCmec*의 왼쪽 말단 접합부 영역은 MRSA-LE로 지칭되고, 오른쪽 말단 접합부 영역은 MRSA-RE로 지칭된다. 왼쪽 말단 접합부에서, *SCCmec* 서열은 *attBsc*의 비-*orfX* 측면과 인접한다. 오른쪽 말단 접합부에서, *SCCmec* 서열은 *attBsc*의 *orfX* 측면과 인접한다. *orfX*-ISS/*attBsc* 영역이 문헌 [Ito et al., 2001, Antimicrob. Agents Chemother. 45:1323-

1336]; [Ito et al., *Antimicrob. Agent Chemother.* 2004, 48, p2637-2651], [Noto, et al., *J. Bacteriol.* 2008, 190:1276-1283] 및 미국 특허 번호 6,156,507에 상세하게 기재되어 있고, 이들 모두는 본원에 참고로 포함된다. SCCmec 삽입이 존재하지 않으면, orfX-ISS/attBscC 영역이 중단되지 않는다. 증폭 절차를 통해 orfX-ISS/attBscC 영역이 손상되지 않은 것으로 확인되면, 이는 SCCmec 카세트가 삽입되지 않았음을 지시한다. 그러나, orfX-ISS/attBscC 영역 증폭이 없는 것이 mecA 유전자가 존재한다는 것을 지시하지는 않는다. SCCmec 카세트가 삽입된 후에 mecA 유전자가 상실될 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, mecA의 부재 하에서도 SCCmec 카세트가 여전히 orfX-ISS/attBscC 영역의 증폭을 방지할 수 있다.

- [0030] "올리고뉴클레오타이드"는 2개 이상의 뉴클레오타이드 서브유닛이 공유결합으로 함께 연결된 뉴클레오타이드 중합체이다. 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 뉴클레오타이드 약 10개 내지 약 100개이다. 뉴클레오타이드 서브유닛의 당기는 리보스, 데옥시리보스, 또는 이의 변형된 유도체 예컨대 OMe일 수 있다. 뉴클레오타이드 서브유닛들은 포스포디에스테르 결합, 변형된 결합과 같은 결합에 의해, 또는 올리고뉴클레오타이드가 이의 상보적인 표적 뉴클레오타이드 서열에 혼성화하는 것을 방지하지 않는 비-뉴클레오타이드 모이어티(moiety)에 의해 연결될 수 있다. 변형된 결합에는 표준 포스포디에스테르 결합이 상이한 결합, 예컨대 포스포포티오에이트 결합, 메틸포스포네이트 결합, 또는 중성 펩티드 결합으로 교체된 것들이 포함된다. 질소성 염기 유사체 또한 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드의 성분일 수 있다. "표적 핵산"은 표적 핵산 서열을 포함하는 핵산이다. "표적 핵산 서열", "표적 뉴클레오타이드 서열" 또는 "표적 서열"은 상보적인 올리고뉴클레오타이드에 혼성화될 수 있는 특이적인 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 서열이다.
- [0031] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "프로브"는 관심 대상인 표적 핵산에 혼성화할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 혼성화는 관심 대상인 표적 핵산에 대한 상보적인 염기 쌍-형성을 통해 프로브가 결합하는 것의 결과로서 발생한다. 당업자는 전형적으로 프로브가 혼성화 조건의 엄격도에 따라 프로브 서열과의 완전한 상보성이 없는 표적 서열에 실질적으로 결합할 것임을 이해할 것이다. 프로브 (그리고 따라서 이의 표적)가 검출, 가시화, 측정 및/또는 정량될 수 있도록 프로브가 적절한 표지 또는 리포터 모이어티와 회합될 수 있다.
- [0032] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "프라이머"는 핵산 합성을 프라이밍하는데 사용되는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 상보적인 염기 쌍-형성을 통해 주형에 혼성화하고, 따라서 복제를 개시시키는데 사용된다. 혼성화는 프로브에 대해 상기 기재된 것과 동일한 방식으로 발생한다. PCR에서, 2개의 프라이머가 사용된다: 전형적으로 센스 가닥에 혼성화하는 "전방향 프라이머", 및 전형적으로 안티센스 가닥에 혼성화하는 "역방향 프라이머".
- [0033] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "PCR"은 살아 있는 유기체를 사용하지 않으면서 DNA의 효소적 복제에 의해 더 긴 이중 가닥 DNA 분자 내의 짧은 DNA 서열 (일반적으로 염기 50개 내지 600개)을 기하급수적으로 증폭시키기 위한 기법을 지칭한다 (문헌 [Mullis et al., *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50]). 기타 시험관내 증폭 기법이 본 발명에서 사용될 수 있고, 당업자에게 주지되어 있다. 이러한 방법에는, 예를 들어, 리가제 연쇄 반응 (LCR), 핵산 서열을 기초로 하는 증폭 (NASBA), 가닥 치환 증폭 (SDA), 전사 매개 증폭 (TMA), 분지형 DNA 기술 (bdNA) 및 롤링 서클(Rolling Circle) 증폭 기술 (RCAT)이 포함된다.
- [0034] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "실시간 PCR"은 증폭된 DNA를 반응에서 측정되는 대로 각각의 증폭 사이클 후에 실시간으로 정량하는 PCR 유형을 지칭한다 (문헌 [Heid et al., *Genome Research*, 1996 6(10):986-994]). 실시간 PCR을 수행하기 위한 다수의 프로브 화학이 당업자에게 주지되어 있다. 한 통상적으로 사용되는 방법은 택맨(TaqMan)[®] 검정이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,210,015; 5,487,972; 및 5,804,375 참조). 사용될 수 있고 상업적으로 구입할 수 있는 기타 실시간 PCR 프로브 화학에는 FRET 프라이머, 분자 비콘(Molecular Beacon), 스크피온(Scorpion) 프라이머[®], 앰플리플루오르(Amplifluor) 프라이머[®], LUX 프라이머[®], 이클립스(Eclipse)[®], 및 얼티메이트(Ultimate) 프로브[®]가 포함된다. 실시간 PCR 기법의 검토를 위해, 문헌 [Bustin et al., *J. Mol. Endocrin.* 34:597-601 (2005)]을 참조한다.
- [0035] 본원에서 사용되는 경우에, 용어 "멀티플렉스(multiplex) PCR"은 1개 초과인 프라이머 세트가 반응에 포함되어, 2가지 이상의 상이한 표적이 단일 반응 튜브에서 증폭되도록 하는 PCR 유형을 지칭한다. 용어 "멀티플렉스 PCR"은 다수의 프라이머 및 프로브가 사용되지만 1개의 표적만 증폭되는 PCR 유형을 또한 지칭한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 멀티플렉스 PCR은 실시간 PCR이다.
- [0036] 본원에서 사용되는 경우에, "생물학적 상태"는 임의의 공급원, 예를 들어, 환자로부터 유래된 샘플의 특정 생물학적 상태에 관련될 수 있다. 대부분의 경우에, 생물학적 상태는 샘플이 특정 생물학적 실체, 예를 들어, 표적

질환 유기체 또는 질환과 관련된 환자 세포를 포함하는지 여부에 관련된다. 예를 들어, 한 생물학적 상태는 샘플이 MRSA 박테리아를 포함하는 것일 수 있는 한편, 또 다른 생물학적 상태는 샘플이 MRSA 박테리아를 포함하지 않는 것일 수 있다. 다른 예에서, 생물학적 상태는 샘플이 암 세포를 포함하는지 여부에 관련될 수 있다.

[0037] 본 발명의 한 실시양태는 MRSA, MSSA, MR-CoNS, 또는 기타 박테리아를 함유할 수 있는 샘플 내의 MRSA의 검출을 위한 검정에 관한 것이다. 본 발명의 실시양태는 다중 표적의 조합물을 동시에 증폭시키고 검출하기 위해 멀티플렉스 PCR 공정을 이용할 수 있다.

[0038] 한 실시양태에 따르면, 표적 DNA의 초기 양이 PCR 역치 사이클 (Ct)에 의해 측정된다. 예를 들어, 규정된 신호 역치를 분석될 반응에 대해 결정한다. 이러한 신호 역치에 도달하는데 필요한 사이클의 수 (Ct)를 표적 핵산, 뿐만 아니라 기준 또는 표준 핵산에 대해 결정한다. 기준 핵산과 비교하여 표적 핵산에 대해 수득된 Ct 값을 기초로 표적 분자의 절대적 또는 상대적인 카피수를 결정할 수 있다. 따라서, Ct 값은 초기 표적 DNA의 양에 반비례하고, Ct 값의 자세한 논의에 대해서는 본원에 참고로 포함된 문헌 [Heid et al., 1996, Genome Research 6(10):986]을 참조한다. 확인된 방법들 중 하나 동안 증폭된 유전자들의 예정된 세트 양 또는 수의 표시를 기초로 특정 표적 유전자의 초기 양의 외삽을 허용하는 기타 수학적 접근법을 사용할 수 있다.

[0039] 한 실시양태에서, 본 발명은 형광에 의해 검출되는데 충분하고 샘플 내의 하나 이상의 MRSA-특이적 표적 서열의 초기 수준을 지시하는 증폭 생성물 수준을 생성시키도록 하는 시간 및 조건으로 샘플을 실시간 PCR에 적용하는 것을 포함하는, 샘플 내의 MRSA의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 또 다른 실시양태에서, 프라이머 (전방향 및 역방향) 및 프로브의 세트가 증폭이 수행된다. 프로브를 그의 5' 끝부분에서 형광발생성 리포터 분자로, 그의 3' 끝부분에서 켄칭(quenching) 분자로 표시할 수 있다. 켄칭 분자는 형광발생성 리포터 분자로부터의 신호 방출을 방지한다. 프로브는 전방향 및 역방향 프라이머가 혼성화하는 영역들 사이의 표적 서열 영역에 혼성화한다. 폴리머라제가 프로브가 혼성화된 가닥을 따라 이동함에 따라, 프로브의 5' 끝부분이 폴리머라제의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 절단되어, 켄칭 모이어티의 분리로 인해 형광 발생성 신호의 방출을 허용한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 본 발명의 프로브가 형광성 리포터 (형광단) 및 형광성 또는 비-형광성 켄처(quencher) 분자를 포함하는 이중-표지 형광발생성 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명의 형광단은 5' 말단, 3' 말단 또는 한 쪽 말단에 대한 내부를 포함하는 임의의 위치에서 프로브에 부착될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 형광단 및 켄처가 프로브의 5' 및 3' 말단에 각각 부착된다. 형광단의 예로는 FAM, ROX, HEX, NED, Cy5, 텍사스 레드(Texas Red), 칼플루오르 레드(CalFluor Red), 칼플루오르 오렌지(CalFluor Orange), 퀴사르(Quasar) 670, 퀴사르 705가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 켄처의 예로는 TAMARA, 블랙홀(Blackhole) 켄처 BHQ-1, BHQ-2가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0042] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 3-표적 검정에서 사용되는 표적 (유전 요소의 예일 수 있음)에 mecA 유전자 서열, 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열, SCCmec 유전자 서열, 및/또는 orfX가 포함되는 것인, 3-표적 검정을 사용하여 MSSA, MR-CoNS, 또는 기타 박테리아로부터 MRSA를 검출 및 구별하기 위한 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자는 femA이다. 하기의 설명에서, femA가 종종 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열로서 명시적으로 언급되지만, 기타 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열이 다양한 실시양태에 따라 또한 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 일부 실시양태는 적어도 제1 및 제2 경계 공간을 사용하는 분석 모델의 형성, 뿐만 아니라 이같은 분석 모델의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 다른 실시양태는 하나 이상의 중간값을 사용하여 경계 공간을 형성하는 분석 모델의 생성 및 용도에 관한 것이다. 또 다른 실시양태는 이같은 분석 모델을 사용하기 위한 방법, 뿐만 아니라 이같은 분석 모델을 사용하는 시스템에 관한 것이다. 이러한 접근법들이 하기에서 추가로 상세하게 기재된다.

[0044] **2개 이상의 경계 공간을 사용하는 실시양태**

[0045] 도 1은 본 발명의 실시양태에 따른 분석 모델을 형성시키는데 사용될 수 있는 단계들을 도시하는 흐름도를 나타낸다. 일부 경우에, 이러한 분석 모델은 MRSA가 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0046] 단계 1000에서, 선택된 수의 공지된 샘플을 샘플 내의 박테리아의 핵산을 노출시키는 조건에 적용한다. 일부 실시양태에서, 공지된 샘플은 특정 생물학적 상태와 관련되는지 여부가 공지되어 있는 것이다. 예를 들어, 공지된 샘플은 샘플이 MRSA와 관련되는지 여부가 공지되어 있는 것일 수 있다. 따라서, 공지된 샘플은 추후의 미

지의 샘플이 또한 MRSA를 함유하는지 여부를 결정할 수 있는 모델을 형성시키는데 사용될 수 있다.

- [0047] 샘플을 샘플 내의 핵산을 노출시키는 조건에 적용하기 위한 다수의 상이한 방식이 있다. 예를 들어, 샘플 내의 세포를 주지된 기술에 따라 용해시킬 수 있다. 그 후, 예를 들어, 샘플의 온도를 상승시켜 핵산의 가닥들을 분리시킴으로써, 핵산을 변성시킬 수 있다.
- [0048] 단계 1010에서, 적어도 3개의 표적, 예컨대 *mecA*, *orfX*, 및 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열의 특성 (예를 들어, 상대적 또는 절대적인 양 또는 발현량)을 샘플에서 측정한다. 한 실시양태에 따르면, 스타필로코쿠스 아우레우스-특이적 표적 유전자 서열은 *femA*이다. 샘플 내의 이같은 유전 요소들의 양을 측정하는 다수의 상이한 방식이 있다. 예를 들어, 멀티플렉스 PCR 공정을 사용하여, 각각의 측정 표적에 대한 PCR 역치 사이클 (Ct) 값을 측정할 수 있다.
- [0049] 적어도 3개의 표적의 특성을 측정한 후, 이러한 특성들과 관련된 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력할 수 있다. 예시적인 디지털 컴퓨터의 상세사항이 하기에 제공된다. 다양한 입력 값을 임의의 적절한 방식으로 디지털 컴퓨터 내로 입력할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자동으로 (예를 들어, 입력 값 또는 입력 값을 생성시키는데 사용되는 데이터를 생성시키는 측정 모듈에 대한 데이터 연결부를 통해) 또는 사용자에게 의해 수동으로 값들을 디지털 컴퓨터 내로 입력할 수 있다.
- [0050] 일부 실시양태에서, 적어도 제1 유전 요소 (예를 들어, 제1 표적 예컨대 *mecA*)와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소 (예를 들어, 제2 표적 예컨대 *femA*)와 관련된 다수의 제2 입력 값, 및 제3 유전 요소 (예를 들어, 제3 표적 예컨대 *orfX*)와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력한다. 제1, 제2 및 제3 입력 값은 다수의 공지된 샘플과 관련된다. 각각의 공지된 샘플은 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함한다. 제1, 제2 및 제3 값은 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련된 Ct 값일 수 있다.
- [0051] 단계 1020에서, 각각의 공지된 샘플로부터의 각각의 측정된 표적에 콜(call) 알고리즘을 적용할 수 있다. 콜 알고리즘은 임의의 적절한 명령어 조합을 지닐 수 있다. 일부 실시양태에서, 콜 알고리즘은 임의의 적절한 조합으로 도 1의 단계 1030, 1040, 1050, 및 1060 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0052] 단계 1030에서, 제3 유전 요소 (예를 들어, *orfX*)와 관련된 역치를 결정한다. 임의의 적절한 방식으로 역치를 결정할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 역치는 단순히 이산값 예컨대 "45"일 수 있다. 역치가 미리 디지털 컴퓨터 내로 입력되어 디지털 컴퓨터 내의 메모리에 저장되었을 수 있거나, 또는 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값이 디지털 컴퓨터 내로 입력되는 시간과 거의 동시에 사용자가 역치를 입력할 수 있다.
- [0053] 단계 1040에서, 콜 알고리즘이 역치를 사용하여 공지된 샘플들을 제1 샘플 세트 및 제2 공지된 샘플 세트로 분리한다. 예를 들어, 어떤 샘플이 역치 초과에 속하고 어떤 샘플이 역치 미만에 속하는지를 결정함으로써 콜 알고리즘은 제1 공지된 샘플 세트를 제2 공지된 샘플 세트로부터 분리할 수 있다. 실례적으로, 제3 유전 요소가 *orfX*이고 역치가 Ct 값 "45"이면, 제1 공지된 샘플 세트는 *orfX*에 대한 Ct 값이 45 미만일 수 있고, 제2 공지된 샘플 세트는 *orfX*에 대한 Ct 값이 45 이상일 수 있다.
- [0054] 단계 1050에서, 샘플들이 분리된 후, 제1 샘플 세트 내의 샘플을 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특징 공간 내에 클러스터링시킨다. 제1 및 제2 샘플 세트를 임의의 적절한 방식으로 클러스터링시킬 수 있다. 예를 들어, 제1 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 2차원 공간 내에 플롯팅(plotting)할 수 있다. 제2 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 2차원 공간 내에 플롯팅할 수 있다. 예를 들어, 도 2에 이러한 플롯팅이 도시되고, 이는 $orfX < 45$ 및 $orfX \geq 45$ 인 경우의 *femA* 대 *mecA*의 2개의 플롯을 나타낸다.
- [0055] 단계 1060에서, 제1 경계 공간 및 제2 경계 공간을 각각 제1 및 제2 샘플 세트를 사용하여 정의한다. 제1 및 제2 경계 공간은 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별한다. 도 2에서, 제1 및 제2 경계 공간이 타원으로 제시된다.
- [0056] 제1 및 제2 경계 공간을 임의의 적절한 방식으로 결정할 수 있고, 이들은 임의의 적절한 형상일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 경계 공간이 타원에 의해 정의될 수 있다. 다른 실시양태에서, 경계 공간들이 직사각형, 다각형, 평행육면체, 또는 기타 형상에 의해 정의될 수 있다. 이같은 경계 공간들을 신경망 및 기타 최적화 알고리즘에 의해 결정 및 최적화할 수 있다. 제1 및 제2 경계 공간이 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는데 사용될 수 있는 분석 모델의 적어도 일부분을 형성할 수 있다.

[0057] 일부 경우에, 사용자를 보조하기 위해, LCD 스크린과 같은 디스플레이 상의 제1 및 제2 샘플 세트를 포함하여 2차원 플롯에 제1 및 제2 경계 공간을 그래프로 디스플레이하는 것이 바람직할 수 있다.

[0058] 도 1에 제시된 방법을 예시하는 구체적인 실시양태가 이제 기술될 수 있다. 3-표적 "전략 A" 알고리즘을 위해, 296개 표본 런(run)을 수집하고, 분석 모델 개발에 제공하였다. 전략 A의 구현에서, 제1, 제2 및 제3 유전 요소에 상응하는 3개의 표적은 *mecA*, *femA*, 및 *orfX*를 포함하였다.

[0059] 임의의 분류 과제에서, 한 사건 클래스를 또 다른 클래스로부터 구별하기 위해 적합한 특성들이 측정된 경우에, 데이터가 카테고리화되도록 하는 독특한 특징 공간이 존재할 것이다. 이는 MRSA 분류에 대해 사실이다. 이러한 응용에 일상적인 분석을 생성시키기 위해, 도 3a에 제시된 바와 같이 특징 공간이 관찰되었다. 도 3a에서, 양성 및 음성 데이터 둘 모두가 *femA*-대-*mecA* 2차원 특징 공간에서 플롯팅된다. 양성 데이터 점들은 왼쪽 아래 구석에서 대각선을 따라 클러스터링되고, 음성 데이터 점들은 더욱 무작위로, 특히 위쪽 절반 공간 및 오른쪽 아래 구석에 분포된다.

[0060] 이러한 데이터 및 추가적인 확증 데이터를 기초로, 양성 특징 공간을 캡슐화하도록 수학 모델을 선택하였다. 양성 사건에 대한 데이터는 타원과 유사하고, 이는 양성 클러스터와 음성 클러스터 간의 경계를 나타내도록 선택되었다. 바람직한 특징 공간 내에서 양성 데이터가 일반적으로 가우스 분포를 형성한다는 점에서 타원형 경계가 이상적인 선택으로 간주될 수 있다 (특징 공간의 경계를 나타내는 가우스 분포의 단면이 타원임을 유지한다). 이는 도 3b의 타원형 모델을 정당화한다. 수학적으로, 이러한 타원형 모델에 대한 방정식은 하기와 같이 제공된다.

[0061]
$$\frac{x^2}{a^2} + \frac{y^2}{b^2} = 1$$

[0062] [식중, *a*는 긴 반지름이고, *b*는 짧은 반지름이다]. 이러한 경우에, 타원은 원점 근처에 중심이 있는 것으로 가정된다. MRSA 검출을 지지하기 위해, 타원형 모델은 (*x*₀, *y*₀)에 의해 정의되고 각도가 θ 인 원점 주변에서의 평행이동 및 각 변위를 지지할 필요가 있다.

[0063] 따라서, 가장 일반적인 형태에서, 타원은 2차원 특징 공간에서 하기와 같이 완전히 특성화될 수 있다.

[0064]
$$\frac{x'^2}{a^2} + \frac{y'^2}{b^2} = 1$$
 식중
$$\begin{cases} x' = -\cos(\theta)x + \sin(\theta)y - x_0 \\ y' = \sin(\theta)x + \cos(\theta)y - y_0 \end{cases}$$

[0065] 이러한 일반화된 타원은 *a*, *b*, *x*₀, *y*₀ 및 θ 인 5가지 파라미터의 세트에 의해 좌우될 수 있다. 일단 파라미터들의 세트가 결정되면, 독특한 타원 (또는 특징 공간)이 정의된다.

[0066] 타원형 파라미터들의 최적의 세트를 획득하기 위해, 분류 결과를 기초로 비용 함수가 정의될 수 있다. 이러한 유형의 응용을 위해, 통상적으로 사용되는 비용 함수는 수신자 조작 특성(receiver operating characteristic) 또는 ROC 곡선의 곡선하 면적이다 (ROC 곡선에 관한 더욱 상세한 기술에 대해서 http://en.wikipedia.org/wiki/Receiver_operating_characteristic 참조). ROC 곡선은 이러한 응용에 민감도 대 1-특이성의 그래프 플롯을 제공한다. MRSA 응용에 대해, 가양성 개수와 가음성 개수의 조합이 비용 함수로서 적용된다.

[0067]
$$\text{비용} = c_1 * FN\# + c_2 * FP\#.$$

[0068] 가중 인자 *c*₁ 및 *c*₂는 특정 과제에서의 선호를 나타내도록 선택된다.

[0069] 특징 공간에 대한 수학 모델 및 디자인된 비용 함수 정의가 주어지면, 특징 공간에 대한 모델을 비용 함수를 최소화하도록 최적화할 수 있다. 최소 비용을 지니는 모델의 실현은 분류 과제에 대한 최적의 해법이다. 사용될 수 있는 몇몇 최적화 절차 예컨대 힐 클라이밍(Hill Climbing), 모의 어닐링(Simulated Annealing), 유전 알고리즘(Genetic Algorithm) 등이 있다. 이러한 응용에 대해, 유전 알고리즘을 이용한다. 유전 알고리즘에 관한 더욱 상세한 정보를 http://en.wikipedia.org/wiki/Genetic_algorithms에서 확인할 수 있다.

[0070] 도 2를 참조로, 2차원 특징 공간에서 *femA*-대-*mecA*에 의해 측정된 특징들이 이러한 모델에 대해 항상 균질하거나 이상적이지 않았음이 관찰되었다. 예를 들어, 도 2에 제시된 바와 같이, *orfX*가 45 이상인 경우, 양성 데이터 점이 (윤곽이 그려진 바와 같이) "폭넓은(fat)" 클러스터를 형성하는 한편, *orfX*가 45 미만인 경우에는, 양

성 데이터 점들이 타원에 더 일치하는 클러스터를 형성한다. 결과적으로, 2개의 타원형 모델이 $orfX < 45$ 및 $orfX \geq 45$ 에 대해 각각 확립된다. 이러한 $orfX$ -의존적 타원형 모델로, MRSA 양성 샘플에 대한 데이터가 3차원 공간 내에 본질적으로 분류된다.

[0071] 그 후, 도 2에 예시된 분석 모델의 그래프식 묘사를 사용하여, 미지의 샘플을 특정 생물학적 상태 예컨대 MRSA와 관련되는 것으로 분류할 수 있다.

[0072] 일반적으로, 형성된 분석 모델의 사용은 미지의 샘플과 관련된 제1 입력 값, 제2 입력 값, 및 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계를 포함할 수 있다. 디지털 컴퓨터는 분석 모델을 형성하는데 사용된 것과 동일한 디지털 컴퓨터일 수 있거나, 또는 상이한 디지털 컴퓨터일 수 있다 (예를 들어, 분석 모델이 한 디지털 컴퓨터 상에서 형성되지만, 또다른 디지털 컴퓨터에 저장되어 사용되는 경우). 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값은 미지의 샘플 내의 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련된다. 입력 값들을 입력한 후, 디지털 컴퓨터는 미지의 샘플을 분석 모델을 사용하여 제1 경계 공간 또는 제2 경계 공간을 사용하여 생물학적 상태와 관련되는 것으로 분류한다.

[0073] 도 4는 한 실시양태에 따라 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있는 단계들을 도시한다. 본원에서 사용되는 경우에, 미지의 샘플은 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부가 공지되지 않은 샘플을 지칭한다. 도 4의 단계들은 모델, 예컨대 도 1로부터의 단계들을 사용하여 생성된 모델을 사용하여 미지의 샘플이 MRSA를 함유하는지 여부를 결정할 수 있다. 미지의 샘플에는 측정된 다양한 표적이 있을 수 있고, 미지의 샘플의 측정된 표적으로부터 생성된 매개 벡터가 모델의 경계 함수와 관련하여 어디에 존재하는지를 분석함으로써 이러한 측정치들을 사용하여 MRSA의 존재를 검출할 수 있다.

[0074] 단계 1100에서, 미지의 샘플을 샘플 내의 박테리아의 핵산을 노출시키는 조건에 적용한다. 도 1의 단계 1000에 관하여 상기 기재된 것과 동일한 기법을 단계 1100에서 또한 사용할 수 있다.

[0075] 단계 1110에서, 적어도 3개의 표적인 *mecA*, *femA*, 및 *orfX* (또는 기타 유전 요소)와 관련된 특성들을 미지의 샘플로부터 결정할 수 있다. 상기 도 1의 단계 1010 동안 사용된 것과 동일한 기법을 단계 1110을 달성하는데 사용할 수 있다. 이러한 특성들은 분석 모델을 형성시키는데 사용된 특성과 동일할 수 있다. 예를 들어, Ct 값이 분석 모델을 형성시키는데 사용되면, 단계 1110에서 3개의 표적에 대해 Ct 값을 결정할 수 있다.

[0076] 단계 1120에서, 분석 모델을 3가지 표적과 관련된 입력 값에 적용할 수 있다. 분석 모델과 관련된 과정은 적어도 도 4의 단계 1130 및 1140을 포함할 수 있다.

[0077] 단계 1130에서, 예를 들어, 방법은 *orfX*와 관련된 제3 입력 값이 분석 모델에서의 역치 (예를 들어, "45") 초과인지 또는 미만인지 여부를 결정한다.

[0078] 단계 1140에서, 미지의 샘플과 관련된 제3 입력 값이 역치 (예를 들어, 45) 미만이면, 앞서 형성된 제1 경계 공간을 사용하여 샘플이 관심 대상인 생물학적 상태 (예를 들어, MRSA)와 관련되는지 여부를 결정한다. 별법적으로, 미지의 샘플과 관련된 제3 입력 값이 역치 (예를 들어, 45)를 초과하면, 앞서 형성된 제2 경계 공간을 사용하여 샘플이 관심 대상인 생물학적 상태 (예를 들어, MRSA)와 관련되는지 여부를 결정한다.

[0079] 원한다면, 추가적인 규칙을 사용하여 미지의 샘플을 추가로 분류할 수 있다. 예를 들어, 1개, 2개 또는 3개, 또는 이를 초과하는 개수의 추가적인 표적 (예를 들어, MR-CoNs와 관련된 표적)이 추가적인 데이터로서 사용될 수 있고, 이를 미지의 샘플을 분류하는데 추가적으로 사용할 수 있다.

[0080] **중간값을 사용하는 실시양태**

[0081] 본 발명의 또 다른 실시양태는 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 분석 모델을 생성시키기 위한 방법에 관한 것일 수 있다. 이러한 방법은 적어도 하나의 중간값을 이용한다. 이같은 실시양태는 도 5를 참조로 기재될 수 있다.

[0082] 단계 5000에서, 선택된 개수의 공지된 샘플을 샘플 내의 박테리아의 핵산을 노출시키는 조건에 적용한다. 단계 5000의 상세사항은 도 1의 단계 1000과 관련하여 기재된 것과 동일하거나 상이할 수 있고, 상기 설명이 반복될 필요는 없다.

[0083] 단계 5010에서, 적어도 3개의 표적, 예컨대 *mecA*, *femA*, 및 SCC*mec*의 특성들을 각각의 공지된 샘플에 대해 측정한다. 단계 5010의 상세사항은 도 1의 단계 1010과 관련하여 기재된 것과 유사하거나 상이할 수 있고, 상기 설명이 반복될 필요는 없다. 그러나, 이러한 예에서, SCC*mec*가 *orfX* 대신 표적으로서 확인된다는 것을 주지해야

한다.

- [0084] 입력 값들이 결정된 후, 이들을 디지털 컴퓨터 내로 입력한다. 일부 실시양태에서, 입력 값은 디지털 컴퓨터 내로의 공지된 샘플들과 관련된 제1 유전 요소 (예를 들어, 제1 표적 예컨대 *mecA*)와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소 (예를 들어, 제2 표적 예컨대 *femA*)와 관련된 다수의 제2 입력 값, 및 제3 유전 요소 (예를 들어, 제3 표적 예컨대 *SCCmec*)와 관련된 다수의 제3 입력 값을 적어도 포함한다. 제1, 제2 및 제3 입력 값은 임의의 적절한 시간에 임의의 적절한 순서로 디지털 컴퓨터 내로 입력할 수 있다.
- [0085] 단계 5020에서, 콜 알고리즘을 각각의 공지된 샘플로부터의 각각의 측정된 표적에 적용할 수 있다. 이러한 예에서의 콜 알고리즘은 도 1과 관련하여 상기 기재된 콜 알고리즘과 상이하다.
- [0086] 단계 5030에서, 디지털 컴퓨터를 사용하여 적어도 다수의 제1 입력 값 및 적어도 제2 유전 요소와 관련된 제2 입력 값을 사용하여 하나 이상의 중간값을 결정할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 유전 요소 (*mecA*) 및 제2 유전 요소 (*femA*)와 관련된 제1 및 제2 입력 값 (예를 들어, 제1 및 제2 Ct 값)을 사용하여 하나 이상의 중간값을 생성시킬 수 있고, 이를 제3 유전 요소 (예를 들어, *SCCmec*)와 관련된 제3 입력 값과 조합할 수 있다.
- [0087] 단계 5040에서, 하나 이상의 중간값이 생성된 후, 디지털 컴퓨터를 사용하여 하나 이상의 중간값 및 다수의 제3 입력 값을 사용하여 생물학적 상태에 대한 경계 공간을 생성시킨다. 경계 공간은 이러한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별한다.
- [0088] 실례적으로, 3-표적 "전략 C" 알고리즘을 위해, 199개의 표본 런을 수집하고, 이를 알고리즘 개발에 제공하였다. 전략 "C"의 구현에서, 3개의 표적은 *mecA*, *femA*, 및 *SCCmec*였다.
- [0089] *mecA*-대-*SCCmec* 및 *femA*-대-*SCCmec*의 2차원 특징 공간이 도 6a 및 6b에서 제시된다. 상기 2차원 특징 공간 모두에서 양성 및 음성이 혼합되어 있고 구별될 수 없는 회색 구역 (흑색 원으로 윤곽이 그려짐)이 있는 것이 관찰된다.
- [0090] 회색 구역을 극복하기 위해, 신규 파라미터를 사용하여 사건을 양성 또는 음성으로 구별할 수 있다. 이러한 신규 파라미터는 하기와 같이 확립되었다.
- [0091] 신규 파라미터 = $mecA * \sin(-0.3) + femA * \cos(-0.3)$
- [0092] 제1 유전 요소 (예를 들어, *mecA*)와 관련된 제1 입력 값 및 제2 유전 요소 (예를 들어, *femA*)와 관련된 제2 입력 값으로부터 유래되기 때문에 이러한 "신규 파라미터"는 중간값의 한 예이다.
- [0093] 도 7은 어떻게 신규 파라미터를 생성시키고 사용할 수 있는지의 예시를 나타낸다. 도 7은 *mecA* 810 및 *femA* 820과 관련된 값들이 조합되어 중간값 Y 840을 형성할 수 있음을 나타낸다. 이러한 중간값 Y 840과 *SCCmec* 830은 2차원 특징 공간을 형성할 수 있고, 이를 사용하여 미지의 샘플을 MRSA 또는 MRSA가 아닌 것과 관련되는 것으로 분류하기 위한 경계 공간을 정의할 수 있다.
- [0094] 신규 파라미터-대-*SCCmec* 특징 공간의 플롯이 도 8에서 제공된다. 이러한 도면에서, 회색 구역이 사라지고, 신규 파라미터가, *SCCmec*와 함께, 분류를 위한 더 양호한 특징 공간을 구성한다.
- [0095] "신규 파라미터" 및 *SCCmec*가 주어지면, 양성 및 음성 데이터 점들 간의 경계를 정의하도록 타원형 모델 (도 9에 제시된 바와 같음)을 확립하였다. 앞서 기재된 것과 동일한 방식으로 유전 알고리즘으로 타원형 모델을 최적화할 수 있다. (예를 들어, 임의의 앞서 기재된 경계 형성 기법, 예컨대 상기 단계 1060에서의 것들을 본 발명의 실시양태에서 사용할 수 있다.) 타원 내부에 위치하는 모든 데이터 점은 MRSA 양성으로 간주된다.
- [0096] 도 10은 한 실시양태에 따라 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있는 단계들을 도시한다. 본원에서 사용되는 경우에, 미지의 샘플은 샘플 내에 MRSA가 존재하는지 여부가 공지되지 않은 샘플을 지칭한다. 이러한 방법은 분석 모델, 예컨대 도 5로부터의 단계들을 사용하여 생성된 모델을 사용하여 미지의 샘플이 MRSA를 함유하는지 (또는 또 다른 생물학적 상태와 관련되는지) 여부를 결정할 수 있다. 미지의 샘플 내의 다양한 표적의 특성을 측정하여 제1, 제2 및 제3 입력 값을 형성시킬 수 있다. 이러한 입력 값 및 분석 모델을 사용하여, 미지의 샘플 내의 MRSA의 존재를 검출할 수 있다.
- [0097] 도 10을 참조로, 단계 6000에서, 미지의 샘플을 샘플 내의 박테리아의 핵산을 노출시키는 조건에 적용한다. 도 1의 단계 1000 동안 사용된 것과 동일한 기법을 단계 6000에서 사용할 수 있다.

- [0098] 단계 6010에서, 적어도 3개의 표적인 *mecA*, 및 *SCCmec*의 특성들을 미지의 샘플로부터 측정한다. 제1, 제2 및 제3 입력 값을 미지의 샘플에 대해 결정할 수 있다. 단계 1010과 관련하여 상기 기재된 것과 동일한 기법을 단계 6010을 달성하는데 사용할 수 있다.
- [0099] 단계 6020에서, 분석 모델, 및 제1, 제2 및 제3 입력 값을 사용하여 특정 생물학적 상태 (예를 들어, MRSA 또는 MRSA 아님)가 미지의 샘플 내에 존재하는지 여부를 결정할 수 있다.
- [0100] 단계 6030에서, 분석 모델을 제1, 제2 및 제3 입력 값에 적용할 때, 제1 및 제2 입력 값을 사용하여 중간값을 결정할 수 있다. 예를 들어, 하기 식을 사용하여 중간값을 결정할 수 있다.
- [0101] $Y = \text{신규 파라미터} = \text{mecA} * \sin(-0.3) + \text{femA} * \cos(-0.3)$
- [0102] 실례로서, $\text{mecA} = 28.49$, $\text{femA} = 27.90$, 및 $\text{SCCmec} = 27.26$ 인 샘플이 주어지면, $Y = 18.2345$ 이다.
- [0103] 이러한 방법에서, 단계 6040에서, 분석 모델 내에 있는 경계 함수를 사용함으로써 샘플이 MRSA에 대해 양성인지 여부를 결정한다. 예를 들어, 상기 예에서, $Y = 18.2345$ 및 $\text{SCCmec} = 27.26$ 인 값들을 도 9의 타원형 경계 함수에 비교할 수 있다. 이러한 예는 경계 함수 내부에 속할 것이기 때문에, 미지의 샘플은 MRSA 양성으로 분류될 것이다.
- [0104] **시스템**
- [0105] 도 11은 디지털 컴퓨터 (300), 및 디지털 컴퓨터 (300)에 작동적으로 커플링 (전자 커플링을 포함할 수 있음)된 측정 모듈 (301)을 포함하는 시스템을 나타낸다.
- [0106] 이러한 예에서, 디지털 컴퓨터 (300)은 작동적으로 함께 커플링된, 시스템 버스 (304), 하나 이상의 디스크 드라이브 (305), RAM (306), 및 프로세서 (307)이 포함되는 다양한 전형적인 컴퓨터 성분을 포함할 수 있다. 실시양태의 정확한 성질에 따라 기타 성분이 또한 존재할 수 있다. 도 11은 디스플레이 (308), 키보드 (302), 및 마우스 (303)을 또한 나타낸다. 이러한 성분들 및 기타 성분들이 또한 일부 실시양태에서 디지털 컴퓨터의 일부일 수 있다.
- [0107] 샘플 (예를 들어, 공지된 샘플 또는 미지의 샘플) 내의 선택된 표적의 특성들을 측정하는데 사용되는 측정 모듈 (301)이 또한 시스템에 있을 수 있다. 이러한 측정 모듈은 표적 응답을 측정하도록 선택된 측정 방법에 따라 본 발명의 상이한 실시양태들 간에 다를 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에 따르면, 측정 모듈은 샘플에 대한 PCR 분석을 수행할 수 있고, 따라서 실시간 PCR 장치일 수 있다. 실시간 PCR 장치들은 상업적으로 입수가 가능하다.
- [0108] 본 발명의 한 실시양태에서, 샘플이 측정 모듈 (301) 내에 놓이며, 여기에서 샘플이 프로세싱되어, 샘플로부터의 선택된 표적들의 특성 (예를 들어, 양)이 측정된다. 그 후, 이러한 데이터 (예를 들어, 앞서 기재된 입력 값)가 시스템 버스 (304)를 따라 디지털 컴퓨터 (300) 내로 전송되고, 프로세서 (307)을 사용하여 적합한 콜 알고리즘 또는 분석 모델을 응답 데이터에 적용할 수 있다. 명령어들이 프로세서 (307)이 콜 알고리즘 또는 분석 모델 (상기 기재된 바와 같음)을 실행하도록 야기하고, 이는 컴퓨터 판독가능 매체 예컨대 RAM (306) 또는 디스크 드라이브 (305)에 저장될 수 있다. 콜 알고리즘 및/또는 분석 모델을 나타내는 데이터 또한 이러한 동일한 매체에 저장될 수 있다. 그 후, 콜 알고리즘 또는 분석 모델의 적용으로부터의 출력물이 디스플레이 (308) 또는 기타 출력 장치 (예를 들어, 프린터) 상에 디스플레이될 수 있다. 예를 들어, 앞서 기재된 경계 함수 및 이의 관련 그래프가 디스플레이 (308) 상에 디스플레이될 수 있거나, 또는 일부 다른 방식으로 출력될 수 있다. 따라서, 측정된 샘플로부터의 정보가 모델을 형성시키는 것을 돕거나 또는 샘플이 MRSA를 함유하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0109] 상기 언급된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 컴퓨터 판독가능 매체는 분석 모델을 형성시키기 위한 방법을 구현하도록 프로세서에 의해 실행될 수 있는 코드를 저장하거나 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 방법은 적어도, 다수의 공지된 샘플과 관련된, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 각각의 공지된 샘플이 다수의 제1 입력 값 중의 제1 입력 값, 다수의 제2 입력 값 중의 제2 입력 값, 및 다수의 제3 입력 값 중의 제3 입력 값을 포함하는 것인 단계; 제3 유전 요소와 관련된 역치를 결정하는 단계; 역치를 사용하여 공지된 샘플들을 제1 공지된 샘플 세트 및 제2 공지된 샘플 세트로 분리하는 단계; 제1 공지된 샘플 세트를 제1 유전 요소 및 제2 유전 요소에 의해 정의되는 특징 공간 내에 클러스터링시키는 단계; 제1 공지된 샘플 세트를 사용하여 제1 경계 공간을 정의하고, 이때 제1 경계 공간이 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부

터 구별하는 것인 단계; 및 제2 공지된 샘플 세트를 사용하여 제2 경계 공간을 정의하고, 이때 제2 경계 공간이 한 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 방법은 적어도, 제1 유전 요소와 관련된 다수의 제1 입력 값, 제2 유전 요소와 관련된 다수의 제2 입력 값 및 제3 유전 요소와 관련된 다수의 제3 입력 값을 디지털 컴퓨터 내로 입력하는 단계; 디지털 컴퓨터를 사용하여 적어도 다수의 제1 입력 값 및 적어도 제2 유전 요소와 관련된 제2 입력 값을 사용하여 하나 이상의 중간값을 생성시키는 단계; 및 디지털 컴퓨터를 사용하여 하나 이상의 중간값 및 다수의 제3 입력 값을 사용하여 생물학적 상태에 대한 경계 공간을 생성시키고, 이때 경계 공간이 상기 생물학적 상태를 다른 생물학적 상태로부터 구별하는 것인 단계를 포함할 수 있다.

[0110] 상기 언급된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 컴퓨터 판독가능 매체는 분석 모델을 사용하기 위한 방법을 구현하도록 프로세서에 의해 실행될 수 있는 코드를 저장하거나 포함할 수 있다. 이러한 방법은 미지의 샘플과 관련된 제1 입력 값, 제2 입력 값, 및 제3 입력 값을 이러한 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값이 미지의 샘플 내의 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련된 것인 단계; 및 미지의 샘플을 이러한 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터를 사용하여 제1 경계 공간 또는 제2 경계 공간을 사용하여 생물학적 상태와 관련되는 것으로서 분류하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 미지의 샘플과 관련된 제1 입력 값, 제2 입력 값, 및 제3 입력 값을 이러한 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터 내로 입력하고, 이때 제1 입력 값, 제2 입력 값 및 제3 입력 값이 미지의 샘플 내의 제1, 제2 및 제3 유전 요소와 관련되는 것인 단계; 및 미지의 샘플을 이러한 디지털 컴퓨터 또는 기타 디지털 컴퓨터를 사용하여 제1 경계 공간 또는 제2 경계 공간을 사용하여 생물학적 상태와 관련되는 것으로서 분류하는 단계를 포함할 수 있다.

[0111] **실시예**

[0112] 199개의 다수의 테스트 샘플을 "롱 비치(Long Beach) 데이터 선집"으로 표지하였다. 이러한 데이터 선집에서, 하기의 표적 조합을 테스트하였다: 1) orfx, mecA 및 femA, 2) mecA, femA 및 SCCmec, 및 3) mecA, femA, SCCmec 및 MR-Cons. 이러한 데이터에 대해 개발된 콜 알고리즘들은 2차원 타원형 수학 모델을 기초로 한다. 한 예에서, 모델은 중간값을 생성한다. 중간값에 대해 역치화함으로써 MRSA 분류 결과가 결정된다. 수학 모델은 하기와 같이 공식화된다.

[0113]
$$\frac{[-x \cdot \cos(\theta) + y \cdot \sin(\theta) - x_0]^2}{a^2} + \frac{[x \cdot \sin(\theta) + y \cdot \cos(\theta) - y_0]^2}{b^2} = S$$

[0114] [식중, S는 중간값이고, x 및 y는 이러한 모델에 대한 2개의 입력물이다]. Orfx, femA 및 mecA의 데이터 선집의 경우, x 및 y는 각각 mecA 및 femA이다. SCCmec, femA 및 mecA의 데이터 선집의 경우, x 및 y는 각각 SCCmec 및 Y=f(mecA, femA)이다. 구체적으로, Y = f(mecA, femA) = mecA * sin(-0.3) + femA * cos(-0.3)이고, 식중 -0.3은 라디안 단위이다. x₀, y₀, a, b 및 θ는 미리 정의된 파라미터들이고, 이러한 모델을 소정의 기준으로 유전 알고리즘으로 훈련시킴으로써 수득된다. x₀, y₀, a, b 및 θ가 주어지면, x 및 y의 각각의 쌍으로 S가 생성될 것이다. S가 작은 것은 (x, y)가 (x₀, y₀)에 가깝다는 것을 의미하고, 그 반대도 성립된다. 분류 목적을 위해, S의 역치 (예를 들어, S₀)를 선택하는 것이 바람직하다. 샘플에서 S₀ 미만의 중간값이 생성되면, 이러한 샘플은 MRSA 양성으로 간주된다. 이러한 콜 알고리즘은 파라미터로 표시되는 수학 모델을 기초로 하고, 최적의 성능에 도달하도록 유전 알고리즘으로 훈련되며, 중간값에 대해 역치화함으로써 분류 결과를 생성한다.

[0115] **샘플 제조**

[0116] 199개의 코 면봉채취물을 수집하고, 스튜어트(stuart) 전달 배지 내에 보관하였다. 면봉 머리를 취하고, 각각의 면봉 머리를 10 mM 트리스(Tris) pH 8.0 및 1 mM EDTA, pH 8.0이 있는 1200 μl의 트리스(Tris)-기반 샘플 완충제 및 약 100 mg의 1 mm 지르코니아/실리카 비드가 있는 2 ml 샘플 현탁 튜브 내로 옮겼다. 3000 rpm의 속도에서 15초 이상 동안 샘플 튜브를 와동시킴으로써 면봉 머리 상의 박테리아를 제거하였다.

[0117] 그 후, 면봉 머리를 샘플 튜브로부터 무균적으로 제거하고, 1 ml의 트립틱 소이 브로스(Tryptic Soy broth) TSB 및 6.5% NaCl이 있는 15 ml 박테리아 배양 튜브로 옮겼다. 접종된 박테리아 튜브를 37°C 인큐베이터 내로 옮기고, 200 rpm의 속도로 진탕시키면서 밤새 인큐베이션하였다.

[0118] 그 후, 스타필로코쿠스 아우레우스 및/또는 MRSA의 존재 또는 부재를 확인하였다. 10 μl의 각각의 밤새 배양된

브로스를 BBL™ 크롬아가(CHROMagar) MRSA 및 BBL™ 크롬아가 스타필로코쿠스 아우레우스 플레이트 상에 스트리킹(streaking)하였다. 그 후, 각각의 튜브로부터의 500 μl의 1200 μl 샘플 용액을 에이젠코트(Agencourt) VirNA 키트 프로토콜에 기재된 바와 같은 DNA 단리 절차에 적용하였다. 간략하게, 이러한 절차는 프로세스 대조군으로서의 200 CFU 스타필로코쿠스 펠리스(S. felis) 박테리아로 시작하였다. 10 유닛의 아크로모펩티다제(Achromopeptidase)를 각각의 튜브에 첨가하고, 잘 혼합하고, 70℃ 수조에서 4분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 188 μl의 용해 완충제, 1.0 μl의 폴리A (600 μg/ml), 및 100 μl의 프로테아제 K (6.4 mg/ml)를 함유하는 새로 제조된 용해 용액 289 μl를 각각의 샘플에 첨가하고, 잘 혼합하였다. 그 후, 각각의 샘플을 70℃에서 1분 동안 인큐베이션하고 나서, 2분 동안 냉각시켰다. 그 후, 10 μl의 자기 비드 및 575 μl의 100% 이소프로판올을 첨가하고, 와동에 의해 잘 혼합하였다. 반응 내용물을 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 샘플 튜브를 자석 스탠드 상에 6분 동안 놓음으로써 자기 비드를 수집하여, 용액이 투명해질 때까지 자기 비드를 샘플 용액으로부터 분리시켰다.

[0119] 다음으로, 흡인 동안 어떠한 비드도 제거되지 않도록 주의하면서 상청액을 샘플에서 흡인하였다. 500 μl의 세척 완충제 (3.3 M 구아니딘 티오시아네이트, 1.7% 트리톤(Triton) X-100, 167.5 mM 시트르산나트륨)를 샘플에 첨가하고, 10초 동안 혼합되도록 와동시켰다. 그 후, 튜브를 자석 상에서 4분 동안 (또는 투명해질 때까지) 인큐베이션하였다. 그 후, 다시 상청액을 샘플에서 흡인하였다. 그 후, 900 μl의 새로 제조된 75% 에탄올을 첨가하고, 10초 동안 와동시켰다. 그 후, 튜브를 자석 상에서 4분 동안 투명해질 때까지 인큐베이션하였다. 그 후, 다시 상청액을 샘플에서 흡인하고, 에탄올 세척을 1회 더 반복하였다. 그 후, 비드를 자석 상에서 15-25분 동안 건조시켰다. 비드들의 고리가 크래킹(cracking)되기 시작했을 때, 샘플들이 용리되었다. 튜브를 자석으로부터 제거하고, 25 μl의 뉴클레아제가 없는 물을 첨가하였다. 그 후, 샘플을 혼합되도록 와동시켰다. 그 후, 튜브를 5분 동안 70℃에서 인큐베이션하였다. 튜브를 다시 자석 상에 놓고, 1분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 상청액을 PCR 증폭을 위해 깨끗한 튜브로 옮겼다.

[0120] PCR 프라이머 및 프로브, PCR 사이클링 조건

[0121] 마스터 믹스(Master mix) 표에 열거된 시약들을 얼음 상에서 제조하였다. 총 반응 횟수에 따라, 간단하게 DNA/RNA/RNase가 없는 튜브 내에 지시된 부피의 시약들을 함께 첨가함으로써 충분한 마스터 믹스를 제조할 수 있다. 혼합되도록 튜브를 와동시킬 수 있고, 그 후, 추후 사용을 위해 얼음 상에 방지할 수 있다. 20 μl의 각각의 용리제를 Mx3000P 96웰 PCR 플레이트 (비-스커트(non-skirted)) (스트라타진(Stratagene), 카탈로그 #401333)에 첨가하였다 (1개의 웰 당 1개의 용리제). 30 μl의 마스터 믹스를 용리제가 충전된 각각의 웰에 첨가한 후, 8회 이상 위아래로 부드럽게 피펫팅(pipetting)함으로써 혼합시켰다 (멀티-채널이 유용할 수 있음). 플레이트를 마이크로앰프(MicroAmp)™ 광학 접착 필름 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))으로 단단히 덮은 후, 1100×g에서 3분 동안 원심분리하고 나서, PCR 기계 내로 넣었다.

[0122] 스트라타진 MX3005P 기기 상에서의 PCR 사이클링 조건을 하기와 같이 설정하였다: 37℃에서 4' (1×); 95℃에서 1분 (1×); 95℃에서 15초 → 62℃에서 10초 → 58℃에서 30초 (40×). 모니터링되는 표적이 하기 표 1에서 제시된다.

표 1

표적	기능	올리고 ID	서열
orfX-ISS	전방향 프라이머	OrfX-ISS/attBScc for-1	TGAGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTG
	전방향 프라이머	OrfX-ISS/attBScc for-2	TGCGGGTTGTGTTAATTGAACAAGTG
	역방향 프라이머	mecII512-1-sccmec- 3	TCACTTTTTATTCTTCAAAGATTTGAGC
	역방향 프라이머	프라이머11-1-sccmec-	AAATTGCTACTAAAGAGGATATGGAAAACCATC

[0123]

	역방향 프라이머	7 프라이머12-sccmec-8	CTCTGCTTTATATTATAAAAATTACGGCTG
	역방향 프라이머	신규 유형 iii-1- sccmec-14	CGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTC
	역방향 프라이머	유형 IVc-sccmec-2	CTTGAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAAC
	역방향 프라이머	신규 프라이머	TGAGCTTTTCCACTCCCATTTCTTCCAAA
	역방향 프라이머	SCCmec-4nV	GCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATAC
	역방향 프라이머	SCCmec-3n	CATTCATTCATCCACCCTAAACTTAATCTTTC
	역방향 프라이머	SCCmec-5n	TATGGAAATCCATCTCTACTTTATTGTTTTCTTC
	역방향 프라이머	SCCmec-6n	AATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC
	역방향 프라이머	SE-7-11	CTATTTCTGTAATACTTAAACCTTTCTTCC
	역방향 프라이머	SE-17	CCGTATGATTCATATTAATAATGAATCATAACGGAGG
	역방향 프라이머	SE-13	CTCTTATGAAATGCTTTTTTCACTTATCC
	택옴 프로브	orfX 프로브-2	ATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAYGCTC
	택옴 프로브	ORFX 프로브-1	ACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC
	택옴 프로브	ORFX 프로브	ACGCCTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC
femA	전방향 프라이머	femA-3 전방향 프라이머	GACCGTTATAATTTCTATGGTGTAGTGG
	역방향 프라이머	femA-3 역방향 프라이머	GTCACCAACATATTCAATAATTTACAGC
	택옴 프로브	femA-sa-프로브	ACAGAAGATGCTGAAGATGCTGGTGT
mecA	전방향 프라이머	mecA-2 전방향 프라이머	GCAGAAAGACCAAAGCATAACATATTGA
	역방향 프라이머	MecA-2 역방향 프라이머	GCCTATCTCATATGCTGTTCTCTGT
	택옴 프로브	mecA 프로브	AGACCGAAACAATGTGGAATTGGCCA
스타펠로코쿠스 펠리스 (IC)	IC 전방향 프라이머	Sf 전방향신규	TGCCAATGTAGATAGTCTTCCAGA
	IC 역방향 프라이머	Sf 역방향신규	AAGTGCCAGAGAATGAGTGG

[0124]

	IC 프로브	fSfelis	ACCGCCACCATTATTACGTACAGCTG
SCCmec	전방향 프라이머	OrfX-ISS/attBScce for-1	TGAGGGTTGTGTTAATTGAGCAAGTG
	전방향 프라이머	OrfX-ISS/attBScce for-2	TGCGGGTTGTGTTAATTGAACAAGTG
	역방향 프라이머	mecII512-1-sccmec- 3	TCACTTTTATTCTTCAAAGATTTGAGC
	역방향 프라이머	프라이머11-1-sccmec- 7	AAATTGCTACTAAAGAGGATATGGAAAACCATC
	역방향 프라이머	프라이머12-sccmec-8	CTCTGCTTATATTATAAAAATTACGGCTG
	역방향 프라이머	신규 유형 iii-1- sccmec-14	CGTATGATATTGCAAGGTATAATCCAATATTTT
	역방향 프라이머	유형 IVc-sccmec-2	CTTGAAATGAAAGACTGCGGAGGCTAAC
	역방향 프라이머	신규 프라이머	TGAGCTTTTCCACTCCCATTCTTCCAAA
	역방향 프라이머	SCCmec-4nV	GCAATTCACATAAACCTCATATGTTCTGATAC
	역방향 프라이머	SCCmec-3n	CATTCATTCATCCACCCTAAACTTAATCTTTC
	역방향 프라이머	SCCmec-5n	TATGGAAATCCATCTCTACTTTATTGTTTTCTTC
	역방향 프라이머	SCCmec-6n	AATATTTTCATATATGTAATTCCTCCACATCTC
	역방향 프라이머	SE-7-11	CTATTTCTGTAATACTTAAAACCTTTTCTTCC
	역방향 프라이머	SE-17	CCGTATGATTCATATTTAAAATGAATCATACGGAGG
	역방향 프라이머	SE-13	CTTCTTATGAAATGCTTTTTTTCACCTATCC
	백만 프로브	orfX 프로브-2	ATGCTTCTCCTCGCATAATCTTAAAYGCTC
	백만 프로브	ORFX 프로브-1	ACGCTTCTCCACGCATAATCTTAAATGCTC
	백만 프로브	ORFX 프로브	ACGCCTCTCCTCGCATAATCTTAAATGCTC

[0125]

[0126]

[0127]

상기 표에서, SCCmec에 상응하는 서열을 지니는 프로브는 SCCmec의 오른쪽 말단에 대해 상보적이다.

하기 표는 룡 비치 데이터 선집 내의 199개의 샘플을 사용하고 본 발명의 실시양태에 따른 분석 모델 (상기 기재된 바와 같음) 및 다른 콜 알고리즘을 사용하는 분석 모델을 사용하여 생성된 가양성 및 가음성 데이터를 나타낸다.

집적 배양 데이터 1 (양성 59개, 음성 140개)				
	FP	FN		
1: 전략 A 3-표적 클러스터링 (mecA, femA, orfX)	10	2		DxN 콜링 알고리즘
2: 전략 C 4-표적 클러스터링 (mecA, femA, SCCmec (MRSA), SCCmec (MR-ConS))	3	2		DxN 콜링 알고리즘
3: 전략 C 3-표적 클러스터링 (mecA, femA, SCCmec)	3	4		DxN 콜링 알고리즘
4: 엑스퍼트(Xpert) 1-표적 (SCCmec)	11	2		
5: 전략 C 1-표적 (SCCmec)	11	4		공개된 콜 알고리즘
6: 전략 C 2-표적 (SCCmec, mecA)	10	5		공개된 콜 알고리즘
7: 전략 C (SCCmec, mecA) Ct 비교 (±4ct)	5	7		공개된 콜 알고리즘
8: 전략 C 2-표적 (SCCmec, femA)	3	5		공개된 콜 알고리즘
9: 전략 C (SCCmec, femA) Ct 비교	3	5		공개된 콜 알고리즘
10: 전략 C3-표적 (SCCmec, mecA 및 femA)	2	5		공개된 콜 알고리즘
11: 전략 A 2-표적 (femA 및 mecA)	38	1		공개된 콜 알고리즘
12: 전략 A 2-표적 (orfX - ve) Ct 비교 (±4ct)	24	5		공개된 콜 알고리즘
13: 전략 A 3-표적 (mecA, femA, orfX)	18	25		공개된 콜 알고리즘
14: 전략 A 3-표적 (mecA, femA, orfX) Ct 비교 (±4ct)	17	5		공개된 콜 알고리즘

[0128]

[0129]

첫번째 3개의 분석 모델 (1 내지 3)은 본 발명의 실시양태에 따라 생산된 것들이고, 양호한 결과를 나타낸다. 3-표적 클러스터링 및 상기 기재된 프로세스 (예를 들어, 도 1에서와 같음)를 사용하는, 전략 A로 칭해지는 제1

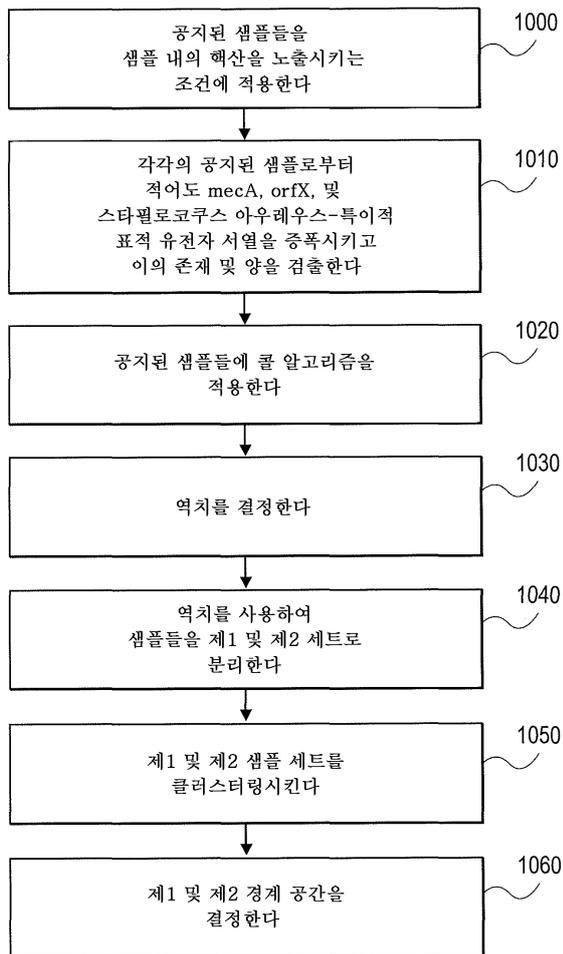
분석 모델에서는 10개의 가양성 및 2개의 가음성이 산출되었다. 전략 C 및 4개의 표적을 사용하는 제2 분석 모델에서는 3개의 가양성 및 2개의 가음성이 산출되었다. 전략 C를 사용하는 제3 분석 모델에서는 3개의 가양성 및 4개의 가음성이 산출되었다. 전략 A 및 전략 C와 관련된 방법들은 상기 기재되어 있다 (예를 들어, 도 5에서와 같음). 4-표적 전략 C 예의 경우, MRConS가 MRSA 샘플을 비-MRSA 샘플로부터 구별하기 위한 추가적인 표적으로서 사용되었다.

- [0130] 나머지 데이터는 공개된 콜 알고리즘들에 따라 프로세싱된 데이터를 나타낸다. 이같은 알고리즘들의 일부 상세 사항이 하기에 제공된다.
- [0131] 4: 엑스퍼트는 공지되어 있고 상업적으로 입수가 가능한 시험이다.
- [0132] 5: 전략 C 1-표적; SCCmec가 표적이다. SCCmec Ct 값이 32 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. SCCmec Ct 값이 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다.
- [0133] 6: 전략 C 2-표적 (SCCmec, mecA): SCCmec 및 mecA 둘 모두가 32 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. SCCmec가 32를 초과하거나 mecA가 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다.
- [0134] 7: 전략 C (SCCmec, mecA) Ct 비교 ($\pm 4ct$): SCCmec가 32를 초과하거나 mecA가 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다. SCCmec 및 mecA Ct 값 둘 모두가 32 미만이고, SCCmec와 mecA 사이의 델타 Ct가 4 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. 델타 Ct가 4를 초과하면, MRSA가 존재하지 않는 것이다.
- [0135] 8: 전략 C 2-표적 (SCCmec, femA): SCCmec 및 femA 둘 모두가 32 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. SCCmec가 32를 초과하거나 femA가 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다.
- [0136] 9: 전략 C (SCCmec, femA) Ct 비교: SCCmec가 32를 초과하거나 femA가 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다. SCCmec 및 femA Ct 값 둘 모두가 32 미만이고, SCCmec와 femA 사이의 델타 Ct가 4 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. 델타 Ct가 4를 초과하면, MRSA가 존재하지 않는 것이다.
- [0137] 10: 전략 C 3-표적 (SCCmec, mecA 및 femA): SCCmec, mecA, femA가 32를 초과하면, MRSA가 존재하지 않는 것이다. mecA가 32를 초과하면, MRSA가 없는 것이다. SCCmec가 32를 초과하면, MRSA가 존재하지 않는 것이다. mecA 및 femA가 둘 모두 32 미만이고, SCCmec가 32를 초과하고, mecA 및 femA의 델타 Ct 값이 4 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다.
- [0138] 11: 전략 A 2-표적 (femA 및 mecA): femA 및 mecA 둘 모두가 32 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. 그렇지 않으면, MRSA가 없는 것이다.
- [0139] 12: 전략 A 2-표적 (orfX - ve) Ct 비교 ($\pm 4ct$): femA 및 mecA 둘 모두 32 미만이고 femA와 mecA 사이의 델타 Ct가 4 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. 그렇지 않으면, MRSA가 없는 것이다.
- [0140] 13: 전략 A 3-표적 (mecA, femA, orfX): femA 및 mecA 둘 모두 32 미만이고 orfX가 음성이면, MRSA가 존재하는 것이다. 그렇지 않으면, MRSA가 없는 것이다.
- [0141] 14: 전략 A 3-표적 (mecA, femA, orfX) Ct 비교 ($\pm 4ct$): femA 및 mecA 둘 모두가 32 미만이고, orfX가 음성이며, mecA와 femA 사이의 델타 Ct 값이 4 미만이면, MRSA가 존재하는 것이다. 그렇지 않으면, MRSA가 없는 것이다.
- [0142] 본 출원에 기재된 소프트웨어 성분, 단계, 또는 함수는 예를 들어 통상적인 기법 또는 객체-지향적 기법을 사용하는 임의의 적절한 컴퓨터 언어, 예를 들어, 자바(Java), C++ 또는 펄(Perl)을 사용하여 하나 이상의 프로세서에 의해 실행될 소프트웨어 코드로서 구현될 수 있다. 소프트웨어 코드는 컴퓨터 판독가능 매체, 예컨대 랜덤 액세스 메모리 (RAM), 읽기 전용 메모리 (ROM), 자기 매체 예컨대 하드 드라이브 또는 플로피 디스크, 또는 광학 매체 예컨대 CD-ROM 상의 일련의 명령어 또는 커맨드(command)로서 저장될 수 있다. 또한 임의의 이같은 컴퓨터 판독가능 매체는 단일 전산 장치 상에 또는 내에 존재할 수 있고, 시스템 또는 네트워크 내의 상이한 전산 장치들 상에 또는 내에 존재할 수 있다.
- [0143] 본 발명의 일부 실시양태는 소프트웨어 또는 하드웨어 또는 양쪽의 조합에서 제어 논리의 형태로 구현될 수 있다. 제어 논리는 정보 처리 장치로 하여금 본 발명의 실시양태에서 개시된 일련의 단계들을 수행하는 것을 지시하도록 개조된 다수의 명령어로서 정보 저장 매체 내에 저장될 수 있다. 본원에서 제공된 개시내용 및 교시를 기초로, 당업자는 본 발명을 구현하기 위한 다른 방식 및/또는 방법을 인식할 것이다.

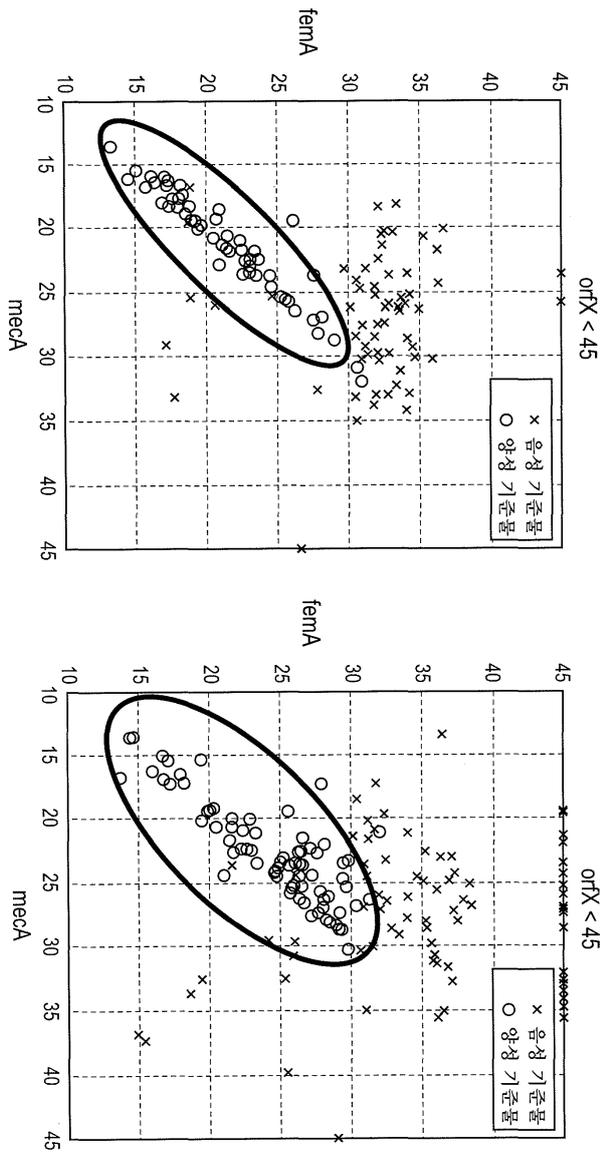
- [0144] 단수형 관사("a", "an" 또는 "the")의 언급은 명확하게 반대로 지시되지 않는 한 "하나 이상"을 의미하도록 의도된다.
- [0145] 상기 설명은 예시적이고, 제한적이지 않다. 본 개시내용의 개관 시 본 발명의 다수의 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 따라서, 본 발명의 범주는 상기 기재를 참조로 결정되지 않아야 하고, 대신 현안의 청구항 및 이의 전체 범주 또는 등가물을 참조하여 결정되어야 한다.
- [0146] 상기 언급된 모든 특허, 특허 출원, 간행물, 및 설명은 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참고로 포함된다. 어떤 것도 선행 기술로 인정되지 않는다.

도면

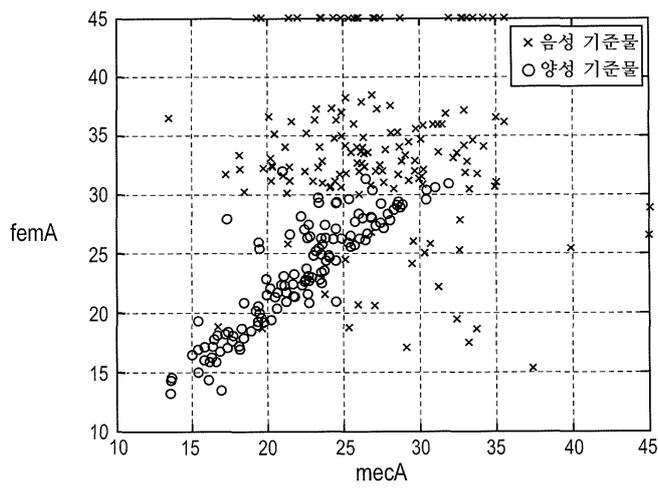
도면1



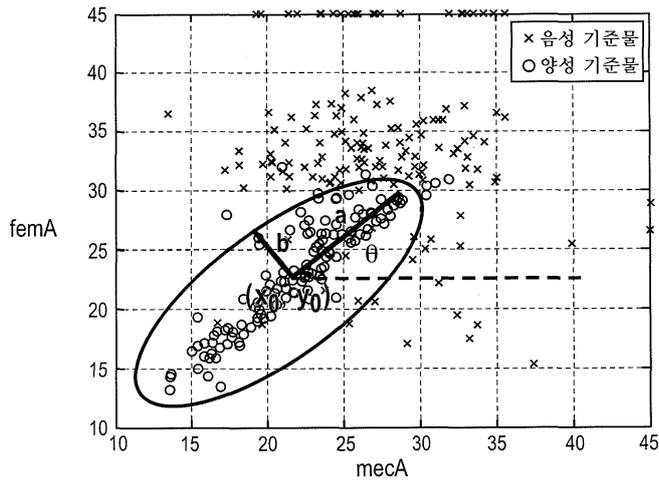
도면2



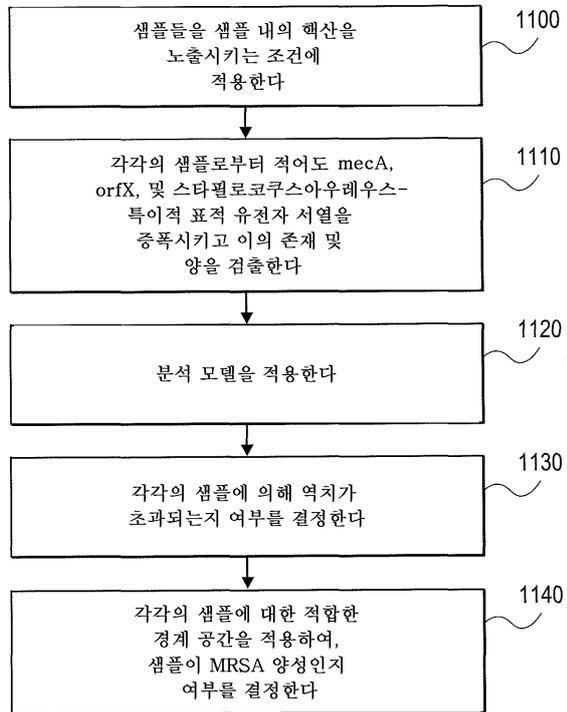
도면3a



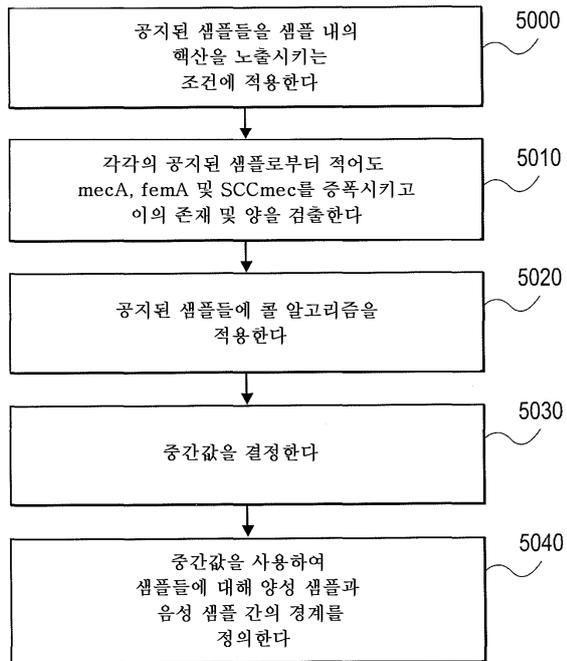
도면3b



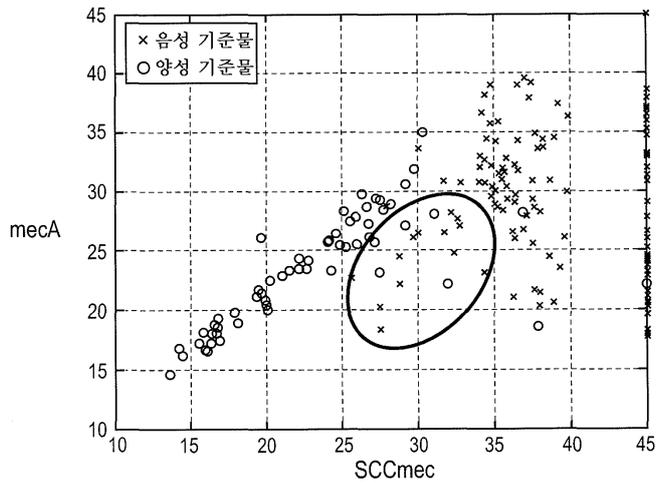
도면4



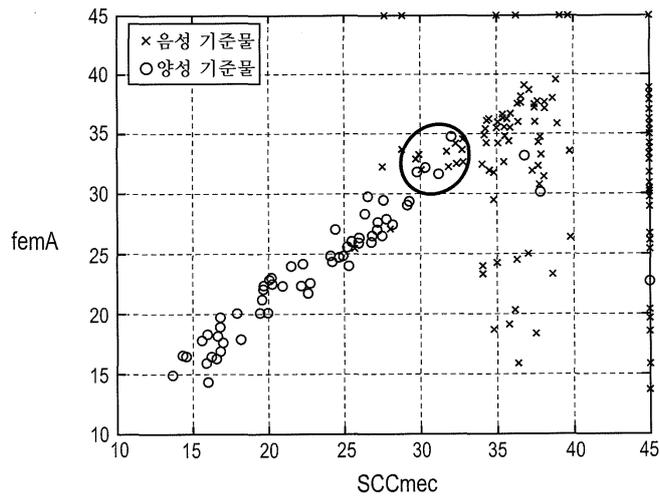
도면5



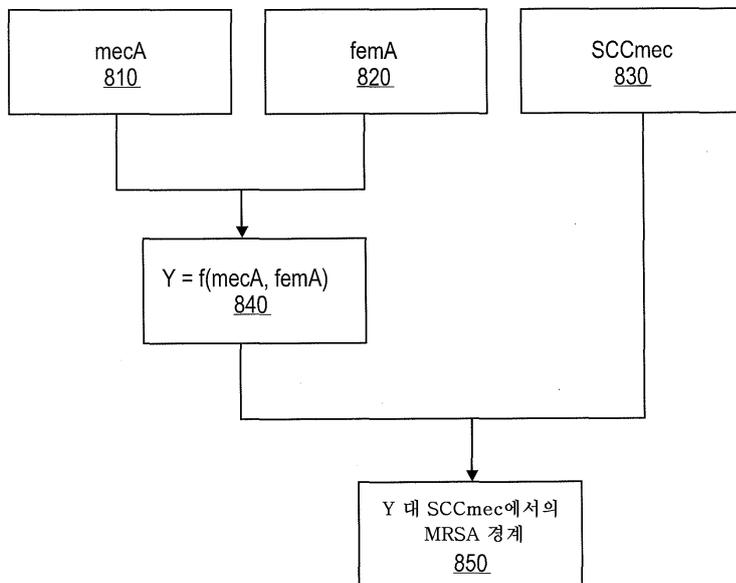
도면6a



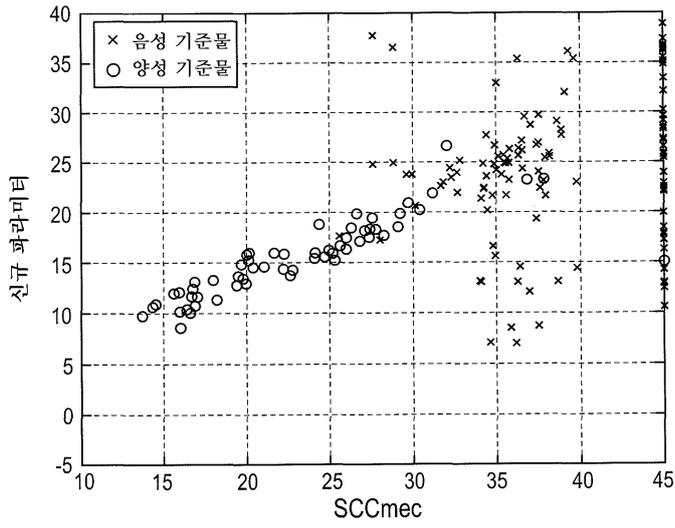
도면6b



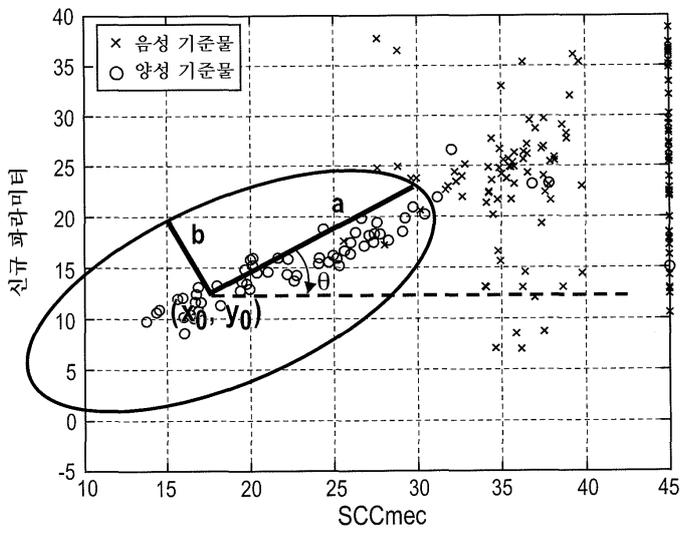
도면7



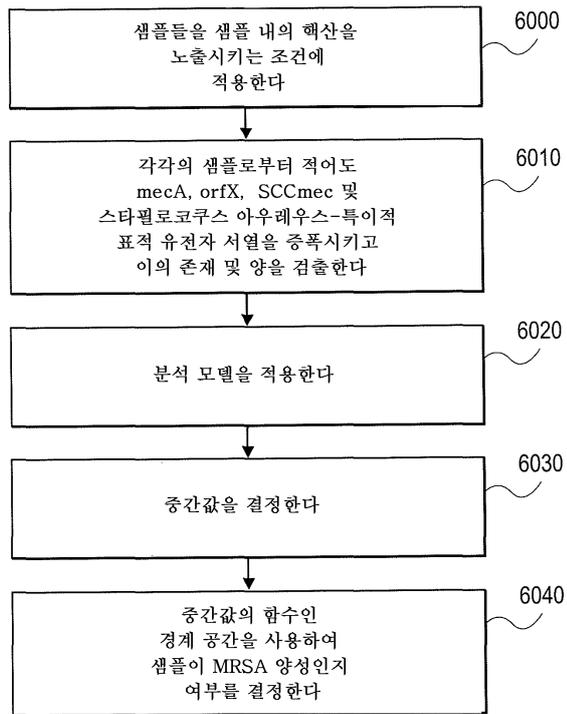
도면8



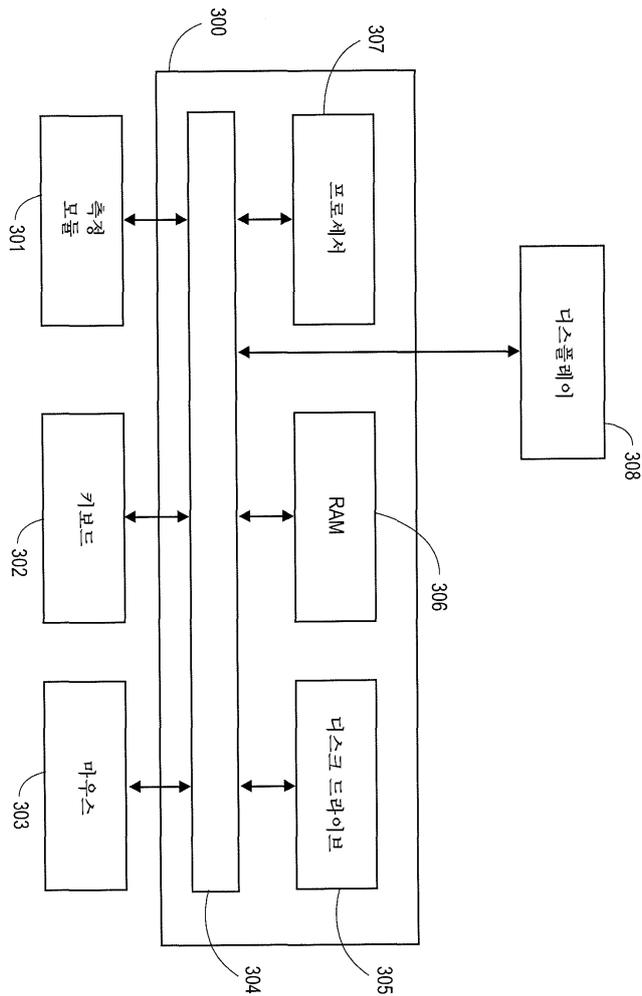
도면9



도면10



도면11



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Lu, Jiuliu

Wang, Zihua

Reyes, Antonio Arevalo

Gustafson, Erik Alan

Riley, John Steven

Beckman Coulter, Inc.

<120> Systems and Methods for Detecting the Presence of a Biological Status Using Clustering

<130> 021594-010710PC

<140> WO PCT/US10/56455

<141> 2010-11-12

<150> US 61/261,147
 <151> 2009-11-13
 <160> 27
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 26
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR forward primer oligo ID
 OrfX-ISS/attBSc for-1 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 1
 tgagggttgt gttaattgag caagtg 26
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR forward primer oligo ID
 OrfX-ISS/attBSc for-2 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 2
 tgcgggttgt gttaattgaa caagtg 26
 <210> 3
 <211> 28

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID
 mecII512-1-sccmec-3 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 3
 tcacttttta ttcttcaaag atttgagc 28
 <210> 4
 <211> 33

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID
 primer11-1-sccmec-7 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 4
 aaattgctac taaagaggat atggaaaacc atc 33
 <210> 5
 <211> 29
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID primer
 12-sccmec-8 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 5
 ctctgcttta tattataaaa ttacggctg 29
 <210> 6
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID
 newtypeiii-1-sccmec-14 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 6
 cgtatgatat tgcaaggtat aatccaatat ttc 33
 <210> 7
 <211> 28

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID
 typeIVc-sccmec-2 for orfX-ISS or SCCmec targets
 <400> 7

cttgaaatga aagactgcgg aggctaac 28

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID NEWPRIMERS
for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 8

tgagcttttt ccaactccat ttcttcaaa 30

<210> 9

<211> 32

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SCCmec-4nV
for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 9

gcaattcaca taaacctcat atgttctgat ac 32

<210> 10

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SCCmec-3n
for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 10

cattcattca tccaccctaa acttaatttt tc 32

<210> 11

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SCCmec-5n
 for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 11
 tatggaaatc catctctact ttattgtttt cttc 34

<210> 12
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SCCmec-6n
 for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 12
 aatatttcat atatgtaatt cctccacatc tc 32

<210> 13
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SE-7-11 for
 orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 13
 ctattttctgt aataacttaaa accttttctt cc 32

<210> 14
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SE-17 for
 orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 14
 ccgtatgatt catattaataaa tgaatcatatc ggagg 35

<210> 15
 <211> 31
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID SE-13 for
 orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 15
 cttcttatga aatgtctttt ttcacttata c 31

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR TaqMan probe oligo ID orfx probe-2
 for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 16
 atgcttctcc tcgcataatc ttaaaygctc 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR TaqMan probe oligo ID ORFX PROBE-1
 for orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 17
 acgcttctcc acgcataatc ttaaagtctc 30

<210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR Taqman probe oligo ID ORFX PROBE for
 orfX-ISS or SCCmec targets

<400> 18
 acgcctctcc tcgcataatc ttaaagtctc 30

<210> 19
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR forward primer oligo ID femA-3
 forward primer for femA target
 <400> 19
 gaccgttata atttctatgg tgtagtagg 29
 <210> 20
 <211> 27

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR reverse primer oligo ID femA-3
 reverse primer for femA target
 <400> 20
 gtcaccaaca tattcaataa tttcagc 27
 <210> 21
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> synthetic PCR TaqMan probe oligo ID femA-sa-probe
 for femA target
 <400> 21
 acagaagatg ctgaagatgc tggtagt 26
 <210> 22
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> synthetic PCR forward primer oligo ID mecA-2

forward primer for mecA target

<400> 22

gcagaaagac caaagcatac atattga 27

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR reverse primer oligo ID mecA-2

reverse primer for mecA target

<400> 23

gcctatctca tatgctgttc ctgt 24

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR TaqMan probe oligo ID mecAprobe for

mecA target

<400> 24

agaccgaaac aatgtggaat tggcca 26

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR IC forward primer oligo ID

Sfforwardnew for S. felis (IC) target

<400> 25

tgccaatgta gatagtcttc caga 24

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR IC reverse primer oligo ID
sfreversenew for S. felis (IC) target

<400> 26

aagtgccag aagaatgagt gg

22

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic PCR IC probe oligo ID fSfelis for S. felis
(IC) target

<400> 27

accgccacca ttattacgta cagctg

26